

<https://doi.org/10.17816/ecogen17323-38>**SINORHIZOBIVM MELILOTI: ХРОМОСОМНЫЕ ТИПЫ И ГЕНОМНЫЕ ОСТРОВА**

© М.Е. Черкасова, В.С. Мунтян, А.С. Саксаганская, Б.В. Симаров, М.Л. Румянцева

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург

Для цитирования: Черкасова М.Е., Мунтян В.С., Саксаганская А.С., и др. *Sinorhizobium meliloti*: хромосомные типы и геномные острова // Экологическая генетика. – 2019. – Т. 17. – № 3. – С. 23–38. <https://doi.org/10.17816/ecogen17323-38>.

Поступила: 15.02.2019

Одобрена: 03.07.2019

Принята: 24.09.2019

✿ Выполнен анализ полиморфизма последовательностей корового генома клубеньковых бактерий *S. meliloti* с целью выявления хромосомных типов и оценки встречаемости в них геномных островов, рассматриваемых как акцессорные элементы хромосомы. В результате сопряженного анализа генов-маркеров М-I (*betBC*) и М-II (*SMc04407-SMc04881*), продукты которых задействованы в клеточном метаболизме и вовлечены в процессы формирования стрессоустойчивости, а также последовательностей маркера М-III (IGS *rrs-rrl*), используемых в филогенетических исследованиях на уровне вида, были выявлены достоверные различия между пятью типическими группами и девятью подгруппами штаммов, различавшихся по району и источнику выделения, а также по солеустойчивости. Определены четыре хромосомных типа и показана предпочтительность наличия одного из трех островов Rm1021 в каждом из них. Установлены достоверные различия по встречаемости штаммов, имевших определенный хромосомный тип в очагах разнообразия люцерны, расположенных в северных районах Кавказа и Казахстана (Приаралье), а также в агроценозах. Сделано заключение, что штаммы с измененными маркерами М-I/М-II могут относиться к дивергентным клональным линиям, тогда как штаммы с измененным маркером М-III, а также маркерами М-I/М-II могут являться представителями нового(ых) биовара(ов) клубеньковых бактерий люцерны, который(ые) формируется(ются) значительно активнее в современном центре интрогрессивной гибридизации люцерны в Приаралье.

✿ **Ключевые слова:** *Sinorhizobium meliloti*; полиморфизм хромосомных маркеров; хромосомные типы; геномные острова; ПЦР-анализ; солеустойчивость.

**SINORHIZOBIVM MELILOTI: CHROMOSOMAL TYPES AND GENOMIC ISLANDS**

© М.Е. Cherkasova, V.S. Muntyan, A.S. Saksaganskaia, B.V. Simarov, M.L. Roumiantseva

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg, Russia

Cite this article as: Cherkasova ME, Muntyan VS, Saksaganskaia AS, et al.

*Sinorhizobium meliloti*: chromosomal types and genomic islands.*Ecological genetics*. 2019;17(3):23-38. <https://doi.org/10.17816/ecogen17323-38>.

Received: 15.02.2019

Revised: 03.07.2019

Accepted: 24.09.2019

✿ **Background.** Polymorphism analysis was done for the core genome sequences of nodule bacteria of *S. meliloti* species in order to identify chromosomal types and to evaluate the occurrence of accessory elements (genomic islands) in them. **Materials and methods.** Chromosomal studied loci were: *betBC* (marker M-I) and *SMc04407-SMc04881* (marker M-II) both are related to metabolic processes and stress tolerance, and 16S-23S intergenic sequences (marker M-III) to search phylogenetical distance at intraspecies level. **Results.** Significant differences between the occurrence of alleles of gene-markers M-I/M-II and M-III were determined between strains related to tested the 5 typical groups and 9 subgroups of strains differing by geographical region/source (nodule, soil) of isolation, as well as by salt tolerance. Four chromosomal types were identified among tested *S. meliloti* native isolates and a preference occurrence of one of the three islands Rm1021 in links with particular chromosomal type was shown. The significant prevalence of strains with particular chromosomal type was shown for *S. meliloti* populations native to centers of alfalfa diversity at the NE of Caucasus, as well as at NE of Kazakhstan (Aral sea related region), as well as in agroecosystems. **Conclusion.** It was predicted that strains inherited altered markers M-I/M-II may belong to divergent clonal lines occurred in both centers of alfalfa diversity, while strains with altered sequences of all three markers could be a representatives of a new *S. meliloti* biovar(s), the formation of which is occurred much more intensively at the modern center of the introgressive hybridization of alfalfa at NE of Kazakhstan.

✿ **Keywords:** *Sinorhizobium meliloti*; chromosomal markers polymorphism; chromosomal types; genomic islands; PCR analysis; salt tolerance.

**ВВЕДЕНИЕ**

Геном клубеньковых бактерий (ризобии) включает хромосому и плазмиды, значительно различающиеся по размеру. Наличие нескольких репликонов в геноме (многокомпонентность) может быть обусловлено

тем, что ризобии не только являются типичными почвенными сапрофитами, но и вступают в необлигатный азотфиксирующий симбиоз с бобовыми растениями, в процессе формирования которого клетки бактерий претерпевают необратимые морфофизиологические

и метаболические изменения в микроаэрофильных и гиперосмотических условиях клубенька.

Гены, расположенные на хромосоме бактерий, детерминируют жизненно важные процессы, и их рассматривают как гены «домашнего хозяйства», или базовые, или коровые (от англ. core) [1–7]. Ортологи этих генов присутствуют, как правило, у всех штаммов одного вида/рода, а также у соответствующих им предполагаемых общих предков [8, 9]. Изучение структуры генов у генетически неродственных штаммов бактерий на рестрикционном (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов — ПДРФ) и/или нуклеотидном уровнях позволяет выявлять аллели с разным уровнем сходства, на основании которого штаммы объединяют в группы/кластеры [4, 9–11]. Хромосомы штаммов из контрастно различающихся кластеров или групп описывают как разные хромосомные линии (англ. chromosomal lineages) [4, 10, 11], или группы (англ. chromosomal groups) [12], или генотипы (англ. chromosomal genotypes) [10, 13], или типы (англ. chromosomal types) [10, 11, 14, 15]. Необходимо отметить, что вплоть до настоящего времени нет общепринятого обозначения, и даже в одной публикации несколько из вышеперечисленных терминов могут как синонимы встречаться одновременно [4, 10, 11, 16]. В данной работе использован термин «хромосомные типы».

Важным условием отбора генов-маркеров для определения хромосомных типов является низкий уровень структурного полиморфизма генов-кандидатов и отсутствие (или низкий уровень) рекомбинации между ними [10], кроме того, они должны быть ортологами [17]. Анализ литературных данных показал, что в качестве генов-маркеров используют *rrs* (16S рДНК), *rrl* (23S рДНК), *atpD* (АТФ-синтаза), *glnII* (глутаминсинтаза), *recA* (белок, участвующий в процессе рекомбинации и репарации) или *zwf* (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа), *sod* (супероксиддисмутаза), *lacZ* ( $\beta$ -галактозидаза) или *SMc00019* (консервативный гипотетический белок), *truA* (тРНК-псевдоуридинсинтаза А), *thrA* (гомосериндегидрогеназа) [10, 11, 18, 19]. Авторы преимущественно анализировали два, реже три коровых гена из указанного списка, однако известны работы, в которых использовали один ген-маркер, например, *gyrB* ( $\beta$ -субъединица ДНК-гиразы) [4] или *dnaJ* (или Hsp40; белок теплового шока размером 40 кДа) [20]. Нами был проведен анализ продуктов вышеперечисленных генов с применением базы данных кластеров групп белков-ортологов (англ. Cluster of Orthologous Groups, или COG-группы) [17]. Как оказалось, вышеуказанные гены кодируют белки, входящие в восемь из двадцати пяти известных COG-групп, относящихся к трем из четырех COG-кластеров. Один из указанных кластеров включает гены, продукты которых участвуют в процессах хранения и обработки информации (группы L, J, K), второй кластер —

в процессах метаболизма (группы C, E, G, P) и третий кластер — в клеточных процессах и сигналинге (группа O). Известны случаи, когда помимо коровых генов для выявления хромосомных типов использовали не кодирующие белки межгенную последовательность *rrs-rrl* рибосомального оперона (англ. Intergenic Transcribed Spacer, ITS) [4, 13, 20, 21]. Однако анализ ITS преимущественно применяют в филогенетических исследованиях бактерий на внутривидовом уровне [18, 20–23], поскольку это позволяет выявлять новые филогенетически обособленные кластеры штаммов (линии/биофармы/подвиды; англ. lineages/biovars/subspecies) [21, 24, 25].

Заслуживает внимания работа Escobar-Páramo et al. (2004), в которой сделано предположение, что штаммы *Escherichia coli* с разными хромосомными типами содержат разные факторы вирулентности [26]. Последние относят к дополнительным, или аксессуарным (англ. accessory), элементам генома, поскольку они присутствуют не у всех штаммов одного вида [2]. Аксессуарными элементами являются плазмиды, геномные островки и геномные острова, которые рассматривают как генетические элементы вспомогательного (англ. auxiliary), или гибкого (англ. flexible) [3, 5, 27, 28], или аксессуарного, генома (последний термин получил наибольшее распространение в современной англо- и русскоязычной литературе) [1, 4, 5, 7, 27, 28]. Как правило, гены аксессуарной части генома не вовлечены в контроль жизненно важных функций клетки, но могут детерминировать процессы, предопределяющие способность бактерий занимать разные экологические ниши [29, 30]. Из аксессуарных элементов наибольший интерес представляют геномные острова (ГО) — протяженные последовательности (до 700 т. п. н.) фагового происхождения, сайт-специфически встраивающиеся в последовательности генов, кодирующих тРНК [31]. Геномные острова характеризуются пониженным содержанием пар гуанина и цитозина (в среднем до 12 %) относительно коровой части хромосомы [31, 32]. Наличие последовательностей с менее жесткой структурной организацией (за счет обогащения их двойными водородными связями между аденином и тиминном) может влиять на стабильность структуры хромосомы и активность генов [33]. Геномные острова содержат мобильные генетические элементы разных классов и открытые рамки считывания. Функциональный анализ гипотетических продуктов этих открытых рамок считывания показал, что они являются паралогами и/или ортологами различных по функциональной значимости генов, которые гомологичны таковым у бактерий из разных фил [28]. Это доказывает, что ГО участвует в процессах отдаленного горизонтального переноса генов. Показано, что штаммы даже одного вида могут значительно различаться по наличию ГО [34–36], однако для клубеньковых бактерий нет данных о зависимости встречаемости ГО от характеристик корового генома.

