

<https://doi.org/10.17816/ecogen17111-18>

## ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ МИКРОБНО-РАСТИТЕЛЬНЫХ СИМБИОЗОВ

© Н.А. Проворов, О.П. Онищук

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

Для цитирования: Проворов Н.А., Онищук О.П. Эколого-генетические основы конструирования высокоэффективных азотфиксирующих микробно-растительных симбиозов // Экологическая генетика. — 2019. — Т. 17. — № 1. — С. 11–18. <https://doi.org/10.17816/ecogen17111-18>.

Поступила: 16.10.2018

Одобрена: 21.11.2018

Принята: 25.03.2019

✿ Проявление количественных признаков, характеризующих симбиоз клубеньковых бактерий (ризобий) с бобовыми растениями, связано с действием эволюционно сложившихся полигенных систем, которые контролируют симбиотическую эффективность (СЭ) (влияние инокуляции на продуктивность растений) и нодуляционную конкурентоспособность (НКС) (формирование бактериями клубеньков в условиях смешанной инокуляции). Оптимизация баланса позитивных и негативных регуляторов эффективного симбиоза, направленная на повышение активности нитрогеназы и максимально полное вовлечение продуктов ее действия в метаболизм растений, позволяет создавать штаммы ризобий с высоким уровнем проявления СЭ и НКС. Инактивация генов — негативных регуляторов симбиоза — часто сопровождается снижением выживаемости ризобий при действии эдафических стрессов, однако обеспечивает сбалансированное повышение биомассы растений и накопление в них азота. Это повышение требует взаимодействия ризобий с генетически сконструированными сортами бобовых, которые отбирают из почвы активно фиксирующие  $N_2$ -штаммы, а также обеспечивают их избирательное размножение в клубеньках. Создание высокоэффективных бобово-ризобиальных систем должно базироваться на координированных модификациях механизмов контроля над развитием симбиоза со стороны бактерий и растений, обеспечивающих поддержание  $N_2$ -фиксирующей зоны клубенька и синтез NCR-белков, активирующих дифференцировку бактериоидов.

✿ **Ключевые слова:** микробно-растительные взаимодействия; клубеньковые бактерии (ризобии); бобовые растения; симбиотическая  $N_2$ -фиксация; позитивные и негативные регуляторы симбиоза; сигнальные взаимодействия; системная регуляция развития клубеньков; эволюция симбиоза; генетическое конструирование.

## ECOLOGICAL AND GENETIC BASES FOR CONSTRUCTION OF HIGHLY EFFECTIVE NITROGEN-FIXING MICROBE-PLANT SYMBIOSES

© N.A. Provorov, O.P. Onishchuk

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

*For citation:* Provorov N.A., Onishchuk O.P.

Ecological and genetic bases for construction of highly effective nitrogen-fixing microbe-plant symbioses. *Ecological genetics*. 2019;17(1):11-18. <https://doi.org/10.17816/ecogen17111-18>.

Received: 16.10.2018

Revised: 21.11.2018

Accepted: 25.03.2019

✿ Expression of quantitative traits characterizing the  $N_2$ -fixing symbiosis of nodule bacteria and leguminous plants is associated with operation of the evolutionary derived polygenic systems controlling the symbiotic efficiency (SE) (impact of inoculation on the plant productivity) and nodulation competitiveness (NC) (formation of nodules by rhizobia under mixed inoculation). Optimization of balance between positive and negative symbiotic regulators aimed at an increase of nitrogenase activity and at a complete allocation of its products into the plant metabolism provides the generation of rhizobia strains with high SE and NC. Inactivation of the negative symbiotic regulators often results in a decreased survival of rhizobia under the edaphic stresses but is responsible for a balanced increase of plant biomass and N accumulation. Improvement of symbiotic activity is to be based on the complementary interactions of microorganisms with the genetically engineered plant cultivars which are able for selection from soil of actively fixing  $N_2$  rhizobia strains and for their preferential multiplication in nodules. Construction of highly effective microbe-plant systems should be based on modifications of mechanisms controlling symbiosis development from the plant and bacterial sides providing the maintenance of  $N_2$ -fixing zone in nodules and synthesis of NCR proteins activating the bacteroid differentiation.

✿ **Keywords:** microbe-plant interactions; nodule bacteria (rhizobia); leguminous plants; symbiotic nitrogen fixation; positive and negative regulators of symbiosis; signal interactions; systemic regulation of nodule development; evolution of symbiosis; genetic engineering.

