

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
микробиологии

На правах рукописи

Кузнецова Ирина Геннадьевна

**КЛУБЕНЬКОВЫЕ БАКТЕРИИ РЕЛИКТОВЫХ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ
БАЙКАЛЬСКОГО РЕГИОНА, ИХ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И
КОМПЛЕМЕНТАРНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРИ ОБРАЗОВАНИИ
СИМБИОЗА**

Научная специальность 1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Сафронова Вера Игоревна

Санкт-Петербург – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ОБЗОР И АНАЛИЗ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ И ПАТЕНТНОЙ ИНФОРМАЦИИ	10
ГЛАВА 1. РОЛЬ СИМБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЖИЗНИ РАСТЕНИЙ.....	10
1.1 Роль симбиоза в процессе эволюции живых организмов	10
1.2 Разнообразие мутуалистических растительно-микробных симбиозов	11
1.3 Бобово-ризобиальный симбиоз	14
1.3.1 Эволюция бобово-ризобиального симбиоза	14
1.3.2 Микроорганизмы, участвующие в формировании симбиоза с бобовыми растениями	15
1.3.3 Развитие бобово-ризобиального симбиоза.....	17
1.3.4 Специфичность бобово-ризобиального симбиоза.....	19
1.3.5 Значение бобово-ризобиального симбиоза в сельском хозяйстве....	21
ГЛАВА 2. ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ОТНОШЕНИЙ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО РОДСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ	23
2.1 Подходы к определению таксономических отношений	23
2.2 Определение филогенетического родства микроорганизмов	26
2.2.1 Определение генетического сходства путем секвенирования генов	26
2.2.2 Мультилокусный анализ последовательностей (MLSA)	28
2.2.3 Анализ профилей ДНК, полученных путем рестрикции тотальной ДНК.....	29
2.2.4 Полногеномное секвенирование	30
2.2.5 Определение сходства геномов путем реассоциации ДНК	32
2.2.6 Метод Average Nucleotide Identity (ANI)	33
ГЛАВА 3. РЕЛИКТОВЫЕ БОБОВЫЕ РАСТЕНИЯ И ИХ МИКРОСИМБИОНТЫ	35
3.1. Байкальский регион как центр генетического разнообразия бобовых растений	35
3.2. Генетические исследования микросимбионтов реликтовых бобовых растений	40
ВЫВОДЫ ПО РАЗДЕЛУ	43
НАУЧНО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	44
ГЛАВА 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	44
1.1 Растительный и почвенный материал.....	44
1.2 Выделение и культивирование микроорганизмов.....	45

1.3 Идентификация микроорганизмов	46
1.4 Вегетационные опыты	51
1.4.1 Вегетационный метод обнаружения симбиотических ризобий в почве	51
1.4.2 Вегетационные опыты для изучения комплементарного взаимодействия симбиотической эффективности микросимбионтов.....	52
1.5 Получение флуоресцентно меченных штаммов с использованием метода электропорации	53
1.6 Конфокальная микроскопия.....	54
ГЛАВА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	56
2.1 Генетическое разнообразие микросимбионтов реликтовых бобовых растений	56
2.1.1 Видовой состав микросимбионтов чины низкой (<i>Lathyrus humilis</i> (Ser.) Spreng.)	56
2.1.2 Видовой состав микросимбионтов копеечника щетинистого (<i>Hedysarum gmelinii</i> Ledeb. subsp. <i>setigerum</i> (Turcz. ex Fischer et Meyer) Kurbatsky).....	63
2.1.3 Видовой состав микросимбионтов остролодочника трехлисточкового (<i>Oxytropis triphylla</i> (Pall.) Pers.).....	70
2.1.4 Видовой состав микросимбионтов остролодочника Попова (<i>Oxytropis popoviana</i> Peschkova)	82
2.1.5 Видовой состав микросимбионтов астрагала хоринского (<i>Astragalus chorinensis</i> Bunge)	92
2.2 Симбиотические гены изолятов	97
2.3 Комплементация симбиотических генов, эффективность и хозяйская специфичность изолятов	99
ВЫВОДЫ ПО РАЗДЕЛУ	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	117
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	121
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 (Справочная информация).....	141
ПРИЛОЖЕНИЕ 2 (Секвенированные последовательности).....	149

ВВЕДЕНИЕ

Проблемы взаимоотношений высших растений и почвенных микроорганизмов являются одними из наиболее интересных и, в тоже время, сложных для изучения. Известно, что бобовые растения способны вступать в симбиоз с азотфиксирующими клубеньковыми бактериями (ризобиями). Образование такого взаимовыгодного симбиоза приводит к приобретению растительно-микробной системой новых адаптивных свойств, которые повышают ее продуктивность, стрессоустойчивость, помогают успешно конкурировать в борьбе за экологическое пространство. Из растения-хозяина в клубеньки поступают продукты фотосинтеза, которые являются источником углерода для бактерий – необходимого элемента питания. А из клубеньков, в свою очередь, в надземную часть растения транспортируются продукты азотфиксации, необходимые растению для формирования биомассы.

Мобилизация природных ресурсов агрофитоценозов с помощью растительно-микробных взаимодействий является одним из основных направлений развития экологически устойчивого земледелия. Бобовые культуры в наибольшей степени соответствуют современным требованиям формирования экологического равновесия. Они вступают в поликомпонентный симбиоз с различными группами полезной почвенной микрофлоры, что позволяет не только улучшать почвенные свойства, повышать урожай и его качество, но и делает их ценным предшественником в севооборотах. В этой связи перспективен поиск и практическое применение новых микроорганизмов со свойствами, которые позволят повысить экономическую эффективность возделывания бобовых культур [79]. Известно, что эффективность симбиоза со стороны клубеньковых бактерий зависит от целого ряда симбиотических признаков, которые определяются наличием или отсутствием симбиотических генов (*Sym* - гены). Поэтому при проведении научно обоснованной селекции и создания высокоэффективных растительно-микробных агросистем также стоит обратить внимание на «качество»

набора *Symb* - генов микросимбионта и возможности его изменения или дополнения (комплементации).

Своё внимание мы решили остановить на симбиотических системах с участием реликтовых бобовых растений. Они являются остатками предковых групп, широко распространенных в прошедших геологических эпохах, и представляют большую научную ценность, так как являются моделью эволюционно более ранних растительно-микробных взаимоотношений. Для них характерна низкая специфичность при выборе симбиотических партнеров, в отличие от эволюционно более молодых бобовых, которые проявляют высокую избирательность вплоть до абсолютно строгой специфичности. Вероятно, и сами микросимбионты реликтовых растений обладают широким кругом растений-хозяев и отличаются наборами симбиотических генов от форм с узкой хозяйской специфичностью.

Местом экспедиций был выбран Байкальский регион. Он является одним из центров генетического разнообразия растений, где, благодаря разнообразию природных ландшафтов и неоднородным климатическим условиям, сохранилось большое количество уникальных, эндемичных и реликтовых видов. Кроме того, в Байкальском регионе очень актуальна проблема формирования, сохранения и устойчивого использования биологических ресурсов, так как Байкал является уникальным участком Земли, включенным в список мировых объектов всемирного наследия «ЮНЕСКО» [46].

Цель и задачи исследования. Цель работы заключалась в исследовании генетического и таксономического разнообразия микросимбионтов бобовых реликтовых растений Байкальского региона и их способности к комплементарному взаимодействию при образовании многокомпонентного симбиоза.

Задачи исследования:

1. создание коллекции штаммов-микросимбионтов реликтовых бобовых растений из разных триб подсемейства Мотыльковые (*Papilionoideae* Rudd), произрастающих в Байкальском регионе;

2. исследование генетического разнообразия изолированных штаммов микроорганизмов, определение их таксономического положения;

3. полногеномное секвенирование исследуемых штаммов микросимбионтов, выделенных из одного и того же клубенька и относящихся к разным таксонам; характеристика генных систем, ответственных за формирование и функционирование симбиоза;

4. определение комплементарного взаимодействия при совместной инокуляции растений микросимбионтами, которые обладают взаимодополняющими наборами генов, участвующих в формировании и функционировании симбиоза.

Научная новизна исследования. В работе впервые проведено выделение и детальное изучение бактерий, колонизирующих клубеньки реликтовых бобовых растений чины низкой (*Lathyrus humilis* (Ser.) Spreng), копеечника щетинистого (*Hedysarum gmelinii* Ledeb. subsp. *setigerum* (Turcz. ex Fischer et Meyer) Kurbatsky), остролодочника трехлисточкового (*Oxytropis triphylla* (Pall.) Pers.), остролодочника Попова (*Oxytropis popoviana* Peschkova) и астрагала хоринского (*Astragalus chorinensis* Bunge), произрастающих в Байкальском регионе. В ходе исследования получена уникальная информация об их микросимбионтах. В вегетационных опытах определено влияние таксономически разных штаммов, колонизирующих одни и те же клубеньки, на эффективность симбиоза и скорость формирования самих клубеньков. Проведено полногеномное исследование штаммов-микросимбионтов реликтовых бобовых растений, проанализированы генные системы, ответственные за становление растительно-микробных взаимоотношений, сделаны выводы о путях эволюции азотфиксирующего симбиоза и возможностях комплементации штаммов, относящихся к разным ризобияльным таксонам.

Научно-практическая значимость работы. Изучение уникального генетического материала коллекции:

1) будет способствовать развитию представлений об эволюции растительно-микробного симбиоза;

2) позволит совершенствовать систематику клубеньковых бактерий, которые являются одной из важнейших и агрономически ценных групп почвенных микроорганизмов;

3) выявит геномы ризобий, которые обладают комплементарными наборами генов, участвующих в выполнении взаимодополняющих задач в процессе становления и функционирования симбиоза;

4) позволит отобрать комбинации ризобий, которые могут быть использованы в качестве основы для производства комплексных микробных препаратов или направленного генетического конструирования штаммов, перспективных для сельского хозяйства.

Положения, выносимые на защиту:

1. С помощью современных методов геносистематики определено таксономическое положение клубеньковых бактерий пяти реликтовых бобовых растений из разных триб подсемейства Мотыльковые (*Papilionoideae* Rudd): чины низкой (триба Бобовые *Fabeae* Rchb.); копеечника щетинистого (триба Копеечниковые *Hedysareae* DC.); остролодочника трехлисточкового, остролодочника Попова и астрагала хоринского (триба Козлятниковые *Galegeae* Dumort), произрастающих в Байкальском регионе.

2. Описан новый вид клубеньковых бактерий *Phyllobacterium zundukense* (сем. *Phyllobacteriaceae*, порядок *Rhizobiales*), выделенных из клубеньков растения *Oxytropis triphylla* (Pall.) Pers.

3. Микросимбионты реликтовых бобовых имеют широкий спектр растений-хозяев, включающий различные виды и рода бобовых из триб *Galegeae* Dumort (*Astragalus* L., *Oxytropis* DC., *Glycyrrhiza* L.) и *Trifolieae* (Bronn) Endl. (*Trifolium* L.).

4. Описано явление комплементарного взаимодействия таксономически разных штаммов, занимающих одни и те же клубеньки, которое приводит к

появлению нового симбиотического фенотипа, отличного от формируемого каждым из штаммов отдельно.

Степень достоверности и апробация работы. Степень достоверности результатов исследований достигнута достаточным объемом полученных экспериментальных данных, проведением статистических обработок и выявлением достоверности различий.

Материалы диссертации были представлены на школе - конференции для молодых ученых «Экологическая генетика микробно-растительных взаимодействий» в рамках международной научной конференции PLAMIC 2018 г., на заседаниях Ученого Совета ФГБНУ ВНИИСХМ в 2019, 2021 гг. Материалы диссертации опубликованы в 7 статьях. Исследования поддержаны грантами Российского Научного Фонда: грант 16-16-00080 для микробиологии, молекулярной и биоинформатической работы; грант 17-76-30016 для фотографии клубеньков и растений; грант 17-14-01363 для получения флуоресцентно-меченых штаммов; грант 14-26-00094 для проведения вегетационных опытов и исследования симбиотических генов.

Длительное хранение изолятов в ВКСМ было поддержано Федеральным Агентством Научных Организаций (Программа развития и инвентаризации биоресурсных коллекций).

Личный вклад автора. Аспирантом самостоятельно выполнен патентно-информационный поиск и анализ научной литературы. Совместно с научным руководителем сформулированы цель и задачи исследования, разработана программа исследований и необходимых для ее осуществления методов. Автор непосредственно принимал участие в выделении и идентификации штаммов; криоконсервации; постановке, проведении и анализе результатов вегетационных опытов.

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из оглавления, текста диссертации, включающего введение, два раздела: обзор и анализ научно-технической и патентной информации и научно-экспериментальную часть;

заклучение и 2 приложения. Материалы диссертации изложены на 161 странице машинописного текста и содержат 14 таблиц и 21 рисунок. Библиографический список включает 207 источников, в том числе 80 отечественных и 127 зарубежных.