В хромосоме референс-штамма *Sinorhizobium meliloti* Rm1021, являющегося симбионтом люцерны, выявлено три протяженные последовательности (от 19 до 80 т. п. н.), которые соответствуют характеристикам ГО согласно базе данных Islander [37]. Смежные ГО (Sme21T и Sme19T) обладают сходной протяженностью и расположены в первой четверти хромосомы, тогда как третий геномный остров (Sme80S) находится в последней четверти хромосомы и существенно превосходит в длину оба вышеуказанных острова (рис. 1) [28]. В составе Sme80S присутствуют копии генов, имеющих отношение к симбиотической активности и процессам метаболизма осмопротекторов [36]. Выявлены достоверные различия по встречаемости Sme80S и Sme21T у штаммов *S. meliloti*, адаптированных к засоленным и засушливым почвам соответственно [28].

Цель работы заключалась в изучении полиморфизма хромосомных последовательностей для выявления хромосомных типов и в оценке встречаемости в них ГО (рассматриваемых в качестве акцессорных элементов хромосомы) в геномах природных штаммов клубеньковых бактерий *S. meliloti*, различавшихся по району и источнику выделения (очаги разнообразия генцентров бобовых растений и агроценозы; клубенек и почва) и по фенотипу (солеустойчивые и солечувствительные).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Штаммы.** Изучено 218 природных штаммов *Sinorhizobium meliloti* из рабочей коллекции штаммов клубеньковых бактерий лаборатории генетики и селекции микроорганизмов ФГБНУ ВНИИСХМ. Штаммы выделены из клубеньков растений-хозяев и из почв (далее К- и П-изоляты соответственно), собранных на территории северной части Кавказского генцентра культурных растений (далее СКГ) и в северном районе Приаралья (Казахстан), относящегося к современному центру интрагрессивной гибридизации люцерны (далее ПАГ), а также из почв агроценозов (далее АЦ) Ленинградской области Северо-Западного региона РФ, с использованием соответствующих методик [38]. Для выделения штаммов из почв применяли метод «трэппинга» (англ. trapping), согласно которому стерильные проростки растений инокулировали почвенными вытяжками [38]. Всего проанализировано 95 и 89 штаммов *S. meliloti* из СКГ и ПАГ, представленных К- и П-изолятами (31/64 и 66/23 соответственно) и 34 П-изолята из АЦ. Принадлежность штаммов из СКГ и ПАГ к виду *S. meliloti* была определена ранее [39], а штаммов из АЦ — в настоящем исследовании с помощью метода ARDRA. В качестве референса использовали штамм *S. meliloti* Rm1021.

**Солеустойчивость штаммов** определяли по росту штаммов на среде TY, содержащей 0,6 М NaCl, согласно методу, описанному в работе [38]. Штаммы из СКГ и ПАГ имели солеустойчивый (нормальный рост; да-

лее R) или солечувствительный фенотип (слабый рост; далее S) [40]. Солеустойчивость изолятов из АЦ определена в настоящей работе. Соотношения R/S штаммов в популяциях из СКГ, ПАГ и в группе штаммов из АЦ были следующими: 74/21, 49/40 и 31/3 соответственно.

**Маркерные последовательности хромосомы** определены в соответствии с полногеномной последовательностью референс-штамма *S. meliloti* Rm1021 (GenBank NC\_003047.1; см. рис. 1). Маркер M-I — последовательность протяженностью 1544 п. н., включавшая последовательность 3'-конца гена *betB* (143 п. н.), последовательность 5'-конца гена *betC* (1400 п. н.), 1 п. н. между генами *betC* и *betB*. Гены *betBC*, расположенные во второй четверти хромосомы, вовлечены в процессы формирования солеустойчивого фенотипа, а также в метаболизм углерода и азота (см. рис. 1). Маркер M-II — локус *msfp*, находящийся в последней четверти хромосомы в непосредственной близости от *oriC* (см. рис. 1). В состав анализируемой последовательности *msfp*, протяженностью 1280 п. н., входили последовательность 5'-конца гена *SMc04407* (532 п. н.), последовательность между генами *SMc04407* и *SMc04881* (518 п. н.) и последовательность 3'-конца гена *SMc04881* (230 п. н.). Продуктом первого гена является белок, предположительно участвующий в транспорте осмопротектора (пролина/бетаина), а продукт второго гена вовлечен в синтез гомолога токсина VarC-системы токсин — антитоксин II типа и в формирование состояния покоя бактериальной клетки в условиях стресса [41]. Поскольку маркеры M-I и M-II задействованы в процессах метаболизма и формирования стрессоустойчивости, далее они обозначены как «метаболические маркеры».

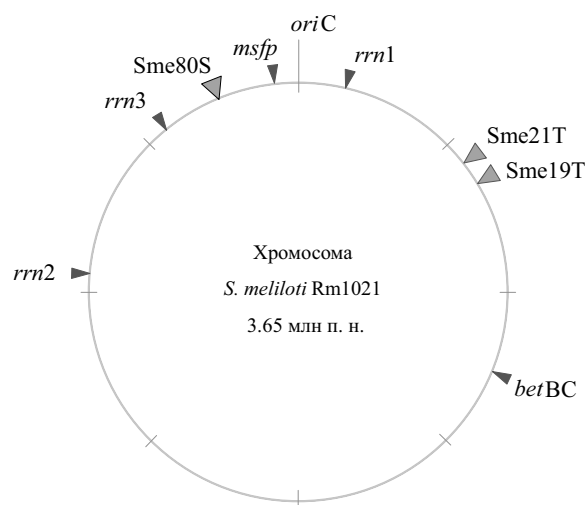


Рис. 1. Схема локализации коровых маркерных последовательностей и геномных островов на хромосоме референс-штамма *Sinorhizobium meliloti* Rm1021: *oriC* — ориджин репликации; ▲ — коровые маркеры; *rrn* (1-3) — рибосомальные опероны, содержащие ITS-последовательности; ▲ — геномные острова

Маркер M-III — межгенная последовательность ITS (IGS *rrs-rrl*; см. рис. 1) оперона рибосомальных генов (*rrs-rrl*) протяженностью 1308 п. н., включавшая 3'-конец последовательности гена 16S рРНК (21 п. н.), последовательность между генами 16S рРНК и тРНК<sup>Ile</sup> (256 п. н.), последовательность гена тРНК<sup>Ile</sup> (77 п. н.), последовательность между генами тРНК<sup>Ile</sup> и тРНК<sup>Ala</sup> (139 п. н.), последовательность гена тРНК<sup>Ala</sup> (76 п. н.), последовательность между генами тРНК<sup>Ala</sup> и 23S рРНК (607 п. н.) и 5'-конец последовательности гена 23S рРНК (131 п. н.). Анализ последовательности маркера M-III использован в филогенетических исследованиях бактерий на внутривидовом уровне и далее обозначен как «филогенетический маркер».

Анализ белковых продуктов генов-маркеров M-I, M-II показал, что они относились к тем же СОG-группам (С, Е, G, Р, R), что и приведенные выше маркеры, с помощью которых определяли хромосомные типы у штаммов бактерий [4, 10, 11, 18–20].

**ПЦР-анализ** проводили с целью генотипирования штаммов. Рестрикционные профили ПЦР амплифицированных последовательностей (ПЦР-ПДРФ), полученные для каждого из изученных штаммов, рассматривали как ПДРФ-типы или аллели, согласно работам [42, 43]. ПЦР-анализ выполняли с применением соответствующих пар праймеров для указанных маркерных последовательностей: M-I (*betBC*) [44], M-II (*msfp*; MSFp-F: CACCAGCGAGAGGAAGAGAC, MSFp-R: GAAACCCCTGCGTTTGTGAT), M-III (ITS) [39]. ПЦР осуществляли в 20 мкл смеси для амплификации, содержащей 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 ед. акт. Taq ДНК-полимеразы (Евроген™ РК113L), при pH 9,1 в термоциклере C1000™ Thermal Cycler (BioRad, США). Температура отжига праймеров — 55 °C (30 циклов реакции). В качестве матрицы использовали общую ДНК штаммов, выделенную стандартным методом фенол-хлороформной экстракции из клеточных лизатов [45]. Продукты амплификации обрабатывали отдельно эндонуклеазами *MspI* и *HaeIII* в случае маркеров M-I и M-III и эндонуклеазой *EcoRI* в случае M-II (Thermo Fisher Scientific™ ER0541, ER0151 и ER0271 соответственно). Рестрикцию проводили в стандартных условиях согласно протоколам Thermo Fisher Scientific (температура — 37 °C, время — 2 ч). Электрофоретическое разделение полученных фрагментов выполняли в 3 % агарозном геле в 0,5 кратном буфере TAE.

В результате для каждого штамма были получены профили ПЦР-ПДРФ (далее ПДРФ-типы) для каждого из указанных маркеров. ПДРФ-типы, сходные с таковыми референс-штамма, обозначали как тип «а», тогда как отличные от них, то есть дивергентные, иными буквами латинского алфавита, например, тип «b» или «с» и т. д.