### ВВЕДЕНИЕ

Симбиотическая  $N_2$ -фиксация, осуществляемая при взаимодействии клубеньковых бактерий (ризобий)

с бобовыми растениями, — основной источник «биологического» азота, определяющий высокую продуктивность и экологическую безопасность агроценозов

при дефиците трофических ресурсов почвы. Несмотря на хорошую генетическую изученность бобово-ризобияльного симбиоза, знания о механизмах детерминации его эффективности мало используются для конструирования хозяйственно ценных  $N_2$ -фиксирующих систем. Это связано со сложностью контроля количественных признаков симбиоза, которые определяются большим числом функционально разнородных бактериальных генов, а также зависят от генетически полиморфных растений-хозяев и от широкого комплекса неконтролируемых экологических факторов [1].

Наиболее изученными участниками  $N_2$ -фиксирующего симбиоза являются ризобии — чрезвычайно важная для практики группа микроорганизмов: масштабы их использования исчисляются сотнями миллионов гектаров, а количество ежегодно поступающих в почву бактериальных клеток составляет  $10^{19}$ – $10^{21}$  [2]. В нашей статье рассмотрен генетический контроль хозяйственно ценных признаков ризобий — симбиотической эффективности (СЭ) (влияние на продуктивность растений) и нодуляционной конкурентоспособности (НКС) (способность формировать клубеньки при смешанной инокуляции растений производственными и местными штаммами). Проявление этих признаков зависит от взаимодействия ризобий с генными системами растений, определяющими хостинг бактерий на ранних стадиях симбиоза и максимально полное использование продуктов  $N_2$ -фиксации на его поздних стадиях. Предложенные подходы для конструирования высокоэффективных симбиозов основаны на согласованных модификациях систем их позитивной и негативной регуляции со стороны бактерий, а также механизмов их контроля со стороны растений-хозяев.

### ЭВОЛЮЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭФФЕКТИВНОГО СИМБИОЗА

Конструирование агрономически ценных микробно-растительных симбиозов должно базироваться на знании закономерностей и механизмов их природной эволюции, изучению которой в настоящее время уделяется пристальное внимание [1]. В основе бобово-ризобияльного симбиоза лежит сопряжение процессов  $N_2$ -фиксации и фотосинтеза, связанное с формированием партнерами объединенной системы C/N-метаболизма [3]. Ее эволюция началась с появлением медленно растущих ризобий (*Bradyrhizobium*), которые сохранили характерную для предковых форм (*Rhodopseudomonas*) способность к фотосинтезу, а также к использованию продуктов  $N_2$ -фиксации для собственного питания [4]. Анцестральные штаммы *Bradyrhizobium* не могут синтезировать сигнальные липо-хито-олигосахаридные Nod-факторы, характерные для других ризобий: они проникают в растения через разрывы эпидермиса, стимулируя развитие примитивных по структуре клубеньков, в которых  $N_2$ -фиксирующие бактерии сохраняют

внеклеточную локализацию. Переход к питанию углеродом, поставляемым растениями, был связан с утратой ризобиями собственного фотосинтеза. Это происходило параллельно с формированием системы *nod*-генов, которые кодируют синтез Nod-факторов (NF), активирующих ранние стадии симбиоза — закладку клубеньковых примордиев и проникновение ризобий в растительные ткани. Эволюция NF была обусловлена геномными перестройками, а возможно, и приобретением генов синтеза хитиновых веществ от неродственных ризобиям организмов — грибов либо грамположительных бактерий [5].

Итогом этой эволюции стало формирование у ризобий обширной системы *sym*-генов, включающей *nod*-гены (образование NF), *nif*-гены (синтез нитрогеназы), *fix*- и *dct*-гены (регуляция синтеза нитрогеназы и энергетическое обеспечение ее активности). Данные гены могут рассматриваться в качестве позитивных регуляторов СЭ, поскольку усиление их активности обычно приводит к повышению скорости фиксации  $N_2$ , а также увеличению массы растений, числа семян и накопления азота. Например, у ризобий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) амплификация *dct*-генов (контролируют транспорт в бактериоиды дикарбоновых кислот — источников энергии для нитрогеназы) и некоторых *nif*-генов сопровождается повышением на 70–80 % накопления азота в растениях, однако их масса увеличивается лишь на 15–20 % [6, 7]. Преодолению дисбаланса биохимических и ростовых процессов может способствовать синтез ризобиями ростостимулирующих веществ (витаминов, кофакторов, люмихромы), которые повышают соотношение биомасс надземных и подземных органов (оптимизацию габитуса) растений. О перспективности этого подхода говорит анализ развития однолетней люцерны *Medicago truncatula*, инокулированной эффективными штаммами *S. meliloti* в условиях солевого стресса: было показано, что габитус растений тесно связан с СЭ [8]. Следовательно, в основе перехода растений к симбиотрофному питанию азотом должна лежать перестройка регуляции корневых и побеговых меристем, а также ее координация с развитием клубеньковых примордиев, которая определяется системными факторами, включая регуляторные белки и микро-РНК, а также фитогормоны, продуцируемые обоими партнерами (рис. 1) [9].