ОБЗОР И АНАЛИЗ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ И ПАТЕНТНОЙ ИНФОРМАЦИИ

ГЛАВА 1. РОЛЬ СИМБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЖИЗНИ РАСТЕНИЙ

1.1 Роль симбиоза в процессе эволюции живых организмов

Термин «симбиоз» (от греческого «symbiosis») означает сожительство, совместная жизнь. Его придумал немецкий ботаник и микробиолог Г. А. Де Бари в 1879 году. Он определил симбиоз как «явление совместной жизни разноименных организмов». Обращая внимание на то, что отношения между такими организмами могут значительно отличаться по характеру взаимодействия. Быть как мутуалистическими, так и антагонистическими [56, 80]. Степень зависимости друг от друга также может отличаться и быть от строго облигатной до факультативной. Симбионты могут по-разному располагаться в пространстве: один может проживать внутри клеток другого, на его поверхности или вовсе не иметь непосредственного контакта [52]. Кроме того, характер отношений между партнерами в симбиозе может изменяться в течение жизни или зависеть от определенных условий их существования [22].

В начале двадцатого века русским учёным К.С. Мережковским была предложена теория симбиогенеза. На её основе была создана новая система органического мира, в развитии которого симбиоз играет основную роль [42, 75]. По мнению автора теории: «только единственное царство – прокариотов – не является результатом симбиоза, а представляет собой непосредственное развитие первоначально появившихся организмов в лице первичных бактерий. Остальные два царства, растительное и животное, являются результатом симбиоза; животное – результатом простого симбиоза, а растительное – двойного симбиоза» [42, 61]. К

настоящему времени доказано симбиотическое происхождение митохондрий и пластид. Таким образом, многие исследователи полагают, что симбиоз индуцирует большие изменения и определяет становление новых форм жизни [105, 130, 156].

В рамках развиваемой в настоящее время концепции симбиогенетики, симбиозы относятся к биологическим комплексам, которые возникают вследствие функциональной и, порой, структурной интеграции генных систем неродственных организмов. В результате работы нового «надорганизменного» генома симбиотические партнёры могут осуществлять новые программы развития и проявлять адаптации, которые недоступны свободноживущим организмам [53].

Таким образом, можно предположить, что симбиоз является более мощным двигателем эволюции, чем конкуренция. И значение его неоспоримо для жизни и развития всех организмов, живущих на планете.

1.2 Разнообразие мутуалистических растительно-микробных симбиозов

Микроорганизмы, могут по-разному влиять на своего хозяина. Одни бактерии могут угнетать его развитие, вызывать болезни (антагонизм или патогенез), другие, наоборот, оказывать положительное воздействие (мутуализм). Мутуализм представляет собой сожительство двух разных организмов при котором оба возлагают друг на друга задачу регуляции своих отношений с внешней средой; в зависимости от характера и глубины этих связей, они могут принимать или не принимать метаболический характер, но всегда необходимы [17]. Мутуалистические симбиозы обычно подразделяют на трофические (микроорганизмы обеспечивают питание растений, в первую очередь азотное и фосфорное) и защитные (бактерии обеспечивают устойчивость растений к фитопатогенным микробам или к животным-фитофагам). В таксономическом плане микросимбионты весьма разнообразны, будучи представителями всех основных групп бактерий и грибов [52].

В литературе обычно отмечают четыре основные формы мутуалистического взаимодействия высших растений и микроорганизмов. Первая, ассоциативная форма, основана на взаимодействии растений и микроорганизмов, концентрирующихся в ризосфере (зоне, окружающей корни) и покрывающих поверхность корней. Метаболизм корней оказывает влияние на почвенную среду, так как продукты экзосмоса содержат различные вещества (сахара, аминокислоты, витамины и др.). В тоже время разнообразные процессы, которые протекают в ризосфере с участием свободноживущих микроорганизмов, определяют ход развития растений. Механизмы микробного воздействия на растения различны. Это может быть синтез различных метаболитов: фитогормонов, ингибиторов роста растений, антибиотиков и т.д. Многие свободноживущие бактерии способны к фиксации азота из атмосферы и могут контролировать поступление в корень минеральных элементов из почвы. Список микроорганизмов, которые способны к ассоциативной азотфиксации постоянно дополняется новыми видами. В настоящее время считается, что 80-90% всех известных бактерий способны к азотфиксации [2, 31, 72]. К наиболее активным и часто встречающимся на корнях растений диазотрофам относят виды: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Campylobacter* [2]. Разнообразие бактериальных сообществ в прикорневой зоне и ризоплане (зона расположения микроорганизмов, развивающихся непосредственно на корнях растений) определяется качественным и количественным составом корневых выделений, который зависит от вида, возраста и условий выращивания растений [25].

Второй тип мутуалистического взаимодействия наблюдается между растениями и эпифитными микроорганизмами. Бактерии заселяют надземные части растений, утилизируют их выделения и участвуют в разложении мертвых остатков. Они являются неотъемлемой частью ценоза растения. Чаще всего встречаются спорогенные и пигментные виды, споры различных плесневых грибов и дрожжей как наиболее устойчивые к высыханию и действию УФ-лучей.

Третий тип взаимоотношений представляет собой микоризу, тесную ассоциацию корней с грибами. Микоризы – это «целая группа симбиозов, весьма разнородная в таксономическом, генетическом и молекулярном отношениях» [66]. Считается, что арбускулярная микориза самая древняя. Она возникла около 400 - 450 млн. лет назад, в то время как симбиотические отношения между бобовыми растениями и ризобиями зародились около 60 - 70 млн. лет назад. Грибы обеспечивают хозяина питательными веществами, повышают устойчивость растений к фитопатогенам и абиотическим стрессам, некоторые регулируют развитие макросимбионта. Кроме питания и защиты, микоризные грибы объединяют растения различных видов в фитоценозах посредством единой гифальной сети и участвуют в формировании структуры почвы [66, 73].

Четвертый тип взаимоотношений представляет взаимовыгодный симбиоз бобовых растений и группы азотфиксирующих клубеньковых бактерий. Проникая в ткань корня растения-хозяина, они вызывают усиленное деление его клеток, что приводит к формированию клубеньков. Связь между симбиотическими партнерами происходит за счет сосудистой системы клубенька: растения снабжают бактерии углеводами и минеральными солями, бактерии отдают растению до 70% ассимилированного ими азота. Клубеньки, образованные на корнях многолетних растений, могут быть активны в течение долгих лет, а у большинства однолетних бобовых клубеньки отмирают в период цветения растения-хозяина. После разрушения клубенька клетки бактерий попадают в почву и становятся сапрофитами, как и другие почвенные организмы. Исключением являются бактериоиды, утратившие способность превращаться в свободноживущие клетки [37, 66].

1.3 Бобово-ризобиальный симбиоз

1.3.1 Эволюция бобово-ризобиального симбиоза

На основе анализа широкого круга экспериментальных и математических моделей Проворовым Н.А. и др. была предложена интегральная схема эволюции бобово-ризобиального симбиоза (БРС), включающая четыре этапа: анцестральный межклеточный симбиоз, примитивный внеклеточный мутуализм, внутриклеточный мутуализм и симбиоз альтруистического типа.

На первом этапе эндосимбиотические популяции ризобий были смешанными и состояли из фиксирующих и не фиксирующих N_2 штаммов. В корень растения они проникали через разрывы эпидермиса. Наиболее вероятные кандидаты на роль «первичных» ризобий - бактерии, имеющие близких родственников среди свободноживущих азотфиксаторов (предположительно, родственные родам *Rhodospirillum rubrum* и *Azospirillum*) [54, 55].

На втором этапе бактерии приобрели способность синтезировать Nod-факторы. Возник новый путь проникновения клеток ризобий через «скручивание» корневых волосков. Этап характеризуется появлением клональных популяций, которые находились в инфекционных нитях [54, 55].

На третьем этапе у бактерий появилось способность к внутриклеточному симбиозу. Бактероиды были слабо дифференцированы и сохраняли репродуктивную способность. Фиксация N_2 проходила в неспециализированных симбиосомах. В результате горизонтального переноса симбиотических генов в другие, неродственные виды, появились эпифитные (*Phyllobacterium*) или фитопатогенные (*Agrobacterium*) бактерии, а затем и «вторичные» ризобии (*Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*) у которых система генов, обеспечивающих симбиоз, собрана уже в отдельной плазмиде [54, 55]. Однако принадлежность ризобий к сотням видов, ограниченных дюжиной родов

Alphaproteobacteria и *Betaproteobacteria*, предполагает нечастый успешный перенос между родами, но частый успешный перенос внутри родов.

Для четвертого этапа характерно образование необратимо дифференцированных бактериоидов из «вторичных» ризобий. Они не способны к размножению, отличаются морфологией и имеют высокую нитрогеназную активность. Фиксация N₂ происходит в специализированных симбиосомах [54, 55].

Таким образом, эволюция симбиоза шла в направлении сбора симбиотических генов в одном организме, специализации штаммов и повышения экологической эффективности взаимоотношений.

1.3.2 Микроорганизмы, участвующие в формировании симбиоза с бобовыми растениями

Первые научные объяснения способности бобовых растений улучшать свойства почвы дал один из выдающихся французских агрохимиков Ж.-Б. Бусенго. Он предположил, что бобовые растения могут усваивать азот из воздуха. Однако только спустя десятилетия, немецкий ученый Г. Гельригель, установил, что в усвоении азота бобовым культурам помогают бактерии, которые развиваются на их корнях [61]. В 1888 году М. Бейеринк (M. Beijerinck) выделил клетки клубеньковых бактерий в чистую культуру. Первоначально они были названы М.Бейеринком *Bacillus radicicola*, однако в 1895 г. Б.Фрэнк предложил для них новое родовое имя, сохранившееся и в современной таксономии - *Rhizobium* [61, 66].

Ризобии представляют собой грамтрицательные бактерии, для которых характерна полиморфность форм. В основном это палочковидные и овальные микроорганизмы, хотя встречаются кокковидные, фильтрующиеся формы и L-формы. Они могут быть подвижными или неподвижными. Для быстрорастущих клубеньковых бактерий характерно перитрихиальное расположение жгутиков, для медленнорастущих — монотрихиальное. Размножаются делением, а с возрастом

могут переходить к почкованию. Колонии округлые, выпуклые, полупрозрачные, приподнятые, слизистые (характерно для быстрорастущих). Хорошо растут на агаре с дрожжевым экстрактом, маннитолом и минеральными солями [71].

Систематика ризобий длительное время основывалась на хозяйской специфичности по отношению к разным видам бобовых растений. Общепризнана классификация Л.М. Доросинского (1965), в основе которой лежит перекрестная инокуляция и ряд морфологических и культуральных свойств клубеньковых бактерий. Современные методы таксономии базируются на определении филогенетического родства между разными группами микроорганизмов (геносистематика) и не всегда могут совпадать с результатами традиционной классификации [4]. Благодаря появлению новых методов, позволяющих усовершенствовать генетическую и фенотипическую характеристику штаммов (ДНК-ДНК гибридизация, методы RFLP анализа и геномного фингерпринтинга, секвенирование генов «домашнего хозяйства», мультисубстратное тестирование и т.д.), было обнаружено огромное разнообразие ризобий. В настоящее время бактерии, способные образовывать клубеньки на бобовых растениях, относятся к двум классам протеобактерий, порядкам *Rhizobiales* (класс альфа-протеобактерии) и *Burkholderiales* (класс бета-протеобактерии) и включают представителей семи семейств: *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Burkholderiaceae*, *Brucellaceae* и *Hyphomicrobiaceae* [5].

Наибольшее число клубеньковых видов принадлежит роду *Rhizobium* (семейство *Rhizobiaceae*), который ранее включал в себя все известные клубеньковые бактерии. Однако впоследствии некоторые виды были переведены в другие таксоны на основании филогенетического анализа и сейчас род *Rhizobium* содержит всего 49 видов [7]. Семейство *Phyllobacteriaceae* представлено 2 родами, содержащими клубеньковые бактерии: *Phyllobacterium* и *Mesorhizobium* (включают более 30 видов клубеньковых бактерий). Семейство *Hyphomicrobiaceae* также содержит 2 рода, *Azorhizobium* и *Devosia*, в состав которых входят клубеньковые бактерии. Семейство *Bradyrhizobiaceae* содержит один род с

клубенькообразующими бактериями - *Bradyrhizobium* (включает 9 видов клубеньковых бактерий). В состав семейства также входят рода, например, *Bosea* и *Tardiphaga*, виды которых могут присутствовать в клубеньках бобовых растений, но самостоятельно их не образуют. Хотя в 2020 году Hordt A. et al. было предложено создание нового семейства *Boseaceae* fam. nov., куда и следует включить род *Bosea* [134]. В семействе *Methylobacteriaceae* описано 2 рода, содержащих клубеньковые бактерии - *Methylobacterium* и *Microvirga*. Бета-протеобактерии семейства *Burkholderiaceae* также включают два рода, в которые входят клубеньковые бактерии - *Burkholderia* и *Cupriavidus (Ralstonia/Wautersia)* [5, 88, 106, 107, 108].