**Наличие ГО** определяли методом ПЦР с использованием оригинальных пар праймеров на внешние

пограничные участки [36]. ДНК штамма Rm1021, содержавшего три острова (Sme19T, Sme21T и Sme80S), и штамма СХМ1-105, в геноме которого нет островов, использовали в качестве контроля в экспериментах по выявлению ГО в геномах штаммов согласно работе [31].

**Статистическую обработку данных** осуществляли с помощью программного пакета PAST [46]; критерий  $\chi^2$  при  $\alpha = 0,05$  (df число степеней свободы), индекс гетерогенности Шеннона ( $H$ ) и индекс выравненности ( $E$ ). Индекс Нея вычисляли по формуле  $N = (1 - \sum(P_i^2)) \cdot (n/(n - 1))$ , где  $P_i$  — частота  $i$ -го генотипа,  $n$  — общее число выявленных генотипов [47]. Неравновесие по сцеплению (LD) рассчитывали с использованием программы Arlequin ver 3.5 (2010) [48].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проанализирована выборка из 218 природных штаммов *Sinorhizobium meliloti*, выделенных из географически изолированных районов (генцентры СКГ и ПАГ и агроценозы АЦ) и разных источников (К- и П-изоляты). Анализ выборок К-изолятов из СКГ и ПАГ продемонстрировал, что преимущественно со сходными частотами они имели R-фенотип (средняя частота — 0,68). R-фенотип был также присущ подавляющему большинству П-изолятов из СКГ и АЦ (частоты 0,80 и 0,91 соответственно), тогда как S-фенотип — для П-изолятов из ПАГ (частота 0,65). Между указанными группами П-изолятов различия были достоверны ( $\chi^2_{\text{ПАГ/СКГ}} = 15,6$ ;  $p = 7,7 \cdot 10^{-5}$ ; df = 1;  $\chi^2_{\text{ПАГ/АЦ}} = 20,2$ ;  $p = 7,0 \cdot 10^{-6}$ ; df = 1). Достоверные различия по встречаемости штаммов, контрастно различавшихся по фенотипу, показаны для групп К- и П-изолятов из ПАГ ( $\chi^2 = 5,15$ ;  $p = 2,3 \cdot 10^{-2}$ ; df = 1), но не выявлены для аналогичных групп из СКГ.

Согласно полученным данным было сформировано пять типических групп изолятов, различавшихся по районам (СКГ, ПАГ, АЦ) и источникам выделения (К и П), из которых каждая соответственно включала две подгруппы штаммов R- или S-фенотипа, то есть всего 10 подгрупп (рис. 2). Поскольку подгруппа П-изолятов S-фенотипа из АЦ была крайне малочисленной (три штамма; частота в группе 0,09; см. рис. 2), то ее не учитывали в сравнительном статистическом анализе.

**Полиморфизм последовательностей маркеров M-I и M-II** изучали в указанных выше типических группах и подгруппах природных штаммов *S. meliloti* (см. рис. 2). Были определены ПДРФ-типы последовательностей маркеров M-I и M-II, сходные с таковыми у референс-штамма (далее референс-тип или аллель «а»), а также отличные от них (далее дивергентные типы или аллели). В случае маркера M-I выявлено пять, а в случае M-II — четыре дивергентные аллели, то есть соответствующие маркерные последовательности имели структурные изменения относительно референса. Значения индексов

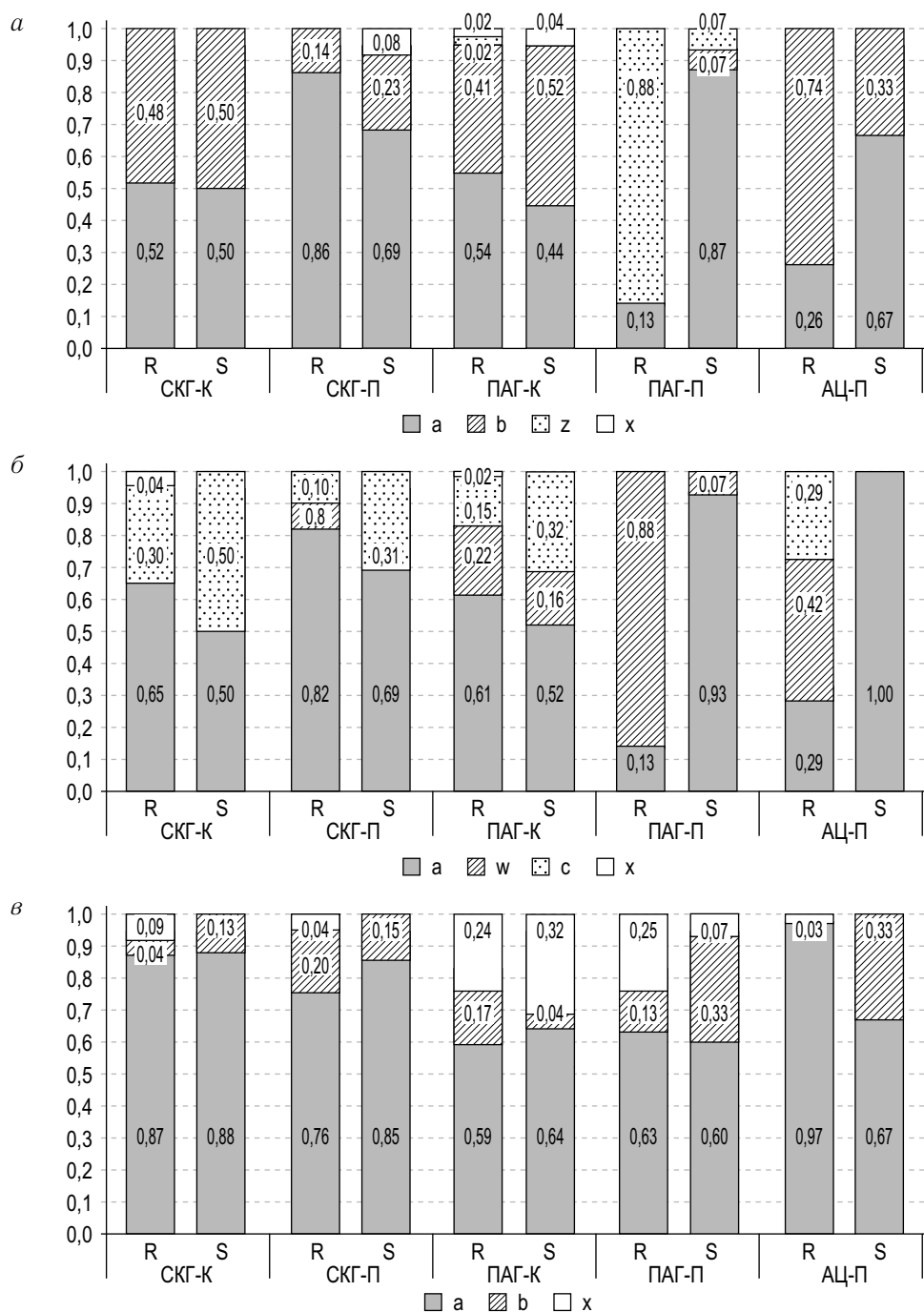


Рис. 2. Встречаемость ПДРФ-типов маркеров М-I (а), М-II (б) и М-III (в) у штаммов *S. meliloti*: а, б, с, w, z — ПДРФ-типы, х — группа, объединяющая уникальные дивергентные ПДРФ-типы; R — штаммы солеустойчивого фенотипа; S — штаммы солечувствительного фенотипа; К — штаммы, выделенные из клубеньков; П — штаммы, выделенные из почв; СКГ — Кавказский генцентр; ПАГ — Приаральский центр разнообразия люцерн; АЦ — агроценозы

гетерогенности рассчитывали исходя из встречаемости референс- и дивергентных аллелей маркеров М-I и М-II, которые составили для изучаемой выборки штаммов 0,89 и 0,97 соответственно.

Референс-аллели маркеров М-I и М-II встречались чаще в обеих подгруппах П-изолятов из СКГ и в подгруппе солечувствительных П-изолятов из ПАГ

(см. рис. 2, а, б). В указанных подгруппах штаммов частоты встречаемости этих аллелей по каждому маркеру были сходными или равными: 0,84; 0,69 и 0,9 соответственно (см. рис. 2, а, б). Однако в двух случаях — у солеустойчивых П-изолятов из ПАГ и АЦ — частоты встречаемости референс-аллелей М-I или М-II были низкими, при этом равными или сходными (0,13

и 0,27 соответственно; см. рис. 2, а, б). Достоверные различия выявлены между подгруппами П-изолятов из ПАГ ( $\chi^2 = 12,0$ ;  $p = 5,2 \cdot 10^{-4}$ ;  $df = 1$  и  $\chi^2 = 15,0$ ;  $p = 1,1 \cdot 10^{-4}$ ;  $df = 1$  соответственно для М-I и М-II). Анализ групп К-изолятов показал, что референс-аллель М-I встречалась со сходными частотами в обеих подгруппах штаммов из СКГ и в подгруппе солеустойчивых К-изолятов из ПАГ (средняя частота — 0,52), тогда как в подгруппе солечувствительных штаммов эту же аллель идентифицировали реже (0,44; см. рис. 2, а). Интересно, что референс-аллель М-II чаще выявляли у солеустойчивых, чем у солечувствительных, К-изолятов как в случае СКГ, так и в случае ПАГ (в 1,3 и 1,3 раза соответственно), однако различия не достоверны (см. рис. 2, б). В результате сравнительного анализа групп К- и П-изолятов было установлено, что референс-аллели М-I и М-II достоверно чаще встречались у П-изолятов СКГ (имевших преимущественно солеустойчивый фенотип) и К-изолятов ПАГ ( $\chi^2 = 25,3$ ;  $p = 4,8 \cdot 10^{-7}$ ;  $df = 1$ ;  $\chi^2 = 24,1$ ;  $p = 9,2 \cdot 10^{-7}$ ;  $df = 1$  соответственно).