Важное условие эффективного симбиоза — успешная конкуренция производственных штаммов ризобий с местными штаммами, которые устойчивы к локальным эдафическим стрессам и обычно обладают высокой вирулентностью в сочетании с низкой  $N_2$ -фиксирующей активностью [11]. Анализ мутантов ризобий с нарушениями НКС позволил выявить обширную систему *strp*-генов, участвующих в контроле этого признака, которые оказались локализованы в разных репликациях. Их экспрессия связана с такими адаптивно значимыми свойствами ризобий, как скорость размножения, использование различных источников питания и энер-



Рис. 1. Системная регуляция N<sub>2</sub>-фиксирующего симбиоза бобовым растением (по: [10], модифицировано). CK — цитокинины; AUX — ауксины; miR — микро-РНК; NSP2 и AP2 — транскрипционные регуляторы; CLE — белки группы CLAVATA, которые синтезируются в корнях при действии бактериальных Nod-факторов (NF) и мигрируют в надземные органы; LRR-RLK — рецепторподобная киназа, богатая лейциновыми повторами. Стрелки обозначают активацию, символ ⊣ — репрессию соответствующего процесса или регуляторного элемента

гии, антибиотическая активность, адсорбция на корнях и скорость образования клубеньков [12, 13]. Кластерное расположение *cmp*-генов на хромосоме *S. meliloti* указывает на то, что эти гены, несмотря на функциональную разнородность, имеют общую эволюционную историю. Она основана на совместном переносе *cmp*-генов в микробных популяциях, а также на специфичных для симбиоза формах отбора, которые действуют на бактерии в системах «растение — почва» [14].

Резкое повышение СЭ связано с переходом ризобий в форму внутриклеточных бактериоидов, неспособных к размножению в почве после выхода из отмирающих клубеньков. Этот переход происходит под действием образуемых растениями цистеинбогатых NCR-белков, сходных с дефензинами (участвуют в защите растений от различных паразитов), однако бактерии имеют и собственные гены, определяющие дифференцировку

бактериоидов, например *bacA* и *minE* [15]. Повышение СЭ, сопряженное с отказом бактериоидов от автономного существования, может рассматриваться как проявление межвидового альтруизма — сложной формы групповой адаптации, которая связана с повышением целостности надвидовой системы, преобразуемой в «холобионт» [16, 17]. Однако ризобии сохраняют и способность к эффективной эксплуатации почвенных ниш, которая обычно коррелирует со сниженной СЭ. Это корреляция определяется негативными регуляторами симбиоза, которые наряду с его позитивными регуляторами могут быть использованы для конструирования хозяйственно ценных штаммов ризобий (табл. 1).

**НЕГАТИВНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ СИМБИОЗА**

Первые данные о наличии у ризобий негативных регуляторов симбиоза были получены путем анали-

Таблица 1

**Позитивная и негативная регуляция количественных признаков симбиоза у клубеньковых бактерий**

Свойства генных систем бактерий	Количественные признаки симбиоза	
	Симбиотическая эффективность	Нодуляционная конкурентоспособность
Позитивные регуляторы		
Функции	Синтез нитрогеназы ( <i>nif</i> ), ее снабжение электронами и энергией ( <i>fix</i> , <i>dct</i> )	Образование поверхностных и антибиотических факторов, обеспечивающих колонизацию ризосферы и ризопланы, а также вирулентность и стресс-устойчивость
Локализация в геноме	В составе компактных внехромосомных кластеров	Во всех репликаонах, на хромосоме образуют несколько «рыхлых» кластеров
Экспрессия вне симбиоза	Показана лишь для некоторых генов ( <i>dct</i> )	Характерна для большинства генов

Окончание табл. 1

Свойства генных систем бактерий	Количественные признаки симбиоза	
	Симбиотическая эффективность	Нодуляционная конкурентоспособность
Негативные регуляторы		
Функции	Синтез запасных питательных веществ и защитных полисахаридов, экономное расходование энергии	Репрессия синтеза Nod-факторов (NF) и формирования биопленок, определяющих устойчивость к эдафическим стрессам
Локализация в геноме	Дисперсная	Дисперсная
Экспрессия при симбиозе	Обычно отсутствует	Ограничена