Полный перечень видов клубеньковых бактерий можно найти на сайте Международного кодекса номенклатуры бактерий LPSN (<http://www.bacterio.cict.fr>), который курирует доктор Euzeby J.P. Ещё существует Новозеландский сайт современной таксономии ризобий (<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>), созданный доктором Weir B.S. Сайты регулярно обновляют и дополняют [5].

1.3.3 Развитие бобово-ризобиального симбиоза

Многие ученые занимаются исследованием процесса клубенькообразования у бобовых растений. В настоящее время накоплено значительное количество материала по этому вопросу. Процесс развития симбиоза включает три основных этапа – преинфекцию; инфекцию и развитие клубенька; функционирование клубенька [16, 66]. На первом этапе партнеры узнают друг друга: растение вырабатывает характерные флавоноиды, которые активируют гены вирулентности (Nod-гены) ризобий. Nod-гены кодируют синтез липоолигосахаридов (Nod-факторов), которые у растения-хозяина вызывают ответную реакцию: скручивание корневых волосков и инициацию клеточных делений в перицикле, внутренних и наружных слоях коры корня [66].

Второй этап включает процессы инфицирования и развитие клубеньков. В месте сгиба корневого волоска происходит разрушение клеточной стенки под действием пектолитических ферментов растения. Бактерии оказываются захвачены внутрь особой полости – инфекционной нити. Её стенки образованы растительными клетками, а внутреннее пространство заполнено матриксом, в образовании которого участвуют оба партнера. Параллельно с развитием инфекционной нити происходит закладка клубенькового примордия, где начинается формирование ткани клубенька и апикальной меристемы. После того как инфекционная нить достигнет основания корневого волоска и проникнет в растущий клубенек, бактерии путем эндоцитоза перейдут в состояние внутриклеточных симбионтов. Дистальные участки инфекционных нитей преобразуются в инфекционные капли, лишенные клеточной стенки. Они, в свою очередь, освобождаются в растительную цитоплазму в виде мембранных везикул и превращаются в бактериоиды. Далее происходит преобразование мембраны в перибактероидную (ПБМ), синтезируемую в основном растительной клеткой и частично ризобиями. Бактериальные клетки, окруженные общей ПБМ, называются симбиосомами и являются основной структурно-функциональной единицей симбиоза, которые ещё называют временными органеллами, ответственными за азотфиксацию [16, 66].

В результате этого процесса на поверхности корней образуются клубеньки. Морфология и число клубеньков строго определяется растением-хозяином, так как связано с большими затратами энергии. Со стороны растений важными признаками для отбора являются «азотфиксирующая активность (скорость восстановления N_2 в NH_4^+) и симбиотическая эффективность (способность растений интенсивно развиваться, используя симбиотрофное питание азотом, которая зависит от совместимости метаболических систем партнеров и отсутствия активных защитных реакций со стороны растений на проникновение ризобий)» [4].

Эффективность азотфиксации у клубеньковых бактерий зависит от целого ряда симбиотических признаков, к которым относят вирулентность, азотфиксирующую активность, конкурентоспособность и специфичность [16].

На молекулярном уровне эффективность бобово-ризобияльного симбиоза определяется наличием у микросимбионтов симбиотических генов (*Sym* - генов). Эти гены разделяют на группы в зависимости от выполняемой функции. Например, *Nod*-гены отвечают за биосинтез, модификации или секрецию *Nod*-факторов. *Nif*-гены кодируют синтез нитрогеназного комплекса и регулируют его активность. *Fix*-гены работают совместно с *nif*-генами и тоже играют важную роль в симбиотической азотфиксации [19]. *Sym* - гены могут находиться на участках хромосомы, ограниченных с двух сторон IS-подобными элементами (островки симбиоза), или в составе крупных плазмид (симбиотические плазмиды). Благодаря такому расположению симбиотические гены легко могут быть вовлечены в процессы горизонтального переноса генов. Центральную роль в этом процессе как раз играют мобильные генетические элементы (IS-элементы, транспозоны, интегроны, плазмиды), перенос генов может происходить как между штаммами внутри одного вида, так и между разными видами, родами, семействами или еще более высокими таксонами. В результате такого процесса появляются новые штаммы клубеньковых бактерий, которые могут отличаться по своим симбиотическим характеристикам [19].

1.3.4 Специфичность бобово-ризобияльного симбиоза

Под специфичностью следует понимать «способность неродственных организмов опознавать партнеров по симбиозу, способных обеспечить запуск программы взаимодействия, не функционирующей в отсутствие адекватного партнера» [18]. На молекулярном уровне специфичность бобово-ризобияльного симбиоза представляет собой обмен сигналами между партнерами. К настоящему времени большинство генов, участвующих в процессе клубенькообразования и

синтезе сигнальных молекул хорошо изучены [18, 62]. Есть общие гены (гомологичные), которые можно обнаружить у всех ризобий, способных к образованию клубеньков: *nodA*, *nodB*, *nodC*. Они контролируют синтез коровой части Nod-фактора. Есть гены, которые отличаются у различных видов или штаммов (гены хозяйской специфичности): *nodP*, *nodQ*, *nodH*, *nodF*, *nodE*, *nodL* и др. Эти гены кодируют ферменты, участвующие в синтезе жирнокислотного остатка и модификациях хитоолигосахаридного остова. И отдельно выделяют ген *nodD* - единственный ген вирулентности ризобий, который работает конститутивно [41]. Это единственный ген, обладающий свойствами рецептора растительного сигнала. Остальные *nod*-гены кодирует синтез ферментов, участвующих в синтезе Nod-факторов. Строение Nod-фактора определяет специфичность и характер взаимодействия бактерий с корневой системой растения [41, 66].

Большинство генов бактерий, участвующих в образовании клубеньков, избирательны по отношению к хозяину. Эти гены отвечают за взаимодействие определенного вида или штамма ризобий с конкретными видами или сортами растений. Выделяют два типа хозяйской специфичности, широкий и узкий, которые определяются структурой ацильной цепи и модификациями олигохитинового скелета Nod-фактора. Виды, имеющие широкую специфичность, более древние с точки зрения эволюции. Возникновение быстрорастущих видов с узкой хозяйской специфичностью характеризовалось появлением дополнительных генов. Одни отвечают за синтез и присоединение полиненасыщенных жирных кислот (например, гены *nodEF*). Другие связаны с модификациями хитоолигосахаридного остова. К примеру, для взаимодействия *S. meliloti* с люцерной важно наличие генов *nodP*, *nodQ*, *nodH*, которые отвечают за сульфатирование цепи в определенном месте. Ген *nodX* (кодирует ацетилирование) необходим для образования симбиоза между *R. leguminosarum* *bv. viceae* и «Афганскими» линиями гороха. Однако этот ген может быть заменен на ген *nodZ*, отвечающий за другую химическую модификацию (фукозилирование). Это говорит о поливариантности растительных рецепторов, узнающих Nod-факторы [62, 66]. Роль таких рецепторов выполняют

продукты растительных генов. Наиболее вероятные кандидаты это Nod-фактор-рецепторподобные киназы, содержащие домен LysM, которые могут участвовать не только в восприятии бактериального сигнала, но и в организации проникновения бактерий в корень. Другая рецептор-подобная киназа (receptor_like kinases, RLK) богата лейциновыми повторами, и её активность также необходима для симбиоза с ризобиями [18, 66]. Так как симбиотическая специфичность определяется узнаванием и сигналами обоих партнеров, то их следует изучать совместно.

Не менее важную роль в установлении симбиотических отношений играют поверхностные соединения микроорганизмов, к которым относятся экзополисахариды, липополисахариды, капсулярные полисахариды, циклические β -глюканы и др. Они отвечают за диалог ризобий с защитными системами растений. Вероятно, что взаимодействие ризобияльных экзополисахаридов с растительными лектинами также связано со специфичностью ризобий по отношению к растению-хозяину. Считается, что для нормального развития симбиоза необходимо наличие сигналов от обеих групп (Nod-факторов и поверхностных сигнальных соединений) [14, 66].

Таким образом, исследования природы рецепторов и генетического контроля специфичности взаимодействия микро- и макросимбионта позволяют вести научно обоснованный отбор наиболее эффективных пар, проводить селекцию на повышение специфичности взаимодействия и увеличение урожая.

1.3.5 Значение бобово-ризобияльного симбиоза в сельском хозяйстве

Сегодня особое внимание уделяется экологической рациональности, которая включает в себя разработку и практическое применение технологий, методов и средств, позволяющих получить экологически безопасные продукты питания, в том числе продукцию растениеводства и животноводства. Симбиотическая азотфиксация является одним из наиболее важных факторов развития систем экологически сбалансированного сельского хозяйства [67].

Бобовые растения (*Fabaceae* Lindl.), способные к симбиозу с почвенными клубеньковыми бактериями, насчитывают более 1500 видов и составляют значительную часть кормовых и пищевых культур, выращиваемых в мире. Они составляют более чем 25% мирового производства урожая. Способность к симбиотической азотфиксации позволяет выращивать бобовые растения как сидераты (зеленое удобрение) для улучшения азотного плодородия, химических и физических свойств почвы, тем самым уменьшая загрязнение окружающей среды минеральным азотом, вносимым как удобрение. Кроме того, использование бобовых в кормовых целях позволяет повысить их роль в формировании устойчивых агроэкосистем, а высокое содержание масла в семенах некоторых видов (*Glycine max* L. Merr., *Pongamia pinnata* L.) рассматривать их как потенциальные источники биологического топлива [15, 67].

Таким образом, бобовые растения, благодаря широкому спектру применения и своим способностям использовать ресурсы симбиотических микроорганизмов, в наибольшей степени соответствуют концепции адаптивного земледелия. Поэтому изучение растительно-микробных симбиозов и создание высокоэффективных систем, с максимальным потенциалом продуктивности растений, имеют важное значение для адаптивного сельского хозяйства [18, 81].

Накопленные научные результаты о механизмах бобово-ризобияльного симбиоза также позволяют в настоящее время ставить вопрос о возможности создания азотфиксирующего аппарата на основе симбиоза у не бобовых растений, прежде всего у злаковых культур [15].

ГЛАВА 2. ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ОТНОШЕНИЙ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО РОДСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

2.1 Подходы к определению таксономических отношений

Систематика микроорганизмов – это распределение микроорганизмов по группам (таксонам) в соответствии с их происхождением и биологическим сходством [16, 36]. Основные вопросы, которые рассматривает систематика: классификация, идентификация и номенклатура. Классификация занимается распределением организмов по таксономическим группам в зависимости от их сходства и родства. Номенклатура определяет название таксономических групп по международным правилам. Идентификация - процесс установления таксономического положения нового микроорганизма [62].

В настоящее время в микробиологии для классификации используется несколько основных способов.

Нумерический подход. Нумерическая (числовая) систематика основана на принципах, предложенных французским ботаником М.Адансоном (M.Adanson, 1727 - 1806): равноценность всех признаков; изучение максимально возможного числа признаков; определение степени сходства по количеству совпадающих признаков. Степень сходства выражается в виде коэффициента сходства и вычисляется попарно в виде отношения числа одинаковых признаков к общему числу изученных признаков. Значение коэффициента сходства может меняться в диапазоне от 1 (полная идентичность) до 0 (несовпадение ни по одному изученному признаку). Данные располагают в виде матрицы сходства. Затем строят дендрограмму, исходя из численных связей между ними. Нумерическая таксономия обеспечивает объективную и устойчивую основу для создания таксономических групп, позволяет тщательно изучить фенотипы, однако, в

отличие от филогенетической, не позволяет делать дополнительные выводы, касающиеся эволюции организмов [36].

Существует и ещё несколько отрицательных моментов нумерического подхода. Во-первых, это субъективный выбор тестов для определения признаков. Невозможно использовать одни и те же признаки для определения разных групп микроорганизмов. Во-вторых, количество исследуемых признаков составляет лишь малую часть от информации, содержащейся в геноме. В-третьих, «равные» признаки (с точки зрения данной систематики) несут неравное количество генетической информации. Также значение коэффициента сходства может меняться увеличиваясь (при нахождении новых сходных признаков) или снижаясь (при увеличении количества несовпадающих признаков) [36].