Дивергентные аллели «b» М-I и «с» М-II выявлены почти во всех подгруппах штаммов, за неполным исключением П-изолятов из ПАГ (см. рис. 2, а, б). В случае П-изолятов из СКГ обе аллели встречались более чем у четверти штаммов солечувствительного фенотипа, тогда как у солеустойчивых изолятов в 2–3 раза реже (см. рис. 2, а, б). Интересно, что аллель «b» М-I была доминирующей у солеустойчивых П-изолятов из АЦ (частота — 0,74), тогда как аллель «с» М-II встречалась вдвое реже (см. рис. 2, а, б). Обе дивергентные аллели также идентифицированы у К-изолятов из ПАГ и СКГ, причем частоты встречаемости были сопоставимы с таковыми для соответствующих референс-аллелей ( $\chi^2 = 0,68$ ;  $p = 0,9$ ;  $df = 3$ ). Кроме того, аллель «с» М-II идентифицировали чаще в подгруппах К-изолятов солечувствительного фенотипа в СКГ, а также в ПАГ, различия не достоверны ( $p > 0,5$ ; см. рис. 2, а, б). Однако в группах К-изолятов из СКГ и ПАГ аллели «b» М-I и «с» М-II встречались достоверно чаще, чем в соответствующих группах П-изолятов ( $\chi^2 = 12,2$ ;  $p = 6,9 \cdot 10^{-3}$ ;  $df = 3$ ;  $\chi^2 = 8,7$ ;  $p = 3,3 \cdot 10^{-2}$ ;  $df = 3$  соответственно).

Следует также рассмотреть распространенность дивергентных аллелей «z» М-I и «w» М-II, из которых первая встречалась у единичных К- и П-изолятов ПАГ, а вторая — у единичных солеустойчивых и солечувствительных П-изолятов СКГ и ПАГ соответственно. Исключение составили обе подгруппы К-изолятов (средняя частота — 0,19) и подгруппа солеустойчивых П-изолятов из ПАГ. В последнем случае обе аллели встречались у подавляющего числа штаммов (частота — 0,88; см. рис. 2, а, б).

Помимо рассмотренных четырех типов дивергентных аллелей маркеров М-I и М-II идентифицированы уни-

кальные дивергентные аллели у единичных штаммов, которые были объединены в группы «х» (см. рис. 2, а, б). Указанные штаммы, имевшие уникальные типы маркера М-I, обнаружены в обеих подгруппах К-изолятов ПАГ, а также у солечувствительных П-изолятов СКГ. Уникальные типы маркера М-II встречались только в подгруппах солеустойчивых К-изолятов ПАГ и СКГ. Значения  $\chi^2$  для всех групп штаммов по рассмотренным аллелям маркеров М-I и М-II приведены в Приложении, табл. 1.

Таким образом, анализ маркерных последовательностей М-I и М-II, содержащих гены, продукты которых вовлечены в процессы метаболизма и в формирование стрессоустойчивости (в частности, устойчивость к условиям засоления), продемонстрировал, что почвенные изоляты из разных географических районов наследовали преимущественно аллели, сходные с референсом. Исключение составили две подгруппы: П-изоляты солеустойчивого фенотипа из ПАГ и АЦ, у которых со сходными частотами доминировали дивергентные аллели маркера М-I, а также М-II. Группы К-изолятов из СКГ и ПАГ были существенно разнообразнее, чем П-изоляты, вследствие того что частоты встречаемости дивергентных аллелей М-I и М-II были выше и сопоставимы с таковыми для соответствующих референс-аллелей. Полученные данные позволили заключить, что увеличение генотипического разнообразия (диверсификация) штаммов, выделенных из почв (метод трэппинга, см. «Материалы и методы»), происходит в генцентрах и агроценозах, по-видимому, под влиянием дивергентного частотозависимого отбора, а генотипическое разнообразие штаммов, выделенных из клубеньков, — под действием стабилизирующего частотозависимого отбора, что согласуется с работами [49, 50]. Кроме того, среди П-изолятов солеустойчивого фенотипа из ПАГ и АЦ доминируют штаммы с измененными метаболическими маркерами по отношению к референсу, которые могут относиться к клональным линиям.

**Полиморфизм маркерной последовательности М-III.** Референс-штамм Rm1021 содержит три идентичные ITS-последовательности согласно GenBank NC\_003047.1, которые имеют один ПДФ-профиль, далее тип «а» маркера М-III (см. «Материалы и методы»; рис. 1). В результате анализа таковых последовательностей у природных штаммов идентифицировано, помимо референс-типа «а», 16 дивергентных типов маркера М-III, что указывало на структурные различия соответствующих ITS-последовательностей в рибосомальных оперонах изолятов согласно работе [39]. Определен индекс гетерогенности для всей выборки из 218 штаммов по маркеру М-III ( $H = 1,38$ ), значение которого было существенно выше таковых для рассмотренных выше маркеров М-I и М-II (0,89 и 0,97). Анализ штаммов из СКГ и ПАГ показал, что значение индекса гетерогенности для последнего в 2,4 раза выше (1,51 и 0,63 со-

ответственно). Кроме того, значения *H* были сходными в случае групп К- и П-изолятов из СКГ (0,52 и 0,62 соответственно), но были в 1,5 раза выше для К-, чем для П-изолятов из ПАГ (1,55 и 1,06 соответственно). Приведенные значения индекса *H* позволяют предположить, что популяция штаммов из ПАГ более разнообразна по филогенетическому маркеру и в ней могут происходить процессы, направленные на обособление новых биоваров клубеньковых бактерий люцерны.

Тип «а» М-III был доминирующим/преобладающим во всех подгруппах штаммов, но встречался достоверно чаще (в среднем в 1,4 раза) в популяции СКГ, чем в ПАГ ( $\chi^2 = 27,2; p = 5,5 \cdot 10^{-6}; df = 3$ ), и преимущественно у ризобий солеустойчивого фенотипа. Вместе с тем между подгруппами К- и П-изолятов из изучаемых генцентров достоверных различий не установлено ( $p > 0,05$ ; см. рис. 2, в). Референс-тип был доминирующим у П-изолятов из АЦ (частота — 0,97; см. рис. 2, в).

Дивергентный тип «b» маркера М-III был вторым по частоте встречаемости во всех подгруппах штаммов, за неполным исключением П-изолятов из АЦ, у которых он выявлен только в случае единичного солечувствительного штамма. У штаммов из СКГ тип «b» М-III встречался со сходными частотами у солечувствительных К- и П-изолятов (средняя частота — 0,14), но в 1,4 раза чаще у солеустойчивых П-изолятов и крайне редко у К-изолятов этого же фенотипа (см. рис. 2, в). У штаммов из ПАГ указанный тип преимущественно выявлен у К-изолятов R-фенотипа (частота — 0,17) и только у единичных штаммов S-фенотипа (см. рис. 2, в). С наибольшей частотой тип «b» маркера М-III идентифицирован у солечувствительных П-изолятов из ПАГ (частота — 0,33), тогда как у солеустойчивых штаммов он встречался в 2,5 раза реже (см. рис. 2, в). Географически изолированными популяциями штаммов из рассматриваемых генцентров достоверно различались по встречаемости типовых и дивергентных последовательностей маркера М-III ( $\chi^2 = 15,4; p = 4,5 \cdot 10^{-4}; df = 2$ ).

Остальные 15 дивергентных типов являлись уникальными и были идентифицированы у одного-трех штаммов. Подавляющее большинство уникальных типов (13 из 15) отмечено в подгруппе К-изолятов и в подгруппе солеустойчивых П-изолятов из ПАГ (средняя частота — 0,27; см. рис. 2, в). Штаммы, имевшие указанные уникальные типы маркера М-III, были объединены в соответствующие группы «х» (см. рис. 2, в), которые далее не рассматривали.

Таким образом, установлено преобладание дивергентных последовательностей маркера М-III у штаммов из ПАГ по сравнению со штаммами из других генцентров, а также из агроценозов. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными нами данными [39, 51, 52] и свидетельствуют о том, что в популяции ризобий, адаптированных к условиям экстремального засоления, активно происходят процессы диверсификации штаммов, возможно направленные на формирование нового биовара клубеньковых бактерий люцерны.

**Анализ сочетаний хромосомных маркерных последовательностей.** Попарный анализ сочетаний референс- и дивергентных последовательностей маркеров М-I, М-II и М-III был проведен с целью выявления неравновесия по сцеплению (Linkage disequilibrium, LD). В результате таковое было определено между маркерами М-I и М-II во всех изучаемых группах штаммов (LD от 0,38 до 0,83; см. табл. 1), но не выявлено между маркером М-III и маркерами М-I и М-II и их сочетанием М-I/М-II во всех рассматриваемых группах (данные не приведены). Таким образом, рассматриваемые маркеры можно использовать для оценки разнообразия хромосомных типов, а кроме того, их можно учитывать как единый метаболический маркер (М-I/М-II), тогда как филогенетический маркер М-III следует рассматривать независимо.

Всего при анализе 218 штаммов обнаружено 35 из 510 теоретически возможных сочетаний маркеров М-III и М-I/М-II (Приложение, табл. 2). Восемь сочетаний встречались у штаммов из обеих географически

Таблица 1

**Неравновесие по сцеплению (LD) между маркерами М-I и М-II**

LD		М-II				
		СКГ-К	СКГ-П	ПАГ-К	ПАГ-П	АЦ-П
М-I	СКГ-К	0,674				
	СКГ-П		0,639			
	ПАГ-К			0,376		
	ПАГ-П				0,830	
	АЦ-П					0,764

*Примечание.* К — штаммы, выделенные из клубеньков; П — штаммы, выделенные из почв; СКГ — Кавказский генцентр; ПАГ — Приаральский центр разнообразия люцерн.

изолированных популяций (СКГ и ПАГ), из них четыре — в группе штаммов из АЦ (данные не представлены), а пятнадцать — являлись уникальными, идентифицированными только у солеустойчивых К-изолятов из ПАГ (Приложение, см. табл. 2).