за мутантов с повышением интенсивности  $N_2$ -фиксации либо увеличением числа и скорости образования клубеньков [18]. Среди негативных регуляторов клубенькообразования одним из первых был выявлен ген *nolR*, который блокирует синтез NF в отсутствие растений-хозяев. Тп5-мутанты по этому гену характеризуются повышением НКС, которая в условиях смешанной инокуляции со штаммом-тестером возрастала с 20–25 % (родительский штамм) до 70–75 % (мутант по гену *nolR*) [19]. Еще более резкое возрастание НКС (с 10 до 90 %) выявлено у мутанта по гену *praR* — негативному регулятору образования биопленок, определяющему адсорбцию бактерий на корнях [20].

Данные о негативной регуляции поздних стадий симбиоза были впервые получены при анализе мутантов с повышенной СЭ, индуцированных у ризобий с помощью физических и химических мутагенов [18], а также транспозонного мутагенеза [21]. Анализ коллекции Тп5-мутантов, полученных у *S. meliloti*, позволил выявить серию *eff*-генов, которые являются антагонистами СЭ [22]. В число функций, кодируемых этими генами, входит усвоение «несимбиотических» (не используемых бактериоидами) источников питания, например, глюкозы: нарушение ее ассимиляции связано с утратой катаболической репрессии, ограничивающей поступление дикарбоновых кислот из растительной цитоплазмы в бактериоиды [23, 24].

Другой функцией негативных регуляторов СЭ является конверсия получаемых от растений углеводов в запасные питательные вещества (поли- $\beta$ -гидроксibuтират, гликоген), нарушение которой ухудшает выживаемость ризобий в почве, но улучшает энергоснабжение  $N_2$ -фиксирующих бактериоидов [25]. Аналогичный эффект вызывает повышение дыхательной активности *red*-мутантов *S. meliloti*, которые, по-видимому, утрачивают важную для выживания в почве способность к экономному расходованию энергии [26]. Кроме того, повышение СЭ может быть результатом утраты поверхностных компонентов бактерий, которые определяют их устойчивость к эдафическим (температурным, осмотическим) стрессам, но при взаимодействии с растениями оказываются элиситорами иммунных реакций, ограничивающих размножение ризобий в клубеньках [27, 28].

### КОНТРОЛЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ СИМБИОЗА РАСТЕНИЕМ

Растения-хозяева играют в определении количественных признаков симбиоза не менее важную роль, чем микросимбионты. По данным двухфакторного дисперсионного анализа, весьма значимым для определения СЭ является неаддитивное (специфическое) взаимодействие генотипов партнеров: его вклад в общее варьирование показателей продуктивности инокулированных бактериями растений максимален тогда, когда эта продуктивность наиболее высока [29].

Растения, как и бактерии, контролируют СЭ на двух уровнях — индукции развития клубеньков и их  $N_2$ -фиксирующей активности. У бобовых растений обнаружена обширная система генов симбиоза, которые подразделяют на *Sym*-гены (рецепция микробных сигналов и закладка клубеньковых примордиев) и гены нодулинов (построение клеточных и тканевых структур для хостинга симбионтов, образование объединенной системы азотно-углеродного обмена) [1].

Одним из наиболее важных признаков, контролируемых этими генами, является предпочтительная инокуляция растений определенными генотипами ризобий (Host preference, Нор), проявляемая при смешанном инфицировании. Анализ дифференциальной экспрессии растительных генов на ранних стадиях симбиоза показал, что признак Нор связан с образованием флавоноидных индукторов синтеза NF и с их рецепцией, а также со скоростью закладки клубеньковых примордиев [30]. Гены, влияющие на эти процессы, контролируют отбор растениями штаммов ризобий с высокой вирулентностью, которая коррелирует со структурой *nod*-генов, но не со структурой генов 16S рРНК [31]. В связи с этим вполне реальным представляется создание сортов бобовых, проявляющих высокую СЭ, благодаря отбраковке не фиксирующих  $N_2$  ризобий на ранних стадиях симбиоза.