Хемотаксономический подход. Более совершенной стала хемотаксономическая систематика, разработанная Е. С. Смирновым (1969). В основу построения данной систематики легли результаты изучения физиолого-биохимических характеристик, как наиболее распространенный метод установления таксономической принадлежности исследуемых микроорганизмов. «Хемотаксономические» методы предусматривают использование аналитических методов при сборе информации, касающейся различных химических составляющих клетки, для классификации бактерий [36]. Систематика, основанная на изучении этих характеристик, в последние годы получила новые перспективы в связи с разработкой и внедрением в практику экспресс - тестов определения энзиматической активности, позволяющие сделать процедуру выявления и идентификации микроорганизмов более быстрой, удобной, чувствительной и специфичной. Основой таких систем является технология мультисубстратного тестирования. Культура растет в присутствии различных субстратов с добавлением редокс-индикатора, который изменяет цвет в ответ на метаболическую активность клеток. В качестве субстратов обычно выбирают источники основных биогенных элементов (углерод, азот, фосфор и др.) и физиологически активные вещества (антибиотики, витамины, гормоны и т.п.). А также вещества, влияющие на

кислотность среды или осмотические свойства, интермедиаты основных метаболических путей и т.д. Идентификация бактерий проводится с помощью компьютерных программ путем сравнительного анализа реакций исследуемого микроорганизма с результатами реакций индикаторных бактерий, хранящимися в базе данных для данного теста [20, 63].

Передовая фенотипическая технология Biolog позволяет идентифицировать микроорганизм на уровне вида и, в отличие от молекулярных методов, дает дополнительную информацию о свойствах штаммов. Технология утилизации углеродных источников BioLog идентифицирует микроорганизмы путем создания характерной картины или «метаболического отпечатка пальца» от химических реакций, проводимых в 96-луночном микропланшете. Культурные суспензии определенной концентрации раскапывают в специальные планшеты (существует 7 вариантов компоновки субстратов), инкубируют, читают и сравнивают полученный фенотипический профиль с соответствующей базой данных. В рамках идеологии существуют три концепции: ID MicroPlate™, EcoPlate™ и Phenotype MicroArrays™. С помощью данной технологии возможно идентифицировать около 2900 видов бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов [20].

В настоящее время разработаны модификации этого метода, которые отличаются наборами органических субстратов, которые, по мнению авторов, с наибольшей вероятностью можно встретить в природных условиях. Например, систему «Эколог», разработанную М.В. Горленко и П.А. Кожевиным, используют для изучения природных микробных сообществ. Она помогает определить спектр органических субстратов, которые используют микроорганизмы, и позволяет рассчитать количество употребленных субстратов [27]. Метод можно применять для оценки качества почв, типа и степени воздействия неблагоприятных факторов на почвенные местообитания. Использовать при мониторинге состояния почв и разработке методов ремедиации.

Метод мультисубстратного тестирования можно использовать как высокотехнологичный и эффективный способ идентификации микроорганизмов, а

также для определения физиологических свойств известных видов или при описании новых.

Генетический подход. Геносистематика (или молекулярная систематика) оценивает родство организмов, исходя из сходства или различия их геномов. Применение молекулярно-биологического подхода позволяет сравнивать отдаленные организмы, которые могут совсем не иметь общих фенотипических признаков [68].

Генетический материал любого организма содержит информацию обо всем многообразии свойств данного организма, в том числе и о характерных видовых признаках, лежащих в основе систем классификации и идентификации. Гены, кодирующие данные биологические признаки (структурные компоненты клеток; компоненты клеточных мембран; синтез ферментов, осуществляющих определенные биохимические реакции; синтез токсинов, характерных продуктов метаболизма; структура и состав антигенов и т.п.), имеют строго определенную, уникальную для каждого микроорганизма нуклеотидную последовательность, которая может служить диагностическим маркером и используется для выявления и идентификации микроорганизмов. В отличие от биохимических и иммунохимических тест-систем, исследующих продукты считывания генетической информации (продукты генов), идентификация микроорганизмов с помощью ДНК-диагностики осуществляется по наличию или отсутствию определенных генов и их фрагментов, и уникальности их структуры у каждого микроорганизма [13].

Основой для геносистематики микроорганизмов являются методы ПЦР и гибридизации нуклеиновых кислот [74, 149].

2.2 Определение филогенетического родства микроорганизмов

2.2.1 Определение генетического сходства путем секвенирования генов

«Секвенирование нуклеиновых кислот – это определение их нуклеотидной последовательности. В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде» [74].

Для идентификации бактерий и создания филогенетической системы их классификации наиболее часто используют нуклеотидные последовательности рибосомальных РНК (рРНК). Выбор именно этих генов обусловлен, прежде всего, особенностями структуры молекул рРНК и их повсеместной распространенностью во всем живом мире. Молекулы 16S и 23S рРНК содержат участки с самой высокой степенью генетической стабильности и эволюционируют только в процессе спонтанного мутирования, который происходит с постоянной скоростью. Накопление мутаций зависит лишь от времени. Таким образом, информация о последовательности нуклеотидов в этих молекулах является наиболее объективной для определения филогенетического родства организмов от подвида до царства [48]. Однако для получения точных результатов не следует ограничиваться изучением лишь одного генетического локуса, даже весьма информативного.

Выбор генов рРНК в качестве референтного генетического материала накладывает и некоторые ограничения. Последовательность гена 16S рРНК может быть достаточно консервативной, чтобы разделить популяции близкородственных видов. В таких случаях можно амплифицировать и секвенировать межгенную транскрибируемую область (ITS) и ген 23S рРНК (он примерно в 2 раза длиннее и содержит несколько высоковариабельных областей). Таким образом могут быть получены профили фрагментов ДНК, характерные специфичной таксономической группе микроорганизмов [48, 62].

В качестве филогенетических маркеров для классификации и идентификации микроорганизмов используют также гены «домашнего хозяйства» *dnaA*, *recA*, *rpoD*, *gyrB*, *hsp60* и другие [195]. Однако определение таксономического положения изолята путем анализа сиквенсов различных генов может дать неоднозначные результаты вследствие того, что полнота баз данных

последовательностей маркерных генов различных микроорганизмов достаточно низкая.

2.2.2 Мультилокусный анализ последовательностей (MLSA)

В настоящее время широко используется метод идентификации микроорганизмов на основе мультилокусного (мультигенного) анализа геномов. Метод мультилокусного анализа последовательностей MLSA (multilocus sequence analysis), представляет собой развитие метода мультилокусного секвенирования MLST (multilocus sequence typing), предложенного Maiden и др. в 1998 году для микробного типирования в молекулярной эпидемиологии. Метод заключается в определении нуклеотидной последовательности небольших фрагментов (около 500 пар нуклеотидов) определенных генов и сравнении их с соответствующими последовательностями у других организмов. В большинстве случаев анализируют гены, которые необходимы для жизнедеятельности микроорганизмов, а значит присутствуют у всех. Их называют гены «домашнего хозяйства», они имеют низкую скорость накопления мутаций и многие из них являются селективно нейтральными. Количество генов для каждого исследования может быть разным, но чаще всего для анализа выбирают 7-8 локусов. Такое количество не требует больших затрат времени, труда и средств на анализ и в то же время обеспечивает достаточную разрешающую способность метода [195]. Метод MLSA может успешно применяться для разделения близкородственных микроорганизмов, когда одного гена 16S рРНК недостаточно. Например, уже показано, что филогения по локусам *atpD* и *recA* для микросимбионтов бобовых соответствует таковой по гену 16S рРНК [124]. Также метод мультилокусного анализа был успешно применен при идентификации и систематике нового ризобияльного рода и вида *Tardiphaga robiniae*, где было использовано 5 генов «домашнего хозяйства» [91]. Во многих исследованиях MLSA был рекомендован как многообещающий промежуточный

метод для замены ДНК гибридизации при определении вида. Тем не менее, метод по-прежнему нуждается в четких рекомендациях и улучшениях [127].

2.2.3 Анализ профилей ДНК, полученных путем рестрикции тотальной ДНК

Существует несколько подходов для определения генетических расстояний на основе рестрикционного анализа.

Для ПДРФ-анализа (анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов) используют рестрикты тотальной ДНК, полученные с помощью ферментов эндонуклеаз. Фрагменты разделяют по молекулярной массе методом гель-электрофореза. При использовании ПЦР-ПДРФ-анализа специфические районы генома сначала амплифицируют в ходе полимеразной цепной реакции, а затем продукты амплификации обрабатывают рестриктазами. Полученные рестрикционные фрагменты разделяют методом гель-электрофореза. Профили полос, получаемые методами ПДРФ и ПЦР-ПДРФ с использованием различных ферментов, используют для оценки генетического разнообразия исследуемых образцов. Результаты обрабатывают, оценивая дивергенцию последовательностей в тех рестрикционных фрагментах, которые являются общими [89].

Оба типа ПДРФ-анализа имеют определенные ограничения. Прежде всего, они отражают дивергенцию только очень маленьких областей генома, которая может не совпадать с дивергенцией целого генома. Кроме того, изменение копийности генов может также повлиять на определение генетического расстояния. В настоящее время метод в значительной степени устарел из-за появления недорогих технологий секвенирования ДНК, однако RFLP-анализ был первой техникой профилирования ДНК, достаточно недорогой, чтобы найти широкое применение в картировании генома и локализации генов.

Анализ геномов методом полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (AFLP- Amplified fragment length polymorphism) является высокочувствительным методом обнаружения полиморфизмов в ДНК. Однако

полученные данные оцениваются не как полиморфизмы длины, а как полиморфизмы присутствия-отсутствия [200]. ДНК обрабатывается двумя рестриктазами: редкощепящей рестриктазой (например, EcoRI) и частощепящим ферментом (например, MseI). К концам полученных рестриктов присоединяют адаптеры – короткие двухцепочечные фрагменты ДНК, последовательность нуклеотидов которых включает коровую и фермент-специфическую последовательность. Отбор рестрикционных фрагментов достигается путем использования праймеров, комплементарных последовательности адаптера, последовательности сайта рестрикции и нескольких нуклеотидов внутри фрагментов сайта рестрикции. Именно эти рестрикты геномной ДНК амплифицируют в ходе ПЦР, продукты амплификации разделяют методом гель-электрофореза либо с помощью инструментов автоматического капиллярного секвенирования. Применение различных рестриктаз и вариация селективной последовательности на 3'-концах праймеров позволяет на основе геномной ДНК методом AFLP получить различные наборы фрагментов, формирующих профили генома [163]. Анализ геномов методом полиморфизма длин амплифицированных фрагментов является высокочувствительным методом и успешно применяется для изучения дивергенции близкородственных микроорганизмов.

2.2.4 Полногеномное секвенирование

Первые подходы для проведения секвенирования были разработаны шведским биохимиком Эдманом П.В. (метод секвенирования белков), затем Максам А. и Гилберт У. предложили метод химической деградации ДНК. А в 1977 году Сэнгер Ф. с коллегами представили метод "обрыва цепи" для расшифровки первичной структуры ДНК. Этот метод наиболее распространен и считается «золотым стандартом» [24].

Дальнейшее развитие технологий привело к созданию новых перспективных методов секвенирования следующего поколения (next generation sequencing, NGS).

Технология включает пространственно-разделенную полимеразную репликацию большого количества отдельных молекул ДНК, зафиксированных на твердой матрице (плоской подложке или микросфере), а затем циклическое секвенирование. В результате одновременно (параллельно) происходит прочтение большого количества относительно коротких фрагментов ДНК [24, 30]. Существуют различные NGS-платформы (Illumina, Thermo Fisher Scientific (США) и др.), однако в основе большинства технологий лежит общий алгоритм постановки анализа: создание библиотеки ДНК; клональная амплификация каждого фрагмента ДНК методом ПЦР; автоматическое пошаговое считывание каждого типа нуклеотида и детекция результата [1].

Третье поколение платформ ДНК-секвенирования отличается от второго тем, что первичная амплификация ДНК больше не требуется. Технология такого «одномолекулярного» секвенирования отличается отсутствием ошибок, которые возникают при амплификации ДНК, большой пропускной способностью, высокой скоростью чтения и более длинными рядами [1].

Полученные в результате секвенирования данные требуют дальнейшей обработки. Первый этап включает выбраковку последовательностей низкого качества и коррекцию ошибок. Для этого существуют различные программы, например, Coral (CORrection with Alignments), которая легко адаптируется к разным видам ошибок [1, 184].

На втором этапе происходит поиск совпадающих участков, короткие цепочки нуклеотидов собираются в одну или несколько длинных последовательностей, состоящих из перекрывающихся фрагментов ДНК (контиги). Далее они объединяются в скаффолды (упорядоченные контиги с заданным расстоянием между ними). Для выравнивания и объединения может использоваться референсный (проверочный) геном или референсные нуклеотидные последовательности (если имеются). Если нет, то сборка происходит *de novo* (заново). Для выравнивания с референтным геномом используют такие программы, как BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), Clustal (ClustalW, ClustalX и Clustal

Omega), MAQ (Mapping and Assembly with Quality), SeqMap, MUSCLE, MAFFT и др. Если сборка идет *de novo*, то используют такие компьютерные программы как SOAP *de novo*, Velvet, Euler и другие [1, 115, 137, 142, 148].