Разнообразие подгрупп штаммов оценивали согласно значениям индекса разнообразия Шеннона, рассчитанного по числу определенных сочетаний. Установлено, что К-изоляты из ПАГ были значительно разнообразнее, чем аналогичные группы штаммов из СКГ, тогда как для подгрупп П-изолятов из СКГ, ПАГ и АЦ такие различия отсутствовали (Приложение, см. табл. 2).

Проведена группировка 35 сочетаний маркерных последовательностей с учетом наличия референс- (А) и дивергентных (В) последовательностей филогенетического маркера М-III, а также референс- (I) и дивергентных аллелей (II) метаболического маркера. В результате были сформированы четыре контрастно различающиеся группы, которые рассматривали далее как хромосомные типы AI, AII, BI и BII. Тип AI (референс-тип) представлен одним сочетанием последовательностей «а» типа ( $H_{AI} = 0$ ), тогда как типы AII, BI и BII включали 8, 11 и 15 разных сочетаний соответственно ( $H_{AII} = 1,48$ ;  $H_{BI} = 1,37$ ;  $H_{BII} = 2,58$ ). Следует указать, что в типе AII с наибольшими частотами были представлены 2 из 8 сочетаний (частоты — 0,29 и 0,44), в типе BI — 1 из 11 (частота — 0,67), а в типе BII — 13 из 15 сочетаний (идентифицированы у единичных штаммов; суммарная частота — 0,87; данные не представлены).

Тип AI наблюдали преимущественно у солеустойчивых К- и П-изолятов из СКГ, при этом у последних в 1,2 раза чаще (средняя частота — 0,43; рис. 3). В выборке ПАГ этот же хромосомный тип был выяв-

лен со сходной частотой только у солеустойчивых П-изолятов (0,35) и не обнаружен у штаммов солеустойчивого фенотипа (см. рис. 3). В подгруппе П-изолятов из АЦ тип AI идентифицировали у единичных штаммов R-фенотипа (0,24; см. рис. 3). В остальных подгруппах (солеустойчивые К- и П-изоляты из СКГ и К-изоляты из ПАГ) тип AI был выявлен со сходно низкими частотами (среднее значение — 0,10). Таким образом, хромосомный тип AI достоверно чаще идентифицировали у П-изолятов из СКГ ( $\chi^2 = 6,9$ ;  $p = 8,5 \cdot 10^{-3}$ ;  $df = 1$ ), имевших преимущественно солеустойчивый фенотип. Сравнение групп штаммов показало, что хромосомный тип AI встречался в 2,5 и 1,7 раза чаще у К-, чем у П-изолятов, из СКГ и ПАГ соответственно.

Тип AII (типичная последовательность М-III и дивергентные аллели М-I/М-II) выявлен у штаммов из всех рассматриваемых подгрупп. В трех подгруппах К- и П-изолятов разного фенотипа из ПАГ (средняя частота — 0,21), а также у солеустойчивых К-изолятов из СКГ (частота — 0,26) данный хромосомный тип встречался с близкими частотами (см. рис. 3). В остальных случаях хромосомный тип AII выявляли либо вдвое реже (подгруппы К- и П-изолятов разного фенотипа из СКГ), либо у единичных солеустойчивых П-изолятов обоих генцентров (см. рис. 3). По результатам сравнения групп К- и П-изолятов из СКГ и ПАГ установлено, что хромосомный тип AII почти в 2 раза чаще встречался у К-изолятов, чем у соответствующих групп П-изолятов, как в том, так и в другом генцентре, однако достоверные различия получены только для К-изолятов из ПАГ ( $\chi^2 = 7,4$ ;  $p = 6,6 \cdot 10^{-3}$ ;  $df = 1$ ). Хромосомный тип AII доминировал только у солеустойчивых П-изолятов из АЦ (частота — 0,65; см. рис. 3).

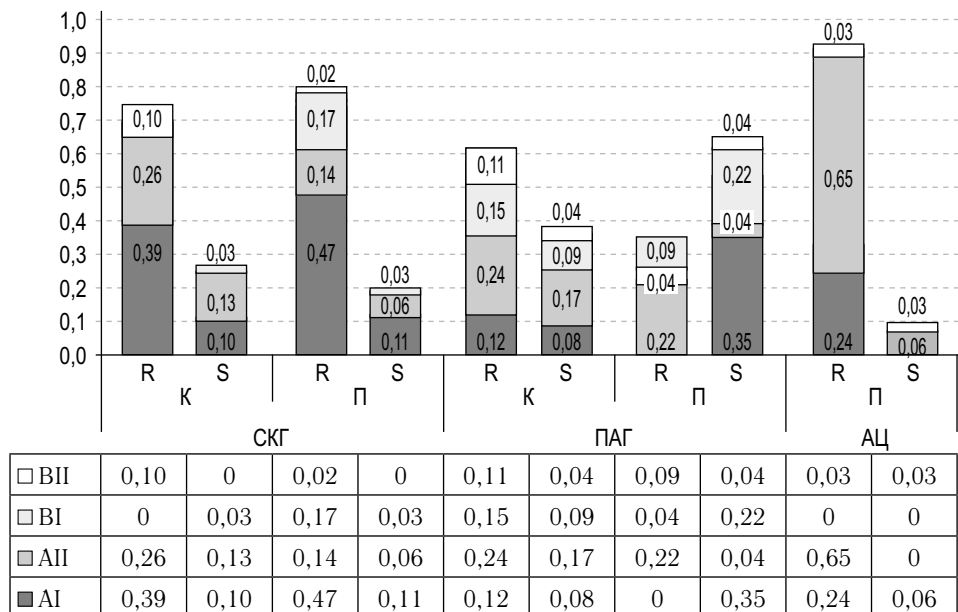


Рис. 3. Встречаемость разных хромосомных типов у штаммов *S. meliloti*. AI, AII, BI, BII — хромосомные типы (см. текст); остальные обозначения — см. рис. 2



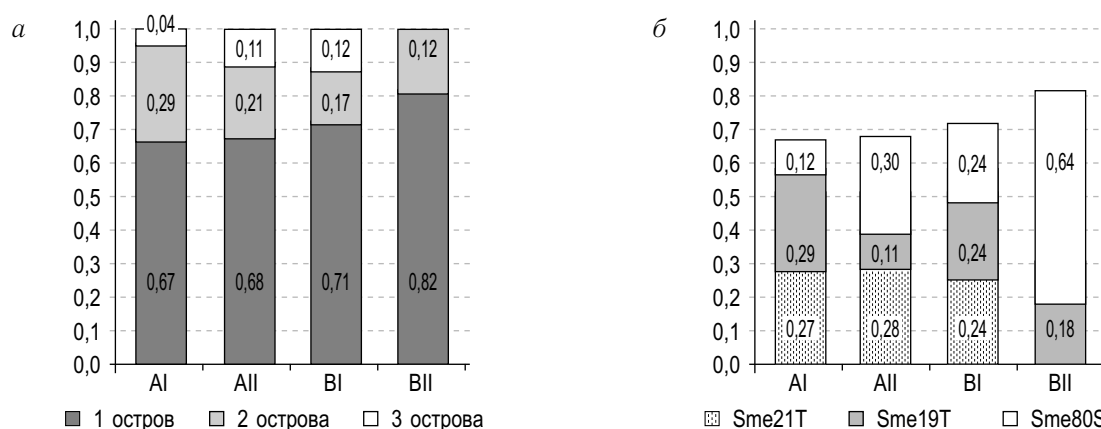


Рис. 4. Встречаемость геномных островов в разных хромосомных типах *S. meliloti*: а — частота встречаемости одного, двух или трех островов в соответствующих хромосомных типах; б — частота встречаемости каждого из островов: Sme19T, Sme21T, Sme80S в соответствующих хромосомных типах; AI, AII, BI, BII — хромосомные типы (см. рис. 3)

Тип BI (дивергентные последовательности M-III и типовые аллели M-I/M-II) встречался существенно реже в изучаемых подгруппах штаммов, чем вышерассмотренный тип AII. Указанный тип преимущественно обнаружен в трех подгруппах (со сходными частотами): П-изоляты солеустойчивого фенотипа из СКГ и солеустойчивого из ПАГ, а также у солеустойчивых К-изолятов ПАГ (средняя частота — 0,18; см. рис. 3). Реже этот же хромосомный тип был идентифицирован у солеустойчивых К-изолятов из ПАГ (0,09; см. рис. 3). В остальных подгруппах указанный тип встречался у единичных штаммов (средняя частота — 0,03) либо не был выявлен (см. рис. 3). Сравнение групп штаммов показало, что тип BI достоверно чаще отмечен у К-изолятов из ПАГ и П-изолятов из СКГ, имевших солеустойчивый фенотип ( $\chi^2 = 8,1$ ;  $p = 4,3 \cdot 10^{-3}$ ;  $df = 1$ ).

Тип BII (дивергентные последовательности M-III и аллели M-I/M-II) идентифицирован у немногочисленных штаммов 8 из 10 изучаемых подгрупп (см. рис. 3). Чаще со сходными частотами указанный хромосомный тип встречался в трех подгруппах солеустойчивых К- и П-изолятов из ПАГ и К-изолятов из СКГ (средняя частота — 0,1;  $p > 0,5$ ). Анализ групп штаммов показал, что тип BII наблюдали преимущественно у К-изолятов из ПАГ ( $p > 0,5$ ).