Результаты диаллельных скрещиваний показали, что наследуемость признака Нор у люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina*) достаточно высока для того, чтобы в растительных популяциях происходил отбор на усиление этого признака [32]. Однако в большинстве симбиотических систем связь Нор и СЭ не выявляется: при смешанном инфицировании растения с равным успехом инокулируются фиксирующими и не фиксирующими  $N_2$ -штаммами ризобий [33]. Несмотря на это,



в природных экосистемах эволюция симбиоза направлена на повышение СЭ, что связано с быстрым размножением эффективных штаммов ризобий *in planta* на основе предпочтительного снабжения углеводами активно фиксирующих  $N_2$  клубеньков, а также подавления репродукции не фиксирующих  $N_2$  «симбионтов-обманщиков» с помощью защитных реакций. Опыты с культивированием сои в безазотной атмосфере (80 %  $Ar$  + 20 %  $O_2$ ) показали, что растения резко ограничивают размножение бактерий в клубеньках, из которых не поступают продукты  $N_2$ -фиксации [34].

Оптимизация системного контроля симбиоза, который обеспечивает координацию развития клубеньков с фотосинтезом и с ассимиляцией азотных веществ почвы, представляется важным способом повышения СЭ. Этот контроль впервые был показан путем анализа мутантов бобовых, которые образуют резко повышенное число клубеньков (фенотип  $Nod^{++}$ ), сохраняя данную способность в присутствии нитратов (фенотип  $Nts$ , от: Nitrate tolerant symbiosis). С использованием таких мутантов было продемонстрировано, что роль сигналов, мигрирующих между надземными и подземными органами растений, играют CLE-белки, синтезируемые в корнях при воздействии NF, а также малые регуляторные РНК, которые образуются в надземных органах и мигрируют в корни, ограничивая число клубеньков (см. рис. 1).

Непосредственное практическое использование  $Nod^{++}Nts$ -мутантов ограничено их сниженной продуктивностью в связи с перерасходом энергии на образование избытка клубеньков [35]. Однако частичная релаксация негативного контроля клубенькообразования может быть полезной для совмещения интенсивной фиксации  $N_2$  и поглощения азотных веществ почвы. Миксотрофное питание азотом характерно для бобовых растений трибы фасоловых, *Phaseoleae* (образуют детерминированные клубеньки), благодаря разобщению путей ассимиляции почвенного и фиксированного азота: первый усваивается через образование амидов, а второй — через образование уреидов [36]. Такая биохимическая диверсификация обеспечила эффективное усвоение растениями фиксированного азота: соотношение  $N : C$  в уреидах в 2–3 раза выше, чем в амидах. Это позволило бобовым трибы фасоловых отказаться от индукции дифференцировки бактериоидов, которую бобовые галегонидного комплекса (образуют недетерминированные клубеньки) осуществляют с помощью NCR-белков. Возможность совмещения детерминированного развития клубеньков с глубокой дифференцировкой бактериоидов была продемонстрирована в опытах по переносу гена *dfn1-1* из люцерны *Medicago truncatula* в лядвенец *Lotus japonicus* [37].

Анализ механизмов системной регуляции симбиоза показал, что в качестве перспективных под-

ходов для усиления  $N_2$ -фиксации можно рассматривать снижение восприимчивости CLE-белков к активирующему действию нитрата либо повышение устойчивости AP2-регуляторов к ингибирующему действию регуляторной РНК *miR172* (см. рис. 1). Важным представляется поиск генов-стимуляторов развития  $N_2$ -фиксирующей зоны клубеньков, а также индукторов синтеза NCR-белков, определяющих трансформацию ризобий в бактериоиды.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате изучения генетического контроля количественных признаков бобово-ризобиального симбиоза было установлено, что для повышения его агрономической ценности следует использовать несколько подходов.

1. Активация бактериальных генов — позитивных регуляторов симбиоза, приводящая к усиленному поступлению продуктов  $N_2$ -фиксации в растения.
2. Инактивация негативных регуляторов симбиоза, которая приводит к «отказу» микросимбионтов от ряда функций автономного существования, включая устойчивость к эдафическим стрессам.
3. Оптимизация развития растений, направленная на достижение баланса метаболических и ростовых процессов, который обеспечивает максимально полное вовлечение продуктов  $N_2$ -фиксации в питание бобовых.

Наиболее существенное повышение показателей агрономической ценности симбиоза достигается при инактивации его негативных регуляторов, что было показано при изучении СЭ (проявляется на поздних стадиях симбиоза) и НКС (проявляется на его ранних стадиях). Например, инактивация негативных регуляторов НКС вызывает более сильное (в 3–9 раз) ее повышение, чем амплификация позитивных регуляторов, которая улучшает НКС на 20–30 % [14]. Повышение СЭ, достигаемое при встройках  $Tn5$  в *eff*-гены, сопровождается сбалансированным повышением интенсивности биохимических и ростовых процессов в растениях, которого не удается достичь путем амплификации *dct*- и *nif*-генов [24]. Перспективность этого подхода обусловлена также и тем, что снижение способности ризобий к автономному существованию, которое связано с инактивацией негативных регуляторов симбиоза, определяющих устойчивость к эдафическим стрессам, может обеспечить быструю элиминацию из агросистемы генетически модифицированных бактериальных штаммов.