Третий этап включает определение и анализ филогенетических связей. Сравнивают с уже известными нуклеотидными последовательностями, которые можно найти в специальных базах данных. Для сравнения используют программы BLAST (наиболее популярна), MEGAN, RITA, Naïve Bayes и др. Наиболее востребованной базой данных является GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), но существуют и другие [1]. Для метагеномного анализа разработана комплексная программа QIIME (quantitative insights into microbial ecology), которая включает в себя множество других программных пакетов и имеет открытый исходный код [1, 97].

Для оценки эволюционных расстояний, построения филогенетических деревьев и вычисления основных статистических величин на основе молекулярных данных наиболее популярна программа MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Она включает в себя различные методы и инструменты для проведения филогенетического анализа [191].

2.2.5 Определение сходства геномов путем реассоциации ДНК

Анализ реассоциации ДНК (воссоединение в ходе процесса отжига разделенных в результате денатурации цепей ДНК) позволяет оценивать сложность генома, содержание уникальных и повторяющихся нуклеотидных последовательностей и частоту их повторяемости в геноме. Сравнение ДНК у двух организмов позволяет определить процент сходства (различия) между ними. Предполагается, что гомология ДНК у близкородственных видов составляет 20-60%, внутри вида - 60-100%, а для разных подвидов - 60-70%. Но четких границ для интерпретации результатов нет, так как существует большой разброс величин гомологии для близкородственных видов [13, 24, 128]. Идентификация любого

нового вида включает в себя определение сходства ДНК с ближайшим типовым штаммом и описание характерных для вида свойств. Однако необходимо обладать умением правильно трактовать полученные значения в контексте общей филогенетической информации [62].

2.2.6 Метод Average Nucleotide Identity (ANI)

В качестве хорошей альтернативы трудоемкому методу ДНК-ДНК гибридизации, был предложен подсчет средней идентичности нуклеотидов (ANI) в геномах сравниваемых бактерий (достаточно всего 20% длины полной последовательности). Это более современный и надежный метод. Значение ANI 95-96% хорошо коррелирует с уровнем 70% ДНК-ДНК гибридизации – пороговым значением сходства ДНК штаммов, относимых к одному виду. Однако эти значения нельзя считать абсолютными границами, если они не согласуются со всей фенотипической и филогенетической картиной [63, 87, 128, 171].

Вычисление ANI обычно включает фрагментацию последовательностей генома, а затем поиск нуклеотидной последовательности, выравнивание и идентификацию. Исходный алгоритм вычисления ANI использует программу BLAST в качестве своей поисковой системы. Значения ANI основаны на парном выравнивании участков генома. Надежность их результатов напрямую зависит от количества и качества выровненного фрагмента ДНК [128, 205].

Для обработки данных используют программное обеспечение JSpecies предназначенное для расчета ANI (Richter and Rosselló-Móra, 2009). Здесь можно рассчитать ANI, используя BLAST, как было предложено Горисом и его коллегами. Кроме того, есть альтернативный расчет ANI на основе MUMmer [110, 144], который предназначен для сравнения более длинных геномов, позволяет избежать предыдущих манипуляций с последовательностями и дает более быстрые результаты, чем BLAST. Оба алгоритма оказывают почти идентичные результаты, особенно в диапазонах ANI > 90%, которые должны учитываться при описании

вида. Улучшенный алгоритм ANI, называемый OrthoANI, разработан с учетом концепции ортологии и позволяет ускорить обработку данных без потери точности. Веб-сервис, который можно использовать для вычисления OrthoANIu между парой последовательностей геномов, доступен по адресу <http://www.ezbiocloud.net/tools/ani>. Для крупномасштабных расчетов существует автономная программа JAVA (<http://www.ezbiocloud.net/tools/orthoaniu>.) [205].

В дополнение к ANI, в программе можно провести расчет корреляционных индексов тетрауклеотидных сигнатур между парными геномными сравнениями. Этот параметр рассчитывается путем анализа без выравнивания и из-за скорости вычислений позволяет сравнивать большой набор геномов. Коэффициент корреляции частот тетрауклеотидов (TETRA) основан на подсчете частоты встречаемости тетрауклеотидов и определении линейной регрессии. У двух родственных геномов (штаммов одного вида) коэффициент TETRA высокий, у менее родственных – ниже [63, 193].

Кроме того, предложены и другие параметры, позволяющие оценить родство микроорганизмов, например, индекс максимально уникальных совпадений (MUM), определяемый по формуле: $MUM_i = 1 - L_{mum} / L_{av}$, где L_{mum} представляет сумму длин всех неперекрывающихся MUM, а L_{av} – средняя длина двух сравниваемых геномов. Значения, близкие к 0, характерны для очень похожих последовательностей, тогда как значения близкие к 1 для удаленных геномов [111].

Все эти параметры призваны помочь оценить эволюционный и видовой статус штамма. Однако значение ANI, в настоящее время, остается непревзойденным, потому что, более точно, отражает то, что происходит, когда две ДНК гибридизуются в ходе эксперименте [187]. Метод ANI уже был использован, например, для описания новых видов *Burkholderia*, *Geobacter* и *Vibrio*, а также для характеристики нового подвида *Francisella*, рода *Sphaerochaeta* и нового класса *Dehalococcoidetes* [133, 150, 158, 172, 198]. Таким образом, расчеты ANI являются одним из многих аспектов и подходов, которые могут быть получены из сравнительных геномных данных и использованы в таксономических целях.

ГЛАВА 3. РЕЛИКТОВЫЕ БОБОВЫЕ РАСТЕНИЯ И ИХ МИКРОСИМБИОНТЫ

3.1. Байкальский регион как центр генетического разнообразия бобовых растений

В списках редких и исчезающих растений, включенных в «Красную книгу Российской Федерации» (<https://redbookrf.ru>) числится немало реликтовых видов [50, 65]. В геоботаническом понимании «реликт — это вид, в прошлом многочисленный на данной территории, но затем, в силу изменений условий обитания, в большей части вымерший и сохранившийся лишь в немногих изолированных местах» [22]. Принадлежность растения к реликтам определяется по ботанико-географическим и палеоботаническим данным. Они включают информацию о времени появления вида, о его роли в составе растительности прошлых эпох, о характере ареала. Ареал может быть изолирован или разорван, в случае широкого распространения вида в прошлом. Часто реликты находятся на стадии вымирания и занимают сокращающийся ареал. Однако при изменении условий на благоприятные они могут восстанавливаться и быть источниками развития новых форм. Основная причина реликтовости кроется в изменении природных и климатических условий, связанных с оледенениями. Важную роль играют также геоморфологические, эдафические и биотические факторы [25].

Реликтовые растения в первую очередь стоит искать в центрах генетического разнообразия растений. Одним из таких центров биоразнообразия является Байкальский регион, благодаря своему географическому расположению, геохимическим процессам и климатическим параметрам. Ученые рассматривают Байкальский регион как самоорганизующуюся рифтовую экосистему, которая отличается уникальным биоразнообразием и устойчивостью. Многократные оледенения и межледниковые периоды, глобальные колебания климата и изменение ландшафтов привели к формированию новых экосистем и появлению

большого числа новых видов. В то же время, длительная географическая изоляция, например, острова Ольхон от высоких гор Прибайкалья привела к сохранению реликтов, эндемиков и процессов видообразования. Также во внутренних частях Саяно-Хангайского горного массива можно наблюдать своеобразный очаг достаточно древнего эндемизма [46].

В границах Байкальской природной территории (БПТ) находятся 5 заповедников, 4 национальных парка, 22 заказника, 1 природный парк, 128 памятников природы, 1 ботанический сад, а также лечебно-оздоровительные местности и курорты (<http://geol.irk.ru/baikal/>). Все они являются охраняемыми природными территориями, цель которых сохранение уникальной экосистемы региона. На БПТ произрастает более 2000 видов сосудистых растений. Из них не менее 53 видов распространено только на БПТ и, кроме этого, не встречается нигде в мире, т.е. является эндемиками данного природного объекта. Более 80 видов сохранилось здесь с ледникового и доледникового периодов [69]. Много реликтовых видов встречается среди такого крупного семейства как *Fabaceae* Lindl., особенно богаты ими рода *Hedysarum*, *Oxytropis* и *Astragalus* [32]. Одни из них являются узколокальными эндемиками. Например, представитель арктоальпийской флоры ледникового периода - остролодочник трехлисточковый *Oxytropis triphylla* (Pall.) Pers., или реликт миоценовой пустынно-степной флоры - копеечник зундукский *Hedysarum zundukii* Peschkova. Другие же представители реликтовой флоры, наоборот, довольно распространены. Например, карагану гривастую *Caragana jubata* (Pall.) Poir. (Shag-Spine) - реликтовое бобовое растение древнесредиземноморской флоры - можно встретить на сухих гравийных склонах от Сибири до Монголии, Китая и Тибета. Или остролодочник трагакантовый *Oxytropis tragacanthoides* Fisch. в Иркутской области обитает только в Ольхонском районе, однако встречается в других регионах России и за её пределами [11, 32].

На территории Байкальского региона описан 121 вид и 15 родов из семейства Бобовые (*Fabaceae* Lindl.). Наиболее распространены на данной территории растения родов Остролодочник (*Oxytropis* DC.) и Астрагал (*Astragalus* L.) [23].

Род Астрагал (*Astragalus* L.) - крупнейший род цветковых растений и самый большой в семействе *Fabaceae*. Он насчитывает около 3000 видов¹. Представлен однолетними и многолетними травами, полукустарниками, реже кустарниками. Ареал рода охватывает аридные, субаридные и умеренные области обоих полушарий. Наибольшего разнообразия род достигает в области Передней и Средней Азии, а за её пределами число видов рода резко падает. Места обитания представлены, в основном, каменистыми склонами, осыпями, лугами, лесными опушками, зарослями кустарников, прибрежными песками, галечниками и степями. В Забайкалье встречается 31 вид, многие из них имеют массовое распространение: *A. тонкий* (*A. tenuis* Turcz.), *A. приподнимающийся* (*A. adsurgens* Pall.), *A. монгольский* (*A. mongholicus* Bunge), *A. даурский* (*A. dahuricus* (Pall.) DC.). Некоторые виды, как например, *A. светло-красный* (*A. miniatus* Bunge), *A. перепончатый* (*A. membranaceus* (Fisch. ex Link) Bunge), *A. холодный* (*A. frigidus* (L.) A.Gray), *A. Шелихова* (*A. Schelichovii* Turcz.), *A. ольхонский* (*A. olchonensis* Gontsch.), *A. шелковисто-седой* (*A. sericeocanus* Gontsch.) занесены в Красные книги областей и/или Красную книгу РФ как редкие, эндемичные или уязвимые виды [12, 26, 38].

Род Остролодочник (*Oxytropis* DC.) включает около 600 видов¹ и является вторым родом многолетних растений семейства Бобовые по числу видов. Встречаются также полукустарнички или кустарнички высотой до 1 метра. Род отличается довольно неясной филогенией. Некоторые таксоны могут быть подвидами или одной разновидностью. Виды рода обитают в холодном, умеренном и субтропическом поясах Северного полушария, в горах Средней и Центральной Азии. Растут в горных тундрах, по каменистым склонам, горным степям и лугам. В Забайкалье встречается 35 видов, из которых часть занесены в Красные книги областей и/или Красную книгу РФ: *O. волосистоножковый* (*O. lasipoda* Bunge), *O. кодарский* (*O. kodarensis* Jurtzev et Malyshev), *O. Комарова* (*O. komarovii* Vassilcz.), *O. лесной* (*O. sylvatica* (Pall.) DC.), *O. Стукова* (*O. stukovii* Palib.), *O. томпудский*

¹ Данные по количеству видов взяты с сайта «The Plant List», <http://www.theplantlist.org/>. Дата обращения 12. 06. 2022.

(*O. tompudae* Popov), *O.* чернеющий (*O. nigrescens* (Pall.) Fisch. ex DC.), *O.* шерстистый (*O. lanata* (Pall.) DC.), *O.* трехлисточковый (*Oxytropis triphylla* (Pall.) Pers.), *O.* баргузинский (*O. bargusinensis* Peschkova), *O.* промежуточный (*O. interposita* Sipl), *O.* Варлакова (*O. varlakovii* Serg.) и др. [12, 38, 70].