Сравнительный анализ выборок штаммов из двух генцентров позволил установить, что хромосомный тип AI встречался более чем у 54 % штаммов *S. meliloti* из СКГ, то есть в 2,4 раза чаще, чем из ПАГ ( $\chi^2 = 18,6$ ;  $p = 1,6 \cdot 10^{-5}$ ;  $df = 1$ ). Преимущественно он был выявлен в подгруппе солеустойчивых П-изолятов из СКГ, в которой также отмечались штаммы, имевшие хромосомный тип BI, характеризовавшийся измененной последовательностью маркера M-III. В популяции штаммов *S. meliloti* из ПАГ, наоборот, более 76 % штаммов имели хромосомные типы, отличные

от типа AI. Так, хромосомный тип AII выявлен в 1,4, тип BI — в 1,7, а тип BII — в 3,8 раза чаще у штаммов из ПАГ, чем из СКГ. Подавляющее большинство К-изолятов (65 %) из ПАГ имели хромосомный тип AII или BI, а 15 % штаммов солеустойчивого фенотипа — хромосомный тип BII. Описанные различия по встречаемости хромосомных типов между географически изолированными популяциями ПАГ и СКГ достоверны ( $\chi^2 = 20,6$ ;  $p = 1,2 \cdot 10^{-4}$ ;  $df = 3$ ). Штаммы из АЦ имели преимущественно хромосомный тип AII, характеризовавшийся измененными метаболическими маркерами.

**Встречаемость ГО** оценивали в группах штаммов *S. meliloti* с определенным хромосомным типом (AI, AII, BI или BII; рис. 4). Анализировали наличие трех ГО (как у референс-штамма Rm1021, см. «Материалы и методы»), а также возможное наличие двух или одного из трех ГО, сайты интеграции которых сходны с таковыми у Rm1021. Три ГО встречались крайне редко у штаммов, имевших хромосомный тип AI (частота — 0,04), но с более высокими частотами выявлены в случае хромосомных типов AII и BI (средняя частота — 0,11; см. рис. 4, а), а в случае типа BII — рассматриваемый вариант не обнаружен. Два ГО выявляли чаще (в среднем в 1,5 раза) у штаммов с хромосомным типом AI (средняя частота — 0,29; см. рис. 4, а). Один ГО встречался у подавляющего большинства штаммов (средняя частота — 0,72), но чаще, в 1,2 раза, у штаммов, имевших хромосомный тип BII (частота — 0,82; см. рис. 4, а).

Рассматривали встречаемость каждого из ГО Rm1021 (Sme19T, Sme21T и Sme80S) у штаммов, имевших определенные хромосомные типы (см. рис. 4, б). Показано, что Sme19T и Sme80S достоверно чаще встречались у штаммов с хромосомными типами AI и AII соответственно ( $\chi^2 = 7,4$ ;  $p = 2,4 \cdot 10^{-3}$ ;  $df = 2$ ; см. рис. 4, б), а Sme80S — преимущественно у штаммов с типом BII ( $\chi^2 = 7,6$ ;  $p = 5,9 \cdot 10^{-3}$ ;  $df = 2$ ).

Интересно, что любой из трех указанных островов встречался у штаммов с хромосомным типом VI с равными частотами (0,23; см. рис. 4, б).

Таким образом, выявлены достоверные различия по встречаемости ГО, относящихся к аксессуарным элементам корового генома, у природных штаммов *S. meliloti* с разными хромосомными типами. Полученные результаты согласуются с данными для других видов клубеньковых бактерий и энтеробактерий [9, 26] и свидетельствуют в пользу того, что определенные аксессуарные элементы могут быть ассоциированы с определенными сочетаниями коровых последовательностей.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сопряженный анализ маркерных последовательностей корового генома M-I и M-II, содержащих гены, продукты которых задействованы в клеточном метаболизме и вовлечены в процессы формирования стрессоустойчивости, а также последовательностей маркера M-III, используемых в филогенетических исследованиях на уровне вида, позволил оценить влияние экологических и эволюционных факторов на генетическое разнообразие природных штаммов клубеньковых бактерий *S. meliloti* в географически изолированных популяциях и в агроценозах. Выявлен высокий уровень полиморфизма метаболических (M-I, M-II) и филогенетического (M-III) маркеров в типических группах/подгруппах штаммов, различавшихся по району и источнику выделения, а также по фенотипу. По результатам анализа частот встречаемости разных аллелей маркеров M-I и M-II удалось заключить, что генотипическое разнообразие штаммов, выделенных из почв (П-изоляты), находится под давлением друптивного частотозависимого отбора, приводящего к преобладанию определенного генотипа, наиболее приспособленного к агроэкологическим условиям соответствующих генцентров. Высокое генотипическое разнообразие штаммов, выделенных из клубеньков растений (К-изоляты), произраставших в тех же генцентрах, обусловлено действием стабилизирующего частотозависимого отбора, что согласуется с работами других авторов [49, 50].

Оценка неравновесия по сцеплению (LD) маркерных последовательностей показала, что между метаболическими маркерами отсутствует или имеется низкий уровень генетической рекомбинации, на основании чего и согласно работе [10] они были использованы для определения сочетаний маркеров у 218 природных штаммов *S. meliloti*, сгруппированных далее в четыре хромосомных типа, различавшихся по наличию референс- и дивергентных последовательностей. Обнаружено, что географически изолированные популяции *S. meliloti* достоверно различались по встречаемости хромосомных типов, что согласуется с данными, полу-

ченными для других видов ризобий [9, 11, 53]. В популяции каждого из рассмотренных генцентров (СКГ и ПАГ) выявлены штаммы с измененными метаболическими маркерами (хромосомный тип АП), доля которых среди К-изолятов была почти в 2 раза выше, чем среди П-изолятов, в обоих генцентрах. Следует отметить, что штаммы с этим же хромосомным типом были выделены преимущественно из почв АЦ. Штаммы, имевшие измененные метаболические маркеры корового генома, могут относиться к дивергентным клональным линиям(ии), что согласуется с полученными ранее данными о наличии дивергентного хромосомного типа в популяции штаммов из ПАГ [39, 40, 51], тогда как для популяции из СКГ и штаммов из АЦ данные о наличии клональных линий получены впервые.

В центре интрагрессивной гибридизации люцерны в Приаралье (ПАГ), подверженном экстремальному засолению, около 40 % как К-, так и П-изолятов имели измененные филогенетический и в подавляющем большинстве метаболические маркеры (хромосомные типы В-I и В-II). Такие штаммы могут являться представителями нового биовара, что согласуется с ранее опубликованными данными [39]. Кроме того, штаммы, относящиеся к этому же или родственному биовару, впервые выявлены в СКГ, при этом они встречались исключительно среди П-изолятов и вдвое реже, чем у аналогичных изолятов из ПАГ. Клональные линии штаммов, обнаруженные в обеих географически изолированных популяциях клубеньковых бактерий, а также в агроценозах, и штаммы, относящиеся, возможно, к формирующемуся новому биовару клубеньковых бактерий люцерны, представляют объект дальнейших молекулярно-генетических исследований.

С целью выявления зависимости встречаемости аксессуарных элементов от характеристик корового генома были проанализированы ГО в геномах штаммов *S. meliloti*, различавшихся по сочетаниям последовательностей маркеров корового генома. Это позволило впервые установить предпочтительность встречаемости того или иного геномного острова в определенных хромосомных типах *S. meliloti*. Полученные данные свидетельствуют в пользу гипотезы, высказанной авторами [26], о том, что разные хромосомные типы могут содержать разные аксессуарные элементы.

### Дополнительная информация

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ при финансовой поддержке грантов РФФИ № 18-04-01278а (оценка структурного полиморфизма маркера M-II) и РНФ № 17-16-01095.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1

Значения критерия  $\chi^2$  для подгрупп штаммов *S. meliloti*, различающихся по частотам встречаемости ПДРФ-типов маркерных последовательностей

Маркер	Группы штаммов		Значения критерия $\chi^2$									
			СКГ				ПАГ				АЦ	
			К		П		К		П		П	
			R	S	R	S	R	S	R	S	R	
М-I	СКГ	К	R	— <sup>1</sup>	10,0 (1) <sup>II</sup>	—	—	—	26,2 (2)	8,0 (2)	3,9 (1)	
			S	—	6,0 (1)	—	—	—	12,8 (2)	—	—	
		П	R	10,0 (1)	6,0 (1)	—	—	12,6 (3)	15,5 (2)	50,7 (2)	—	30,4 (1)
			S	—	—	—	—	—	—	17,2 (3)	—	10,9 (2)
	ПАГ	К	R	—	—	12,6 (3)	—	—	—	35,6 (3)	—	8,2 (3)
			S	—	—	15,5 (2)	—	—	—	28,0 (3)	10,6 (3)	—
		П	R	26,2 (2)	12,8 (2)	50,7 (2)	17,2 (3)	35,6 (3)	28,0 (3)	—	15,0 (2)	33,5 (2)
			S	8,0 (2)	—	—	—	—	10,6 (3)	15,0	—	19,1 (2)
	АЦ	П	R	3,9 (1)	—	30,4 (1)	10,9 (2)	8,2 (3)	—	33,5	19,1 (2)	—
	М-II	СКГ	К	R	—	8,8 (3)	—	—	—	26,1 (3)	—	14,9 (3)
S				—	—	8,9 (2)	—	—	—	12,8 (2)	9,3 (2)	—
П			R	8,8 (3)	8,9 (2)	—	—	—	8,0 (2)	28,9 (2)	—	23,8 (2)
			S	—	—	—	—	—	—	17,2 (2)	—	9,1 (2)
ПАГ		К	R	—	—	—	—	—	—	13,1 (3)	—	8,6 (3)
			S	—	—	8,0 (2)	—	—	—	14,1 (2)	7,8 (2)	—
		П	R	26,1 (3)	12,8 (2)	28,9 (2)	17,2 (2)	13,1 (3)	14,1 (2)	—	15,0 (1)	—
			S	—	9,3 (2)	—	—	—	7,8 (2)	15,0 (1)	—	16,8 (2)
АЦ		П	R	14,9 (3)	—	23,8 (2)	9,1 (2)	8,6 (3)	—	—	16,8 (2)	—
М-III		СКГ	К	R	—	—	—	—	—	—	—	—
	S			—	—	—	—	—	—	—	—	
	П		R	—	—	—	—	8,4 (2)	13,2 (2)	—	—	7,0 (2)
			S	—	—	—	—	—	6,1 (2)	—	—	—
	ПАГ	К	R	—	—	8,4 (2)	—	—	—	—	—	13,9 (2)
			S	—	—	13,2 (2)	6,1 (2)	—	—	—	8,1 (2)	10,2 (2)
		П	R	—	—	—	—	—	—	—	—	8,6 (2)
			S	—	—	—	—	—	8,1 (2)	—	—	12,2 (2)
	АЦ	П	R	—	—	7,0 (2)	—	13,9 (2)	10,2 (2)	8,6 (2)	12,2 (2)	—

Примечание. R — штаммы солеустойчивого фенотипа; S — штаммы солечувствительного фенотипа; К — штаммы, выделенные из клубеньков; П — штаммы, выделенные из почв; СКГ — Кавказский генцентр; ПАГ — Приаральский центр разнообразия люцерн; АЦ — агроценозы. <sup>1</sup> значение  $\chi^2$  — меньше критического (различия не достоверны); (...) <sup>II</sup> число степеней свободы (df).