*Работа поддержана грантом РФФ 18-16-00073.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Проворов Н.А., Тихонович И.А. Генетические основы эволюции бактерий — симбионтов растений. — СПб.: Информ-Навигатор, 2016. — 240 с.

- [Provorov NA, Tikhonovich IA. Geneticheskie osnovy evolutsii bakteriy – simbiotov rasteniy. Saint Petersburg: Inform-Navigator; 2016. 240 p. (In Russ.)]
2. Peoples MB, Brockwell J, Herridge DF, et al. The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis*. 2009;48(1-3):1-17. <https://doi.org/10.1007/bf03179980>.
  3. Проворов Н.А., Долгих Е.А. Метаболическая интеграция организмов в системах симбиоза // Журнал общей биологии. – 2006. – Т. 67. – № 6. – С. 403–422. [Provorov NA, Dolgikh EA. Metabolic integration of organisms within symbiotic systems. *Journal of general biology*. 2006;67(6):403-422. (In Russ.)]
  4. Проворов Н.А., Андронов Е.Е. Эволюция клубеньковых бактерий: реконструкция процессов видообразования, обусловленных перестройками генома в системе симбиоза // Микробиология. – 2016. – Т. 85. – № 2. – С. 195–206. [Provorov NA, Andronov EE. Evolution of root nodule bacteria: reconstruction of the speciation processes resulting from genomic rearrangements in a symbiotic system. *Microbiology*. 2016;85(2):131-139. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S0026365616020166>.
  5. Hirsch AM, Lum MR, Downie JA. What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special? *Plant Physiol*. 2001;127(4):1484-1492. <https://doi.org/10.1104/pp.010866>.
  6. Онищук О.П., Воробьев Н.И., Проворов Н.А., Симаров Б.В. Симбиотическая активность ризобий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) с генетическими модификациями системы транспорта дикарбоновых кислот // Экологическая генетика. – 2009. – Т. 7. – № 2. – С. 3–10. [Onishchuk OP, Vorobyov NI, Provorov NA, Simarov BV. Simbioticheskaya aktivnost rizobiy lutserni (*Sinorhizobium meliloti*) s geneticheskimi modifikatsiyami sistemy transporta dikarbonovikh kislot. *Ecological genetics*. 2009;7(2):3-10. (In Russ.)]
  7. Онищук О.П., Проворов Н.А., Воробьев Н.И., Симаров Б.В. Оценка фенотипического проявления бактериальных генов, контролирующих эффективность азотфиксирующего симбиоза с растениями // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – № 1. – С. 32–42. [Onishchuk OP, Provorov NA, Vorobyov NI, Simarov BV. Otsenka fenotipicheskogo proyavleniya bakterialnykh genov, kontroliruyushchikh effektivnost azotfiksiruyushchego simbioza s rasteniyami. *Agricultural Biology*. 2011;(1):32-42. (In Russ.)]
  8. Проворов Н.А., Онищук О.П., Курчак О.Н. Габитус и продуктивность люцерны (*Medicago sativa* L.) в зависимости от инокуляции штаммами *Sinorhizobium meliloti*, различающимися по солеустойчивости // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51. – № 3. – С. 343–350. [Provorov NA, Onishchuk OP, Kurchak ON. Impacts of inoculation with *Sinorhizobium meliloti* strains differing in salt tolerance on the productivity and habitus of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Agricultural Biology*. 2016;51(3):343-350. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.3.343rus>.
  9. Azarakhsh M, Lebedeva MA, Lutova LA. Identification and Expression Analysis of Medicago truncatula Isopentenyl Transferase Genes (IPTs) Involved in Local and Systemic Control of Nodulation. *Front Plant Sci*. 2018;9:304. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00304>.
  10. Lelandais-Briere C, Moreau J, Hartmann C, Crespi M. Noncoding RNAs, Emerging Regulators in Root Endosymbioses. *Mol Plant Microbe Interact*. 2016;29(3):170-180. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-15-0240-FI>.
  11. Доросинский Л.М. Конкурентная способность клубеньковых бактерий // Биологический азот в сельском хозяйстве СССР. – М.: Наука, 1989. – С. 27–34. [Dorosinskiy LM. Konkurentnaya sposobnost klubenkovikh bakteriy. In: Biologicheskiy azot v sel'skom khozyaystve SSSR. Moscow: Nauka; 1989. P. 27-34. (In Russ.)]
  12. Онищук О.П., Симаров Б.В. Гены, контролирующие нодуляционную конкурентоспособность клубеньковых бактерий // Генетика. – 1996. – Т. 32. – № 8. – С. 1157–1166. [Onishchuk OP, Simarov BV. Geni kontroloruyushchie nodulyatsionnyu konkurentosposobnost klubenkovykh bakteriy. *Russian Journal of Genetics*. 1996;32(8):1157-1166. (In Russ.)]
  13. Pobigaylo N, Szymczak S, Nattkemper TW, Becker A. Identification of genes relevant to symbiosis and competitiveness in *Sinorhizobium meliloti* using signature-tagged mutants. *Mol Plant Microbe Interact*. 2008;21(2):219-231. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-2-0219>.
  14. Онищук О.П., Воробьев Н.И., Проворов Н.А. Нодуляционная конкурентоспособность клубеньковых бактерий: генетический контроль и адаптивное значение // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53. – № 2. – С. 127–135. [Onishchuk OP, Vorobyov NI, Provorov NA. Nodulation competitiveness of nodular bacteria: genetic control and adaptive significance. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017;53(2):127-135. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S0555109917020131>.
  15. Haag AF, Arnold MF, Myka KK, et al. Molecular insights into bacteroid development during Rhizobium-legume symbiosis. *FEMS Microbiol Rev*. 2013;37(3):364-383. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12003>.
  16. Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Эволюция полезных для растений признаков у азотфиксирующих бактерий: моделирование и конструирование систем