Род Копеечник (*Hedysarum* L.) из семейства Бобовые включает около 200 видов¹. В основном это многолетние травы, невысокие кустарники или полукустарники. Распространены они преимущественно в умеренном, реже в холодном поясах северного полушария и в Северной Африке. На территории бывшего Советского Союза насчитывается 126 видов этого рода. Подавляющее их число находится в Средней Азии. В Забайкалье произрастает всего 8 видов, однако встречаются они по всей территории региона. В основном, растут в увлажненных местах (лесах, лугах, по долинам рек), а также в высокогорье. Могут образовывать копеечниковые луга. Наиболее распространен в Байкальском регионе К. альпийский (*H. alpinum* L.). Вид входит в состав шмидтоосоковых лугов и часто образует обширные заросли площадью до нескольких гектаров. Также, довольно часто встречается вид К. Гмелина (*H. gmelinii* Ledeb.) - плейстоценовый реликт южносибирского происхождения. Однако он достаточно редок на европейской части России, и в некоторых регионах и областях занесен в Красные книги. Присутствуют на территории Байкальского региона также и узколокальные эндемики, например К. зундукский (*H. zundukii*), который можно обнаружить только в России в Иркутской области на склонах Приморского хребта, обращенных к акватории озера Байкал между мысами Отто-Хушун и Зама, а также на мысе Зундук. Ещё один эндемик К. предбайкальский (*H. cisbaicalense* Malyshev) произрастает только на территории Байкало-Ленского заповедника и Прибайкальского национального парка [38, 77].

Род Чина (*Lathyrus* L.) включает около 200 видов¹ однолетних и многолетних трав. Произрастают они в районах умеренного климата Северного полушария, в Южной Америке, северо-западной Африке, Средиземноморье, на Дальнем Востоке и в Китае. На территории России описано 40 видов некультуренной чины.

В Забайкалье обнаружено всего 9 видов. Наиболее распространены Ч. волосистая (*L. palustris*, subsp. *pilosus* Cham.), которая является одним из основных компонентов чиновых шмидтоосоковых лугов, а также Ч. приземистая (*L. humilis* (Ser.) Spreng.) и Ч. луговая (*L. pratensis* L.). На западе Иркутской области встречается реликт ледникового периода Ч. Гмелина (*L. gmelinii* (Fish.) Fritsch.). Ещё один вид, Ч. весенняя (*L. vernus* (L.) Bernh.) хотя и имеет довольно широкий ареал обитания, однако в Иркутской области и в Москве занесена в Красные книги как редкое и находящееся под угрозой исчезновения растение [11, 38].

В Байкальском регионе также встречаются бобовые растения таких родов как: Вика (*Vicia* L.), Гюldenштедтия (*Gueldenstaedtia* Fisch.), Донник (*Melilotus* Mill.), Карагана (*Caragana* Fabr.), Клевер (*Trifolium* L.), Люцерна (*Medicago* L.), Леспедеца (*Lespedeza* Michx.), Мелилотоидес (*Melilotoides* Heist. ex Fabr.), Солодка (*Glycyrrhiza* L.), Термопсис (*Thermopsis* R.Br.) и Эспарцет (*Onobrychis* Mill.) [51].

Таким образом, семейство Бобовые является одним из крупнейших во флоре Байкальского региона с большим количеством редких эндемичных и реликтовых видов. Большая часть этих видов встречается в виде малочисленных и изолированных популяций. Численность их снижается вследствие антропогенного воздействия, низкого генетического разнообразия и природно-климатических изменений. Поэтому необходима правильная стратегия охраны и всестороннее изучение редких видов бобовых растений на данной территории [59].

Довольно много известно о флоре Байкальского региона благодаря работам таких ученых как М. Г. Попов, Л. И. Малышев, Г. А. Пешкова, Г. В. Матященко и Б.Б. Намзалов [39, 40, 45, 50]. Кроме того, в настоящее время, в Сибирском институте физиологии и биохимии растений под руководством к.б.н. Верхожиной А. В. ведутся комплексные работы по изучению и сохранению редких видов растений байкальского региона, в рамках которых осуществляется поиск и картирование их местонахождений, изучение состояния и мониторинг популяций. В 2013 году создана информационно-аналитическая система по фиторазнообразию Байкальской Сибири (<http://www.sifibr.irk.ru/institute/departments/depbiores.html>).

Поэтому данный регион достаточно привлекателен и перспективен для поиска популяций реликтовых бобовых растений с целью изучения их симбиотических отношений с микроорганизмами.

3.2. Генетические исследования микросимбионтов реликтовых бобовых растений

Существует большое количество работ по изучению клубеньковых бактерий. Однако первые в мире сведения о штаммах, изолированных из клубеньков реликтового бобового растения (Вавиловии прекрасной), появились только в 2014 году. Вавиловия прекрасная (*Vavilovia formosa* (Steven) Fed.) является наиболее близким родственником вымершего общего предка трибы *Fabeae* – группы бобовых растений, включающей также горох, вику, чину и чечевицу [178]. Результаты многофазной идентификации выделенных штаммов показали, что большинство из них тесно связаны с быстрорастущими группами *Rhizobium leguminosarum* и *Phyllobacterium* sp., но несколько штаммов принадлежали медленно растущим видам *Tardiphaga robiniae* и *Bosea* sp. Штаммы *T. robiniae* были выделены из клубеньков вавиловии как сопутствующие быстрорастущим штаммам, принадлежащим родам *Phyllobacterium* и *Rhizobium* [178, 179, 180]. Дальнейшие исследования показали возможность того, что *Tardiphaga* может участвовать в формировании пула *sym*-генов в клубеньковой популяции и вносить вклад в совокупный симбиотический «пангеном» данной популяции [33, 102]. А обнаружение штаммов разных таксономических групп в одном клубеньке, позволило предположить их совместное участие в формировании симбиотических отношений с растением-хозяином и наличие у таких штаммов взаимодействий синергического характера. Предложенная гипотеза заключается в том, что такие микросимбионты, при совместном инфицировании клубенька могут, положительно влияя друг на друга, повышать эффективность образования и функционирования симбиоза. Вероятно, что такие штаммы могут дополнять друг

друга симбиотическими генами и/или характером их экспрессии в зависимости от конкретных условий. Известно, что совместное использование нескольких штаммов ризосферных микроорганизмов, характеризующихся различными свойствами и механизмами взаимодействия с растением, приводит к повышению урожайности (или продуктивности) не бобовых растений [9, 94, 165]. Данный прием основан на суммировании полезных свойств штаммов, положительных взаимодействиях между ними, расширении экологической пластичности инокулянтов и реализации принципов аддитивности и синергизма.

Важно также отметить, что реликтовые растения могут обладать необычайно широким спектром микросимбионтов, что было показано не только на примере вавиловии прекрасной (новый вид - *Bosea vaviloviae*) [178, 179, 180], но и караганы гривастой (*Caragana jubata* (Pall.) Poir.) [186] и чины Гмелина (*L. gmelinii* Fritsch) [3]. Например, из клубеньков караганы гривастой, произрастающей в Монголии, был выделен новый вид семейства *Boseaceae* - *Bosea caraganae*, содержащий несколько симбиотических генов *nol*, *nod*, *nif* и *fix* [186].

Из клубеньков чины Гмелина (*L. gmelinii* Fritsch), также относящейся к реликтовым растениям, были выделены бактерии, близкие по последовательности гена 16S рРНК к *Phyllobacterium myrsinacearum*. Чина Гмелина входит в группу перекрестной инокуляции виковых, для которых характерно образование симбиоза с видом *R. leguminosarum* *bv. viciae*. Однако чина Гмелина растет на кислых почвах, богатых минеральными веществами, а данный вид ризобий теряет вирулентность в таких условиях [3]. В то же время, симбиотические гены штаммов *Phyllobacterium*, выделенных из клубеньков данного растения, были сходными с таковыми у *R. leguminosarum* *bv. viciae*. Таким образом, можно предположить, что данные штаммы не имеют собственные симбиотические гены, а приобретают их за счет горизонтального переноса [6].

Изучение микросимбионтов реликтовых бобовых растений увеличивает известный спектр симбиотических микроорганизмов и полезно для понимания становления азотфиксирующего симбиоза. Большой вклад в изучение филогении

клубеньковых бактерий эндемичных бобовых растений вносят работы исследовательской группы А.Х. Баймиева [8]. Однако, количество исследований по изучению симбионтов реликтовых бобовых растений крайне мало, тогда как это может быть важной частью в изучении не только становления и эволюции симбиотических отношений, но и может способствовать сохранению и поддержанию реликтов в составе фитоценозов.

Многие реликтовые бобовые растения представляют ценность не только в качестве кормовых, медоносных и декоративных растений, но и как источники биологически активных веществ. Например, копеечник щетинистый (*Hedysarum gmelinii subsp. setigerum*) имеет компоненты, обуславливающие противовирусное действие, на основе которых возможно создание средств для борьбы с вирусными инфекциями [47]. Карагана гривастая (*Caragana jubata*) содержит ряд лекарственных активных соединений, включая флавоноиды, терпеноиды, дубильные вещества, алкалоиды и сапонины [186]. Для таких растений разрабатываются методы интродукции и знания об их микросимбионтах будут играть не малую роль в их успешном переселении за пределы естественного ареала.

ВЫВОДЫ ПО РАЗДЕЛУ

Бобовые играют важную роль в фитоценозах благодаря их уникальной способности формировать азотфиксирующий симбиоз с корневыми клубеньковыми бактериями порядка *Rhizobiales*. Формирование взаимовыгодного симбиоза приводит к приобретению новых адаптивных свойств, которые позволяют повысить устойчивость системы растений-микробов к стрессовым условиям. Передача сигналов системы, обеспечивающая узнавание и интеграцию между бобовыми растениями и клубеньковыми бактериями, появились во время их совместной эволюции. Понимание механизмов, основанных на специфическом симбиотическом взаимодействии важно для создания эффективной растительно-микробной симбиотической системы, имеющей большой потенциал для повышения производительности растений. Поэтому такими важными объектами изучения эволюции симбиоза становятся миоцен-плиоценовые реликтовые бобовые виды, относящиеся к родам *Hedysarum*, *Oxytropis* и *Astragalus* [32, 177].

Идентификация же и характеристика микроорганизмов должны опираться на «многофазную таксономию», которая направлена на использование всех доступных данных. Эти данные включают в себя как фенотипическую информацию, такую как хемотаксономические особенности (например, соединения клеточной стенки, хиноны, полярные липиды), морфологию, окрашивание, характеристики роста (среда, температура, время инкубации и т. д.), так и генетические свойства, такие как изучение гена 16S рРНК, мультилокусный анализ, содержание G + C пар, значение ДНК-ДНК гибридизации или индекс ANI. Получение информации о биоразнообразии штаммов-микросимбионтов реликтовых бобовых растений с использованием современных методов определения таксономических отношений и филогенетического родства микроорганизмов позволяет совершенствовать систематику клубеньковых бактерий и обнаруживать новые виды микроорганизмов, которые могут обладать симбиотическим потенциалом.

НАУЧНО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1.1 Растительный и почвенный материал

Для получения микросимбионтов из реликтовых бобово-ризобиальных систем было проведено 3 экспедиции в 2014-2017 годах в Прибайкалье (Баргузинский район Забайкалья, материковое побережье байкальского пролива Ольхонские Ворота, побережье Чивыркуйского залива, Приольхонье, соленые озера Тажеранской степи, мыс Зундук, мыс Хужир, Тугайский залив, поселки Бурятии Монды, Мойготы, Красный Яр, окрестности г. Улан-Удэ). План экспедиций был составлен на основании результатов многолетнего картирования популяций бобовых растений в Сибирском институте физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН (ФГБУН СИФИБР СО РАН). В ходе экспедиций были найдены такие растения как чина низкая (*Lathyrus humilis*), копеечник щетинистый (*Hedysarum gmelinii*), остролодочник Попова (*Oxytropis popoviana*), остролодочник трехлисточковый (*Oxytropis triphylla*), и астрагал хоринский (*Astragalus chorinensis*). Для поиска популяций указанных растений были привлечены сотрудники группы Гербарий ФГБУН СИФИБР СО РАН. Принадлежность растений к реликтам подтверждена работой других авторов [77, 194]. Клубеньки были отобраны на местах произрастания данных растений.

Для проведения вегетационного опыта с целью получения дополнительных клубеньков были собраны образцы почвы и семена остролодочника Попова, остролодочника трехлисточкового, и астрагала хоринского в местах их произрастания: Мыс Зундук, Иркутская область (53°24'24.98"N, 107°26'19.53"E); село Ягодное, Бурятия (51°22'37.67"N, 106°28'24.06"E). Почвы сушили при комнатной температуре и просеивали через сито 0,2 мм.

Для вегетационного опыта с целью изучения хозяйской специфичности микросимбионтов использовали семена бобовых растений: астрагала шелковистосевого (*Astragalus sericeocanus* Gontsch.), солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.), остролодочника дерновинного (*Oxytropis caespitosa* Pall.), люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) и клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), собранных в окрестностях п. Южный, п. Турка (Улан-Удэ, Бурятия).