Таблица 2

Число выявленных сочетаний маркерных последовательностей М-I, М-II и М-III в исследуемых подгруппах и группах штаммов *S. meliloti*

Район		СКГ				ПАГ				АЦ		Всего штаммов	
Группа		К		П		К		П		П			
Подгруппа		R	S	R	S	R	S	R	S	R	S		
Статистические характеристики	под-групп	Всего сочетаний	6	3	9	4	20	11	4	5	4	2	35
		Уникальные сочетания	4	1	6	1	15	6	2	3	3	2	
		Индекс Нея ( <i>N</i> )	0,76	0,86	0,68	0,84	0,95	0,94	0,75	0,79	0,90	—	
		Индекс Шеннона ( <i>H</i> )	1,28	0,96	1,34	1,16	2,67	2,13	1,07	1,23	1,18	—	
		Индекс выравненности ( <i>E</i> )	0,60	0,87	0,43	0,80	0,72	0,77	0,73	0,68	0,82	—	
		Всего штаммов	24	7	51	13	41	25	8	15	31	3	218
	групп	Всего сочетаний	7		10		26		7		5		35
		Уникальные сочетания	3		6		23		4		0		
		Индекс Нея ( <i>N</i> )	0,76		0,69		0,94		0,88		0,87		
		Индекс Шеннона ( <i>H</i> )	1,34		1,37		2,74		1,60		1,29		
		Индекс выравненности ( <i>E</i> )	0,54		0,39		0,59		0,70		0,72		
		Число штаммов	31		64		66		23		34		218

Примечание. R — штаммы солеустойчивого фенотипа; S — штаммы солечувствительного фенотипа; К — штаммы, выделенные из клубеньков; П — штаммы, выделенные из почв; СКГ — Кавказский генцентр; ПАГ — Приаральский центр разнообразия люцерн; АЦ — агроценозы.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Young JP, Crossman LC, Johnston AW, et al. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol.* 2006;7(4):R34. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-4-r34>.
- Шестаков С.В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий // Экологическая генетика. — 2007. — Т. 5. — № 2. — С. 12–24. [Shestakov SV. How does the horizontal gene transfer in bacteria occur and than is it tied up. *Ecological genetics.* 2007;5(2):12-24. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/ecogen5212-24>.
- Равин Н.В., Шестаков С.В. Геном прокариот // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2013. — Т. 17. — № 4–2. — С. 972–984. [Ravin NV, Shestakov SV. The genome of prokaryotes. *Vavilov journal of genetics and breeding.* 2013;17(4-2):972-984. (In Russ.)]
- Mauchline TH, Hayat R, Roberts R, et al. Assessment of core and accessory genetic variation in *Rhizobium leguminosarum symbiovar trifolii* strains from diverse locations and host plants using PCR-based methods. *Lett Appl Microbiol.* 2014;59(2):238-246. <https://doi.org/10.1111/lam.12270>.

5. Тихонович И.А., Андронов Е.Е., Борисов А.Ю., и др. Принцип дополнительности геномов в расширении адаптационного потенциала растений // Генетика. — 2015. — Т. 51. — № 9. — С. 973–990. [Tikhonovich IA, Andronov EE, Borisov AY, et al. The principle of genome complementarity in the enhancement of plant adaptive capacities. *Russian Journal of Genetics*. 2015;51(9):831-846. (In Russ.).] <https://doi.org/10.7868/S001667581509012X>.
6. Chidebe IN, Jaiswal SK, Dakora FD. Distribution and phylogeny of microsymbionts associated with cowpea (*Vigna unguiculata*) nodulation in three agroecological regions of Mozambique. *Appl Environ Microbiol*. 2018;84(2). pii:e01712-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01712-17>.
7. Jiao J, Ni M, Zhang B, et al. Coordinated regulation of core and accessory genes in the multipartite genome of *Sinorhizobium fredii*. *PLoS Genet*. 2018;14(5):e1007428. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007428>.
8. Boussau B, Karlberg EO, Frank AC, et al. Computational inference of scenarios for alpha-proteobacterial genome evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(26):9722-9727. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400975101>.
9. Wang X, Liu D, Luo Y, et al. Comparative analysis of Rhizobial chromosomes and plasmids to estimate their evolutionary relationships. *Plasmid*. 2018;96-97:13-24. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.03.001>.
10. Young JP, Wexler M. Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol*. 1988;134:2731-9. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-10-2731>.
11. Stefan A, van Cauwenberghhe J, Rosu CM, et al. Genetic diversity and structure of *Rhizobium leguminosarum* populations associated with clover plants are influenced by local environmental variables. *Syst Appl Microbiol*. 2018;41(3):251-259. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.01.007>.
12. Van Berkum P, Badri Y, Elia P, et al. Chromosomal and symbiotic relationships of rhizobia nodulating *Medicago truncatula* and *M. laciniata*. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(23):7597-7604. <https://doi.org/10.1128/AEM.01046-07>.
13. Проворов Н.А., Андронов Е.Е., Онищук О.П., и др. Генетическая структура интродуцированных и местных популяций *Rhizobium leguminosarum* в системах «растения–почва» // Микробиология. — 2012. — Т. 81. — № 2. — С. 244–253. [Provorov NA, Andronov EE, Onishchuk OP, et al. Genetic structure of the introduced and local populations of *Rhizobium leguminosarum* in plant-soil systems. *Microbiology*. 2012;81(2):224-232. (In Russ.)]
14. Laguerre G, Mavingui P, Allard M-R, et al. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62(6):2029-2036.
15. Guo XW, Zhang XX, Zhang ZM, Li FD. Characterization of *Astragalus sinicus* rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and nodulation genes regions. *Curr Microbiol*. 1999;39(6):358-364. <https://doi.org/10.1007/s002849900472>.
16. Efose RC, Rosu CM, Stedel C, et al. Molecular diversity and phylogeny of indigenous *Rhizobium leguminosarum* strains associated with *Trifolium repens* plants in Romania. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2018;111(1):135-153. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0934-3>.
17. Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:D261-269. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1223>.
18. Zhang YM, Tian CF, Sui XH, et al. Robust markers reflecting phylogeny and taxonomy of Rhizobia. *PLoS One*. 2012;7(9):e44936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044936>.
19. Guo HJ, Wang ET, Zhang XX, et al. Replicon-dependent differentiation of symbiosis-related genes in *Sinorhizobium* strains nodulating *Glycine max*. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(4):1245-1255. <https://doi.org/10.1128/AEM.03037-13>.
20. Alexandre A, Laranjo M, Young JP, Oliveira S. *dnaJ* is a useful phylogenetic marker for alphaproteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008;58(12):2839-2849. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.2008/001636-0>.
21. Biondi EG, Pilli E, Giuntini E, et al. Genetic relationship of *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae* strains isolated from Caucasian region. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;220(2):207-213. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00098-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00098-3).
22. Escobar-Páramo P, Sabbagh A, Darlu P, et al. Decreasing the effects of horizontal gene transfer on bacterial phylogeny: the *Escherichia coli* case study. *Mol Phylogenet Evol*. 2004;30(1):243-250. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00181-7](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00181-7).
23. Matzke NJ. Model selection in historical biogeography reveals that founder-event speciation is a crucial process in island clades. *Syst Biol*. 2014;63(6):951-970. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syu056>.
24. Dresler-Nurmi A, Fewer DP, Räsänen LA, Lindström K. The diversity and evolution of Rhizobia. In: Pawłowski K. (eds). *Prokaryotic symbionts in plants*. Springer-Verlag; 2009. P. 3-41.
25. Tounsi-Hammami S, Le Roux C, Dhane-Fitouri S, et al. Genetic diversity of rhizobia associated with root nodules of white lupin (*Lupinus albus* L.) in Tunisian calcareous