- межвидового альтруизма // Прикладная биохимия и микробиология. — 2015. — Т. 51. — № 4. — С. 363–370. [Provorov NA, Vorobyov NI. Evolution of host-beneficial traits in nitrogen-fixing bacteria: modeling and construction of systems for interspecies altruism. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2015;51(4):363-370. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S0555109915040145>.
17. Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32(5):723-735. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x>.
  18. Проворов Н.А., Симаров Б.В., Федоров С.Н. Симбиотические свойства разных типов мутантов клубеньковых бактерий // Известия АН СССР, серия биологическая. — 1985. — № 6. — С. 870–884. [Provorov NA, Simarov BV, Fedorov SN. Simbioticheskie svoystva raznikh tipov mutantov klubenkoykx bakteriy. *Izvestiya AN SSSR, seriya biologicheskaya*. 1985;(6):870-884. (In Russ.)]
  19. Sugawara M, Sadowsky MJ. Enhanced nodulation and nodule development by nolR mutants of *Sinorhizobium medicae* on specific Medicago host genotypes. *Mol Plant Microbe Interact*. 2014;27(4):328-335. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-13-0312-R>.
  20. Frederix M, Edwards A, Swiderska A, et al. Mutation of praR in *Rhizobium leguminosarum* enhances root biofilms, improving nodulation competitiveness by increased expression of attachment proteins. *Mol Microbiol*. 2014;93(3):464-478. <https://doi.org/10.1111/mmi.12670>.
  21. Plazinski J. Tn5-inherited mutant strain of *Rhizobium meliloti* with a highly increased ability to fix nitrogen for lucerne. *Microbiol Lett*. 1981;18(1):137-142.
  22. Sharypova LA, Onishchuk OP, Chesnokova ON, et al. Isolation and characterization of *Rhizobium meliloti* Tn5 mutants showing enhanced symbiotic effectiveness. *Microbiology*. 1994;140(3):463-470. <https://doi.org/10.1099/00221287-140-3-463>.
  23. Sharypova LA, Yurgel SN, Keller M, et al. The eff-482 locus of *Sinorhizobium meliloti* CXM1–105 that influences symbiotic effectiveness consists of three genes encoding an endoglycanase, a transcriptional regulator and an adenylate cyclase. *Mol Gen Genet*. 1999;261(6):1032-1044. <https://doi.org/10.1007/s004380051052>.
  24. Проворов Н.А., Онищук О.П., Юргель С.Н., и др. Конструирование высокоэффективных симбиотических штаммов бактерий: эволюционные модели и генетические подходы // Генетика. — 2014. — Т. 50. — № 11. — С. 1273–1285. [Provorov NA, Onishchuk OP, Yurgel SN, et al. Construction of highly effective symbiotic bacteria: evolutionary models and genetic approaches. *Russian Journal of Genetics*. 2014;50(11):1273-1285. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S0016675814110113>.
  25. Marroqui S, Zorreguieta A, Santamaria C, et al. Enhanced symbiotic performance by *Rhizobium tropici* glycogen synthase mutants. *J Bacteriol*. 2001;183(3):854-64. <https://doi.org/10.1128/JB.183.3.854-864.2001>.
  26. Юргель С.Н., Шарыпова Л.А., Симаров Б.В. Tn5 мутации *Rhizobium meliloti*, вызывающие повышение редокс-потенциала свободноживущих клеток и эффективность их симбиоза с люцерной // Генетика. — 1998. — Т. 34. — № 6. — С. 737–741. [Yurgel SN, Sharypova LA, Simarov BV. Tn5 mutatsii *Rhizobium meliloti* vzyvvaushchie povyshenie redox-potentsiala svobodnozhivushchikh kletok i effektivnost ikh simbioza s lutsernoy. *Russian Journal of Genetics*. 1998;34(6):737-741. (In Russ.)]