1.2 Выделение и культивирование микроорганизмов

Выделение микроорганизмов из клубеньков проводили согласно стандартной методике [164]. Стерилизовали клубеньки в течение 1 мин в 96% этаноле. Выращивали на маннитно-дрожжевом агаре YMA либо его модификации с добавлением 0,5% янтарной кислоты YMSA [180], разработанном специально для выделения широкого спектра видов. Инкубацию проводили при 28°C в течение 7-10 дней.

Чистые культуры микросимбионтов (после последовательного двухкратного клонирования) были размещены для долгосрочного гарантированного хранения в УНУ «Станция низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов при -80°C» (Liconic Instruments, Лихтенштейн) [181]. Информация о штаммах доступна в интернет-базе данных ВКСМ [78]. Всего было выделено 195 бактериальных штаммов (Таблица 1).

Таблица 1. Штаммы, выделенные из клубеньков чины низкой, копеечника щетинистого, остролодочника трехлисточкового, остролодочника Попова и астрагала хоринского, отобранных в ходе экспедиций в Прибайкальский регион и/или полученных в условиях вегетационных опытов.

Растение-хозяин	Географическое происхождение	Кол-во собранных клубеньков	Кол-во выделенных штаммов	Кол-во первично идентифицированных штаммов

		в природных условиях	в условиях вегетацион ного опыта		
Чина низкая	Побережье Чивыркуйск ого залива	30	0	20	13
Копеечник щетиный	Мыс Зундук	10	0	24	19
Остролодочник трехлисточков ый	Мыс Зундук. Бурятия, с. Ягодное, пос. Красный Яр	29	13	49	33
Остролодочник Попова	Бурятия, район озера Байкал, с. Ягодное	40	29	62	43
Астрагал хоринский	Бурятия, район озера Байкал, с. Ягодное	0	34	40	28
ВСЕГО		109	76	195	136
		185			

1.3 Идентификация микроорганизмов

Клеточную морфологию и подвижность определяли с помощью бинокулярного микроскопа Axiostar plus (Zeiss, Германия). Для определения биохимических свойств использовали систему GENIII MicroPlate BioLog (США), которая позволяет анализировать способность бактерий метаболизировать основные классы биохимических веществ (71 источник углерода) и устойчивость к 23 химическим веществам. Активность уреазы, каталазы и β -галактозидазы, а также нитратредуктивную способность изолятов изучали с помощью готовых комплектов (НИЦФ, Россия). Анализы проводили в соответствии с рекомендациями изготовителей, за исключением более длительного периода инкубации, из-за медленного роста изолятов (5 дней при 28°C). Каждый тест проводился в двух повторностях.

Для выделения ДНК штаммы культивировали в УМ бульоне в течение 1-5 суток при 28°C со встряхиванием со скоростью 200 об/мин (Orbital Shaker-Incubator ES20, BioSan, Latvia). Выделение ДНК проводили методом лизиса с добавлением СТАВ, описанным Frederick M. Ausubel et al. [168] и визуализировали посредством электрофореза в 0,5% ТАЕ-буфере в 1% агарозном геле (Invitrogen, США).

Для первичной оценки внутривидового разнообразия штаммов использовали RFLP-анализ последовательности между генами 16S и 23S рРНК (ITS-RFLP метод). Для амплификации ITS региона использовалась пара праймеров FGPS1490-72 5'-TGCGGCTGGATCCCCTCCTT-3' и FGPL132'-38 5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3'. Режим ПЦР для амплификации ITS региона: начальная денатурация при 95°C в течение 3 мин 30 сек; 35 циклов: денатурация при 94°C в течение 1 мин, отжиг при 50°C в течение 1 мин и достраивание цепи при 72°C в течение 2 мин; конечное удлинение цепи при 72°C в течение 6 мин 10 сек. Результаты ПЦР были визуализированы посредством электрофореза в 0,5% ТАЕ-буфере в агарозном геле. Затем амплифицированный фрагмент ДНК обрабатывали рестриктазой MspI (Promega, США) в течение 18 часов при 37°C. Электрофорез рестрицированных ДНК-фрагментов проводили в стандартном режиме [57].

Для определения видовой принадлежности штаммов использовали метод секвенирования последовательностей гена 16S рРНК (*rrs*). Для амплификации гена 16S рРНК использовались пара праймеров fD1 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' и rD1 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'. ПЦР проводили в 25-микролитровых реакционных смесях, содержащих 150 мкМ dNTP (Promega), 5 пмоль каждого праймера, 1 U полимеразы Taq (Helicon) и 50-100 нг очищенной ДНК-матрицы. Режим ПЦР для амплификации 16S рДНК: начальная денатурация при 95°C в течение 3 мин 30 сек; 35 циклов: денатурация при 94°C в течение 1 мин 10 сек, отжиг при 56°C в течение 40 секунд и достраивание цепи при 72°C в течение 2 мин 10 сек; конечное удлинение цепи при 72°C в течение 6 мин 10 сек. Результаты ПЦР были визуализированы посредством электрофореза в 0,5% ТАЕ-буфере в агарозном геле. Для определения размеров и приблизительной количественной

оценки фрагментов ДНК использовали маркер 100-bp GeneRuler™ и Lambda DNA / HindIII (Fermentas, Литва). ПЦР-продукт выделяли из 1% агарозного геля (Invitrogen) с использованием сорбента Silica (Sigma-Aldrich, США) либо набором PureLink™ Quick (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Подготовленные пробы секвенировали на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xl (Life Technologies, США) в ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

Праймеры и режимы для амплификации ITS региона и генов «домашнего хозяйства»: *atpD* (ATP synthase F1, beta subunit), *glnII* (glutamine synthetase II) и *recA* (recombinase A), секвенирование которых использовали для уточнения и характеристики штаммов с неопределенным таксономическим положением представлены в Приложении 1. Таблица 1.

Последовательности, относящиеся к ризобияльным штаммам, выделенным из клубеньков копеечника щетинистого депонированы в базе данных NCBI GenBank под номерами KY290459 - KY290467, KY290469, KY290470, KY290472 - KY290474. Последовательности, относящиеся к ризобияльным штаммам, выделенным из остролодочника трехлисточкового депонированы в базе данных NCBI GenBank под номерами KX426254 – KX426261 для сиквенсов гена *rrs*; KX447664 – KX447667 для гена *atpD*; MG675065- MG675068 для частичного ITS; MG652914 - MG652917 для гена *recA* и MG652921 - MG652924 для гена *glnII*. Последовательности гена *rrs* для штаммов, изолированных из клубеньков остролодочника Попова и принадлежащих видам *M. japonicum*, *M. kowhainii* и *Bradyrhizobium sp.* были внесены в базу данных NCBI GenBank под номерами MF661781 - MF661790. Последовательности гена *rrs* для штаммов, выделенных из клубеньков астрагала хоринского, были депонированы в базу данных NCBI GenBank под номерами MH626527, MH628053, MH628054, MH628085, MH628088, MH628090 - MH628092.

Сиквенсы типовых штаммов *P. sophorae* LMG 27899T, *P. brassicacearum* LMG 22836T, *P. endophyticum* LMG 26470T and *P. bourgognense* LMG 22837T

депонированы под номерами: MG675069- MG675072 для ITS региона; MG652918 - MG652920 для гена *recA* и MG652925 - MG652928 для гена *glnII*.

Сиквенсы штаммов, которые не были депонированы, приведены в Приложении 2.

Поиск гомологичных последовательностей проводили в базе данных NCBI GenBank и программы BLAST [125]. Для обработки результатов и построения дендрограммы сходства между последовательностями исследуемых и референтных штаммов клубеньковых бактерий использовали программу MEGA версий 5.0, 7.0, 10.0. и алгоритм Neighbor-Joining. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода Maximum composite likelihood. Для оценки поддержки кластеров был выполнен «бутстреп» анализ (1000 повторностей) [191].

Геном типового штамма *Phyllobacterium zundukense* Tri-48T (LMG 30371T) был секвенирован на платформе PacBio RS II в Аризонском Институте Геномики (AGI) Аризонского университета (UA) и собран *de novo* с помощью программы для сборки RS_HGAP.3. Геномы штаммов *P. zundukense* Tri-38 (LMG 30370), *B. vestrisii* Tri-39, *R. leguminosarum* Tri-43, *B. vestrisii* Tri-44, *B. vestrisii* Tri-49, *R. lusitanum* Opo-234, *M. japonicum* Opo-235, *M. japonicum* Opo-242, *Bradyrhizobium* sp. Opo-243, *B. vaviloviae* Ach-307, *M. kowhainii* Ach-343, а также типовых штаммов *P. brassicacearum*, LMG 22836T, *P. endophyticum* LMG26470T и *P. sophorae* LMG27899T были секвенированы в профильном Центре Геномики СО РАН (ИХБФМ СО РАН) согласно рекомендациям производителя. Геномная ДНК была фрагментирована сфокусированным ультразвуковым аппаратом Covaris C2 (Covaris, США). Фрагменты ДНК-библиотеки готовили с помощью набора NEBNext DNA Library Kit (NEB, США), а их качество оценивали с помощью набора High Sensitivity DNA Kit на биоанализаторе 2100 (Agilent, США). Количество ДНК определяли с помощью набора dsDNA High Sensitivity Kit на флуориметре Qubit 1.0 (Invitrogen, США). Геномы секвенированы на приборе MiSeq (Illumina, США) по стандартному протоколу с набором реагентов MiSeq, 600 циклов (Illumina, США)

и собраны *de novo* с помощью программного обеспечения SPAdes 3.11.1 [92]. Качество сборки оценивалось с помощью программы QUAST 4.6.0 [129]. Контиги были собраны с использованием программы CLC Genomics Workbench (США); гены, содержащиеся в геномной последовательности, аннотированы с помощью RAST Web сервера (Aziz et al., 2008) [90]. Поиск гомологов гена 16S рРНК, ITS региона, генов «домашнего хозяйства», а также симбиотических генов в аннотированных геномах были выполнены с использованием программного обеспечения CLC Genomics Workbench 7.5.1 с использованием локального BLASTn и tBLASTx.

Полногеномные последовательности для штаммов *P. zundukense* Tri-38 и Tri-48T депонированы в базе данных NCBI GenBank под номерами MZMT00000000 и CP017940-CP017945, соответственно. Номер доступа в NCBI GenBank для штамма *R. lusitanum* Oro-234 - NZ_JAFEVL010000000, для штамма *M. japonicum* Oro-235 - QKOD000000000, для штамма *M. japonicum* Oro-242 - MZXX000000000, для штамма *Bradyrhizobium* sp. Oro-243 - MZXW000000000, для штамма *M. kowhii* Ach-343 - MZXV000000000.

Полногеномные последовательности референтных штаммов *P. sophorae* LMG 27899T, *P. brassicacearum* LMG 22836T и *P. endophyticum* LMG 26470T депонированы в базе данных NCBI GenBank под номерами PGGM000000000, PGGO000000000 и PGGN000000000, соответственно.

Средняя нуклеотидная идентичность (ANI) геномов оценивалась с помощью калькулятора ANI Calculator tool [205]. Аннотация геномов проводилась с помощью NCBI prokaryotic genome annotation pipeline (PGAP) сотрудниками NCBI при депонировании геномов в базу данных NCBI [192]. Симбиотические гены штаммов определяли с помощью программы CLC Genomics Workbench 7.5.1. Контиги выравнивали в BLAST сравнивая с симбиотическими генами из различных ризобий, представленных в базе данных GenBank.

Анализ состава жирных кислот (FAME) был проведен проф. Anne Willems в BCCM/LMG Bacteria Collection (Ghent University, Belgium). Штаммы

выращивались в течение 24 часов на среде YMA при 28°C. Метилловые эфиры жирных кислот были выделены согласно протоколу MIDI (http://www.microbialid.com/PDF/TechNote_101.pdf). Профили, созданные с помощью газового хроматографа Agilent Technologies 6890N (Санта-Клара, Калифорния, США), были определены и сгруппированы с помощью программы Microbial Identification System и базы данных MIDI TSBA версия 5.0.

1.4 Вегетационные опыты

1.4.1 Вегетационный метод обнаружения симбиотических ризобий в почве

Семена остролодочника трехлисточкового, остролодочника Попова и астрагала хоринского поверхностно стерилизовали с помощью обработки в 98% H₂SO₄ в течение 10 мин, тщательно промывали стерильной водопроводной водой, скарифицировали и проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри при 25°C в темноте в течение 3-5 дней (в зависимости от вида растений и всхожести). Саженьцы переносили в три стерильных пластиковых горшка (один горшок с 5 семенами), содержащий 250 г почвы, собранной в местах произрастания данных видов бобовых растений, соответственно. Растения культивировали в течение 60 дней в ростовой камере с относительной влажностью 50% и четырехуровневым режимом освещенности / температуры: ночь (темный, 18°C, 8 часов), утро (200 мкмоль м⁻²с⁻¹, 20°C, 2 часа), день (400 мкмоль м⁻²с⁻¹, 23°C, 12 ч), вечер (200 мкмоль м⁻²с⁻¹, 20°C, 2 ч). Освещение было выполнено лампами L 36W / 77 FLUORA (Osram, Германия). Затем корни отдельных растений вынимали из почвы и промывали водопроводной водой. Фотографии растений были выполнены стереомикроскопом Stemi 508 (Zeiss, Германия) и цветной камерой с микроскопом AxioCam ERc 5c (Zeiss, Германия). Штаммы клубеньковых бактерий были выделены как описано выше.