- soils. *Syst Appl Microbiol.* 2019;42(4):448-456. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.04.002>.
26. Escobar-Páramo P, Clermont O, Blanc-Potard AB, et al. Specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol.* 2004;21(6):1085-1094. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh118>.
27. Проворов Н.А. Симбиогенез как эволюция генетических систем открытого типа // Генетика. — 2018. — Т. 54. — № 8. — С. 879–889. [Provorov NA. Symbiogenesis as evolution of open genetic systems. *Russian Journal of Genetics.* 2018;54(8):888-896. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S0016675818080106>.
28. Румянцева М.Л., Мунтян В.С., Черкасова М.Е., и др. Геномные острова штамма *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 — азотфиксирующего симбионта люцерны // Генетика. — 2018. — Т. 54. — № 7. — С. 745-756. [Roumiantseva ML, Muntyan VS, Cherkasova ME, et al. Genomic islands in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021, nitrogen-fixing symbiont of alfalfa. *Russian Journal of Genetics.* 2018;54(7):759-769. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S0016675818070135>.
29. Barcellos FG, Menna P, da Silva Batista JS, 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. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(8):2635-2643. <https://doi.org/10.1128/AEM.01823-06>.
30. Wielbo J. Rhizobial communities in symbiosis with legumes: genetic diversity, competition and interactions with host plants. *Cent Eur J Biol.* 2012;7(3):363-372. <https://doi.org/10.2478/s11535-012-0032-5>.
31. Румянцева М.Л., Мунтян В.С., Черкасова М.Е., и др. Сравнительный анализ геномных характеристик у референтных штаммов *Sinorhizobium meliloti* — симбионтов люцерны // Сельскохозяйственная биология. — 2017. — Т. 52. — № 5. — С. 928-939. [Roumiantseva ML, Muntyan VS, Cherkasova ME, et al. A comparative analysis of genomic characters of reference *Sinorhizobium meliloti* strains, the alfalfa symbionts. *Agricultural Biology.* 2017;52(5):928-939. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2017.5.928rus>.
32. Che D, Hasan MS, Chen B. Identifying pathogenicity islands in bacterial pathogenomics using computational approaches. *Pathogens.* 2014;3(1):36-56. <https://doi.org/10.3390/pathogens3010036>.
33. Krogh TJ, Møller-Jensen J, Kaleta C. Impact of chromosomal architecture on the function and evolution of bacterial genomes. *Front Microbiol.* 2018;9:2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02019>.
34. Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(5):414-424. <https://doi.org/10.1038/nrmicro884>.
35. Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, et al. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33(2):376-393. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x>.
36. Мунтян В.С., Черкасова М.Е., Андронов Е.Е., и др. Встречаемость островов в геномах природных штаммов *Sinorhizobium meliloti* // Генетика. — 2016. — Т. 52. — № 10. — С. 1126–1133. [Muntyan VS, Cherkasova ME, Andronov EE, et al. Occurrence of islands in genomes of *Sinorhizobium meliloti* native isolates. *Russian Journal of Genetics.* 2016;52(10):1015-1022. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S0016675816080105>.
37. Hudson CM, Lau BY, Williams KP. Islander: a database of precisely mapped genomic islands in tRNA and tmRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 2015;43 (Database issue):D48-53. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1072>.
38. Румянцева М.Л., Симаров Б.В., Онищук О.П., и др. Биологическое разнообразие клубеньковых бактерий в экосистемах и агроценозах. Теоретические основы и методы / Под ред. М.Л. Румянцевой, Б.В. Симарова. — СПб.; Пушкин: Инновационный центр защиты растений, 2011. — 104 с. [Roumiantseva ML, Simarov BV, Onishchuk OP, et al. Biologicheskoe raznoobrazie kluben'kovykh bakterii v ekosistemakh i agrotsenozakh. Teoreticheskie osnovy i metody. Ed. by M.L. Rumyantseva, B.V. Simarov. Saint Petersburg; Pushkin: Innovatsionnyi tsentr zashchity rastenii; 2011. 104 p. (In Russ.)]
39. Румянцева М.Л., Мунтян В.С., Менгони А., Симаров Б.В. ITS-полиморфизм солеустойчивых и солечувствительных природных штаммов *Sinorhizobium meliloti* — симбионтов люцерны, донника и пажитника // Генетика. — 2014. — Т. 50. — № 4. — С. 400–412. [Roumiantseva ML, Muntian VS, Mengoni A, Simarov BV. ITS-polymorphism of salt-tolerant and salt-sensitive native isolates of *Sinorhizobium meliloti* — symbionts of alfalfa, clover and fenugreek plants. *Russian Journal of Genetics.* 2014;50(4):348-359. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S0016675814040109>.
40. Румянцева М.Л., Мунтян В.С. Клубеньковые бактерии *Sinorhizobium meliloti*: солеустойчивость и ее генетическая детерминированность // Микробиология. — 2015. — Т. 84. — № 3. — С. 263–280. [Roumiantseva ML, Muntyan VS. Root nodule bacteria *Sinorhizobium meliloti*: tolerance to salinity and bacterial genetic determinants. *Microbiology.* 2015;84(3):303-318. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S0026365615030179>.
41. Демидёнок О.И., Гончаренко А.В. Системы токсин-антитоксин бактерий и перспективы их использо-

- вания в медицине (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. — 2013. — Т. 49. — № 6. — С. 539–546. [Demidenok OI, Goncharenko AV. Bacterial toxin-antitoxin systems and perspectives for their application in medicine. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2013;49(6):535-541. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S055510991306007X>.
42. Rannala B, Qiu W-G, Dykhuizen DE. Methods for estimating gene frequencies and detecting selection in bacterial populations. *Genetics*. 2000;155(2):499-508.
43. Rasmussen HB. Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis — valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting. *Gel Electrophoresis — Principles and Basics*. 2012. P. 315-334. <https://doi.org/10.5772/37724>.
44. Румянцева М.Л., Белова В.С., Онищук О.П., и др. Полиморфизм *bet*-генов у штаммов *Sinorhizobium meliloti* из генцентров люцерны // Сельскохозяйственная биология. — 2011. — Т. 46. — № 3. — С. 48–54. [Roumiantseva ML, Belova VS, Onishchouk OP, et al. Polymorphism of *bet*-genes among *Sinorhizobium meliloti* isolates native to gene centers of alfalfa. *Agricultural Biology*. 2011;46(3):48-54. (In Russ.)]
45. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Пер. с англ. под ред. А.А. Баева, К.Г. Скрябина. — М.: Мир, 1984. — 479 с. [Maniatis T, Fritch EE, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Translated from English ed. by A.A. Baev, K.G. Skryabin. Moscow: Mir; 1984. 479 p. (In Russ.)]
46. Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001;4(1):1-9.
47. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 1978;89(3):583-590.
48. Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. 2010;10(3):564-567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>.
49. Проворов Н.А., Андронов Е.Е., Онищук О.П. Формы естественного отбора, определяющего геномную эволюцию клубеньковых бактерий // Генетика. — 2017. — Т. 53. — № 4. — С. 401–410. [Provorov NA, Andronov EE, Onishchuk OP. Forms of natural selection controlling the genomic evolution in nodule bacteria. *Russian Journal of Genetics*. 2017;53(4):411-419. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S0016675817040129>.
50. Levin BR. Frequency dependent selection in bacterial populations. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1988;319(1196):459-472. <https://doi.org/10.1098/rstb.1988.0059>.
51. Румянцева М.Л., Саксаганская А.С., Мунтян В.С., и др. Структурный полиморфизм генов вирулентности и солеустойчивости *Sinorhizobium meliloti* // Генетика. — 2018. — Т. 54. — № 5. — С. 524–534. [Roumiantseva ML, Saksaganskaia AS, Muntyan VS, et al. Structural polymorphism of *Sinorhizobium meliloti* genes related to virulence and salt tolerance. *Russian Journal of Genetics*. 2018;54(5):525-535. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S001667581805003X>.
52. Румянцева М.Л., Онищук О.П., Белова В.С., и др. Полиморфизм штаммов *Sinorhizobium meliloti*, выделенных в центрах разнообразия люцерны, различающихся по почвенно-климатическим условиям // Экологическая генетика. — 2009. — Т. 7. — № 2. — С. 19–25. [Roumiantseva ML, Onischuk OP, Belova VS, et al. Polymorphism among *Sinorhizobium meliloti* isolates native to the origins of alfalfa diversity differed in soil-climate characteristics. *Ecological genetics*. 2009;7(2):19-25. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/ecogen7219-25>.
53. Palmer KM, Young JP. Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations in arable soils than in grass soils. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(6):2445-2450. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2445-2450.2000>.

## ✿ Информация об авторах

**Мария Евгеньевна Черкасова** — инженер-исследователь, лаборатория генетики и селекции микроорганизмов. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин-8, Санкт-Петербург. SPIN: 5341-5736. E-mail: mariacherkasova@mail.ru.

**Виктория Спартаковна Мунтян** — младший научный сотрудник, лаборатория генетики и селекции микроорганизмов. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин-8, Санкт-Петербург. SPIN: 7138-6763. E-mail: vucovar@yandex.ru.

## ✿ Authors and affiliations

**Mariia E. Cherkasova** — Research Engineer, Laboratory of Genetics and Breeding of Microorganisms. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin-8, St. Petersburg, Russia. SPIN: 5341-5736. E-mail: mariacherkasova@mail.ru.

**Victoria S. Muntyan** — Junior Researcher, Laboratory of Genetics and Breeding of Microorganisms. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin-8, St. Petersburg, Russia. SPIN: 7138-6763. E-mail: vucovar@yandex.ru.

## ✿ Информация об авторах

**Алла Сергеевна Саксаганская** — инженер-исследователь, лаборатория генетики и селекции микроорганизмов. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин-8, Санкт-Петербург. SPIN: 5832-1676. E-mail: allasaksaganskaya@mail.ru.

**Борис Васильевич Симаров** — д-р. биол. наук, профессор, главный научный сотрудник, лаборатория генетики и селекции микроорганизмов. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин-8, Санкт-Петербург. SPIN: 6859-1141. E-mail: genet@yandex.ru.

**Марина Львовна Румянцева** — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией, лаборатория генетики и селекции микроорганизмов. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин-8, Санкт-Петербург. SPIN: 5470-9527. E-mail: mroumiantseva@yandex.ru.

## ✿ Authors and affiliations

**Alla S. Saksaganskaia** — Research Engineer, Laboratory of Genetics and Breeding of Microorganisms. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin-8, St. Petersburg, Russia. SPIN: 5832-1676. E-mail: allasaksaganskaya@mail.ru.

**Boris V. Simarov** — Doctor of Biology, Professor, Principal Researcher, Laboratory of Genetics and Breeding of Microorganisms. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin-8, St. Petersburg, Russia. SPIN: 6859-1141. E-mail: genet@yandex.ru.

**Marina L. Roumiantseva** — PhD (Candidate of Biology), Leading Researcher, Head of the Laboratory, Laboratory of Genetics and Breeding of Microorganisms. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin-8, St. Petersburg, Russia. SPIN: 5470-9527. E-mail: mroumiantseva@yandex.ru.