  27. Онищук О.П., Шарыпова Л.А., Курчак О.Н., и др. Выявление генов *Sinorhizobium meliloti*, влияющих на синтез поверхностных полисахаридов и конкурентоспособность // Генетика. — 2005. — Т. 41. — № 12. — С. 1617–1623. [Onishchuk OP, Sharypova LA, Kurchak ON, et al. Identification of *Sinorhizobium meliloti* genes influencing synthesis of surface polysaccharides and competitiveness. *Russian Journal of Genetics*. 2005;41(12): 1617-1623. (In Russ.)]
  28. Затовская Т.В. Получение и анализ Tn5-мутантов *Sinorhizobium meliloti* с измененными поверхностными полисахаридами: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — СПб., 2012. — 18 с. [Zatovskaya TV. Poluchenie i analiz Tn5-mutantov *Sinorhizobium meliloti* s izmenennymi simbioticheskimi svoystvami. [dissertation] Saint Petersburg; 2012. 18 p. (In Russ.)]
  29. Provorov NA, Tikhonovich IA. Genetic resources for improving nitrogen fixation in legume-rhizobia symbiosis. *Genet Resour Crop Evol*. 2003;50(1):89-99. <https://doi.org/10.1023/A:1022957429160>.
  30. Meschini EP, Blanco FA, Zanetti ME, et al. Host genes involved in nodulation preference in common bean (*Phaseolus vulgaris*)-rhizobium etli symbiosis revealed by suppressive subtractive hybridization. *Mol Plant Microbe Interact*. 2008;21(4):459-468. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-4-0459>.
  31. Jorin B, Imperial J. Population Genomics Analysis of Legume Host Preference for Specific Rhizobial Genotypes in the *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Symbioses. *Mol Plant Microbe Interact*. 2015;28(3):310-8. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-14-0296-FI>.
  32. Simonsen AK, Stinchcombe JR. Standing genetic variation in host preference for mutualist microbial symbionts. *Proc Biol Sci*. 2014;281(1797). <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2036>.
  33. Westhoek A, Field E, Rehling F, et al. Policing the legume-Rhizobium symbiosis: a critical test of partner choice. *Sci Rep*. 2017;7(1):1419. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01634-2>.

34. Denison RF, Toby Kiers E. Why are most rhizobia beneficial to their plant hosts, rather than parasitic? *Microbes Infect.* 2004;6(13):1235-1239. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.08.005>.
35. Novak K, Skrdleta V, Kropakova M, et al. Interaction of two genes controlling symbiotic nodule number in pea (*Pisum sativum* L.). *Symbiosis.* 1997;23(1):43-62.
36. Sprent JI. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol.* 2007;174(1):11-25. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02015.x>.
37. Van de Velde W, Zehirov G, Szatmari A, et al. Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science.* 2010;327(5969):1122-1126. <https://doi.org/10.1126/science.1184057>.

☪ Информация об авторах

**Николай Александрович Проворов** — д-р биол. наук, директор. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург. E-mail: provorovnik@yandex.ru.

**Ольга Петровна Онищук** — ведущий научный сотрудник лаборатории № 2. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин, Санкт-Петербург. E-mail: olony@yandex.ru.

☪ Information about the authors

**Nikolai A. Provorov** — Doctor of Biology, Director. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. E-mail: provorovnik@yandex.ru.

**Olga P. Onishchuk** — Leading Researcher, Laboratory 2. All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia. E-mail: olony@yandex.ru.