1.4.2 Вегетационные опыты для изучения комплементарного взаимодействия симбиотической эффективности микросимбионтов

Вегетационные опыты для изучения комплементарного взаимодействия и симбиотической эффективности изолятов относящихся к разным таксонам, проводили в стерильных условиях в вариантах отдельной и совместной инокуляции. Растения выращивались в полипропиленовых сосудах OS140BOX (Duchefa, Нидерланды), содержащих 20 г вермикулита (по 4 сосуда с тремя проростками на каждый вариант инокуляции астрагала хоринского и остролодочника Попова, по 10 сосудов с тремя проростками для других видов растений). В каждый сосуд было добавлено 40 мл питательного раствора (г/л): K_2HPO_4 - 1.0, KH_2PO_4 - 0.25, $MgSO_4$ - 1.0, $Ca_3(PO_4)_2$ - 0.2, $FeSO_4$ - 0.02, H_3BO_3 - 0.005, $(NH_4)_2MoO_4$ - 0.005, $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ - 0.005, $MnSO_4$ - 0.002. Сосуды были проинокулированы суспензиями немеченных штаммов или их флуоресцентно-мечеными вариантами и их комбинациями в количестве примерно 10^6 клеток на сосуд. Неинокулированные растения были использованы в качестве негативного контроля. Растения культивировались в течение 30 суток в фитотроне при температуре 20-21°C и режимом освещения 16 ч день / 8 ч ночь. Появление клубеньков определяли на шести растениях каждого варианта после 2 и 3 недель культивирования. В конце эксперимента корни отмывали от вермикулита, считали количество образовавшихся клубеньков и взвешивали проростки на весах (Ohaus Pioneer PX, США). Азотфиксирующая активность клубеньков была определена ацетиленовым методом с помощью газового хроматографа GC-2014 (Shimadzu, Япония). По пять клубеньков из каждого варианта было отобрано для конфокальной микроскопии.

При изучении в отдельных экспериментах скорости клубенькообразования при инокуляции растений остролодочника Попова штаммами Оро-242 и Оро-243, а также их комбинацией было использовано по 15 сосудов с двумя проростками для каждого варианта обработки. Растения культивировались в течение 42 суток в

фитотроне при температуре 20-21°C и режимом освещения 16 ч день / 8 ч ночь. Количество клубеньков было подсчитано после 2, 3, 4, 5 и 6 недель культивирования растений в фитотроне. Образовавшиеся клубеньки анализировали на стереомикроскопе Stemi 508 (Zeiss, Германия) и фотографировали с помощью цветной камеры для микроскопа AxioCam ERc 5 s (Carl Zeiss, Германия). Скорость клубенькообразования была изучена в 2-х экспериментах, поставленных в аналогичных условиях. Статистическая обработка данных проводилась стандартным методом дисперсионного анализа с использованием программы STATISTICA 10 (StatSoft Inc., США). Для оценки различий между значениями применяли критерий наименьшей значимой разницы (LSD) Фишера.

Часть клубеньков была использована для реизоляции бактерий. Принадлежность реизолятов к интродуцированным штаммам была проверена методом секвенирования ITS региона с использованием универсальных праймеров FGPS1490-72 и FGPL132'-38.

1.5 Получение флуоресцентно меченных штаммов с использованием метода электропорации

Электропорация штаммов проводилась в соответствии с работой Garg et al. [123]. С этой целью 90 мкл компетентных клеток штаммов *M. kowhaii* Ach-343 и *M. japonicum* Oro-235 суспендировали и поместили между двумя электродами, расположенными на 0,1 см. Электропорация проводилась с электрическим импульсом 14 кВ / см и длительностью импульса ~ 7,3 мс (Gene PulserXcell, Bio-Rad, USA). Количество импульсов высокого напряжения для каждого штамма -1. После подачи импульса кюветы выдерживали на льду в течение 10 мин. Затем электропорированные клетки суспендировали в YM бульоне [199], инкубировали в течение 24 ч при 30°C со встряхиванием со скоростью 200 об/мин (Orbital Shaker-Incubator ES20, BioSan, Latvia) и распределяли по чашкам YMA. В экспериментах

по трансформации использовали плазмиды рНС60 (tetR) [101], в которой кодирующая последовательность GFP была заменена кодирующей последовательностью mCherry (J. Fournier, LIPM, Toulouse, France, неопубликованные результаты) и рMP4655 (tetR), содержащую ген *egfp*, для электропорации штаммов Ach-343 и Oro-235 соответственно. Скрининг различных трансформантов проводили на среде YMA, содержащей 10 мкг/мл тетрациклина. Положительные клоны каждого штамма проверяли на флуоресценцию в микроскопе Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия). ПЦР проводили с использованием Thermal Cycler T100 (Bio-Rad, USA), для подтверждения трансформации использовали тотальную ДНК в качестве матрицы и пару праймеров, фланкирующих флуоресцентный белковый ген, присутствующий на плазмидах. Условия ПЦР, используемые для амплификации фрагментов 1083 и 967 п.н. (для рНС60 и рMP4655, соответственно) включали предварительную денатурацию при 95°C в течение 3 мин 30 сек. с последующими 35 циклами: 94°C - 1 мин 10 сек, 54°C - 1 мин; 72°C - 2 мин 10 сек, с окончательным удлинением при 72°C в течение 7 мин. Использовали следующие праймеры: M13F (5'-GTTGTAACGACGGCCAGTG-3') и M13R (5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGGA-3'). Продукты ПЦР визуализировали с помощью электрофореза на 1,0 % агарозном геле (Invitrogen, США) в 0,5 % TAE-буфере и очищали с использованием Silica (Helicon, Россия). Последовательности секвенировали на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500x1 (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Положительные клоны каждого штамма тестировали на флуоресценцию в микроскопе Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия).

1.6 Конфокальная микроскопия

Клубеньки помещали в 3% агарозные блоки и очищали в 1/4 MTSB (50 mM PIPES, 5 mM MgSO₄ · 7H₂O, 5 mM EGTA, pH 6,9). Секции клубеньков (50 мкм) получали с использованием микротомы с вибрирующим лезвием HM650V (Microm,

Германия). Секции анализировали с использованием лазерной сканирующей конфокальной системы LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия). Флуоресцентные белки EGFP и mCherry визуализировали при длине волны 488 и 543 нм, соответственно. Изображения были получены с помощью программного обеспечения ZEN 2009 (Carl Zeiss, Германия).

ГЛАВА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Генетическое разнообразие микросимбионтов реликтовых бобовых растений

2.1.1 Видовой состав микросимбионтов чины низкой (*Lathyrus humilis* (Ser.) Spreng.)

Чина низкая (*Lathyrus humilis*) представляет собой многолетнее травянистое растение рода *Lathyrus* L., триба Бобовые (*Fabae* Rchb.). «Стебли тонкие, прямостоячие, высотой 20-45 см. Листовая ось заканчивается ветвистым усиком, иногда простым. Листочки (2)3-5 пар, голые с обеих сторон, эллиптические или яйцевидные, 1,5-4 см длиной, 0,7-2 см шириной. Прилистники полустреловидные, яйцевидные или ланцетные, 6-13(18) мм длиной. Цветки красновато-фиолетовые по(1)2-4 в рыхлых кистях, синеют при высушивании. Чашечка 7-9 мм длиной, с ланцетно-шиловидными зубцами, из которых 2 верхних не длиннее половины трубки, самый нижний почти равен ей. Венчики (16)17-19 мм длиной. Завязь, преимущественно в нижней части, густо коротковолосистая. Бобы 3-4,5 см длиной, продолговато-линейные, опушённые короткими курчавыми волосками или голые» [77]. Относится к позднеплейстоценовым реликтам с дизъюнктивным южносибирско-североуральским ареалом. Встречается в Сибири, на Алтае, на Урале, в Средней Азии, на Дальнем Востоке, в Северном Китае, на Корейском полуострове и в Гималаях. Растёт в разреженных берёзовых и лиственничных лесах, в сосновых борах, по их окраинам, на лугах, луговых склонах и залежах [49]. Заслуживает внимания как ценное пастбищное растение.

Образцы чины низкой были привезены с побережья Чивыркуйского залива (Забайкалье). Для работы было отобрано 30 клубеньков из двух популяций (Таблица 1). Из них получили 20 изолятов, отличающихся по скорости роста: у первой группы штаммов видимые колонии образовывались на 3-4-е сутки, у второй группы на 5-6-е сутки роста на среде YMA. Для дальнейшей работы было отобрано

13 изолятов. На основании RFLP анализа ITS-региона 10 штаммов, было выделено 7 групп, отличающихся ITS-RFLP профилями (Рисунок 1). Для определения таксономической принадлежности было отобрано по одному представителю из выявленных групп микроорганизмов. А также отобрано три дополнительных (без RFLP анализа) изолята. Для них проведены секвенирование гена 16S рРНК (*rrs*) и сравнительный анализ с другими аналогичными генами, депонированными в базе данных GenBank.

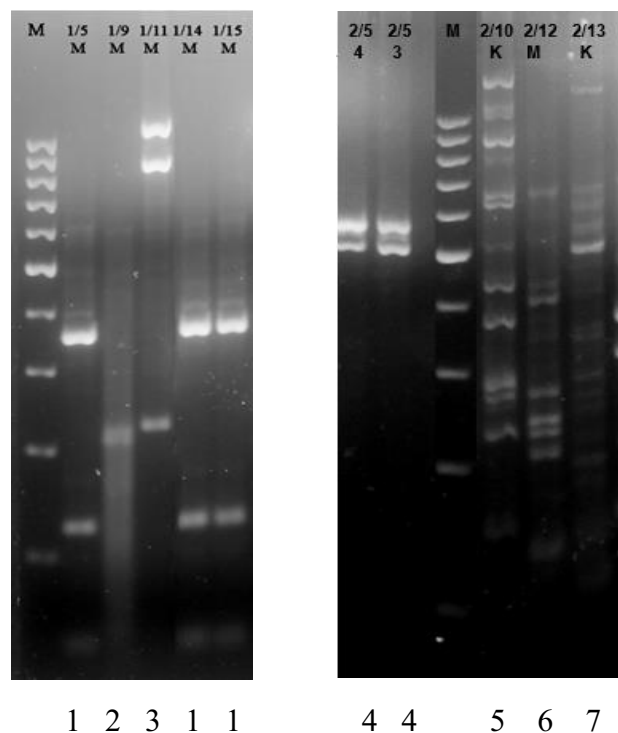


Рисунок 1. Электрофореграммы ITS-RFLP анализа 10 штаммов, выделенных из клубеньков чины низкой. Рестриктаза MspI. М - маркер длин ДНК 100-bp GeneRuler™; 1-7 – типы ITS-RFLP профиля.

Анализ последовательности гена *rrs* показал, что 3 штамма изолированных из чины низкой (1/10К, 2/10К, 2/12М), а также два типовых штамма *R. leguminosarum* LMG 14904T¹ и *R. leguminosarum* bv. *viciae* USDA 2370T

¹ Все типовые штаммы в тексте обозначены литерой «Т».

формировали статистически-достоверно отличающийся кластер с уровнем поддержки 96% (Рисунок 2).

Изоляты 1/10К и 2/10К были идентифицированы как *Rhizobium leguminosarum* (уровень сходства с типовым штаммом LMG 14904Т - 99.9%, тогда как с USDA 2370Т - 99.6%), изолят 2/12М определен как *Rhizobium* sp. (уровень сходства со штаммом LMG 14904Т составил 99.4%).

Второй кластер сформировали штамм 2/5(1) и типовой штамм *R. giardinii* Н152Т (Рисунок 2). Однако, поскольку сходство между этими штаммами по гену *rrs* составляло всего 99.0%, штамм 2/5(1) был идентифицирован как *Rhizobium* sp. В третий кластер, с уровнем поддержки в 96%, вместе со штаммом 2/13К вошли *Mesorhizobium ciceri* NBRC 100389Т, *Mesorhizobium australicum* WSM2073Т и *Mesorhizobium loti* ATCC 33669Т. Изолят 2/13К был отнесен к роду *Mesorhizobium* и определен как *M. ciceri* (сходство с ближайшим типовым штаммом NBRC100389Т по гену *rrs* составило 99.6 %).

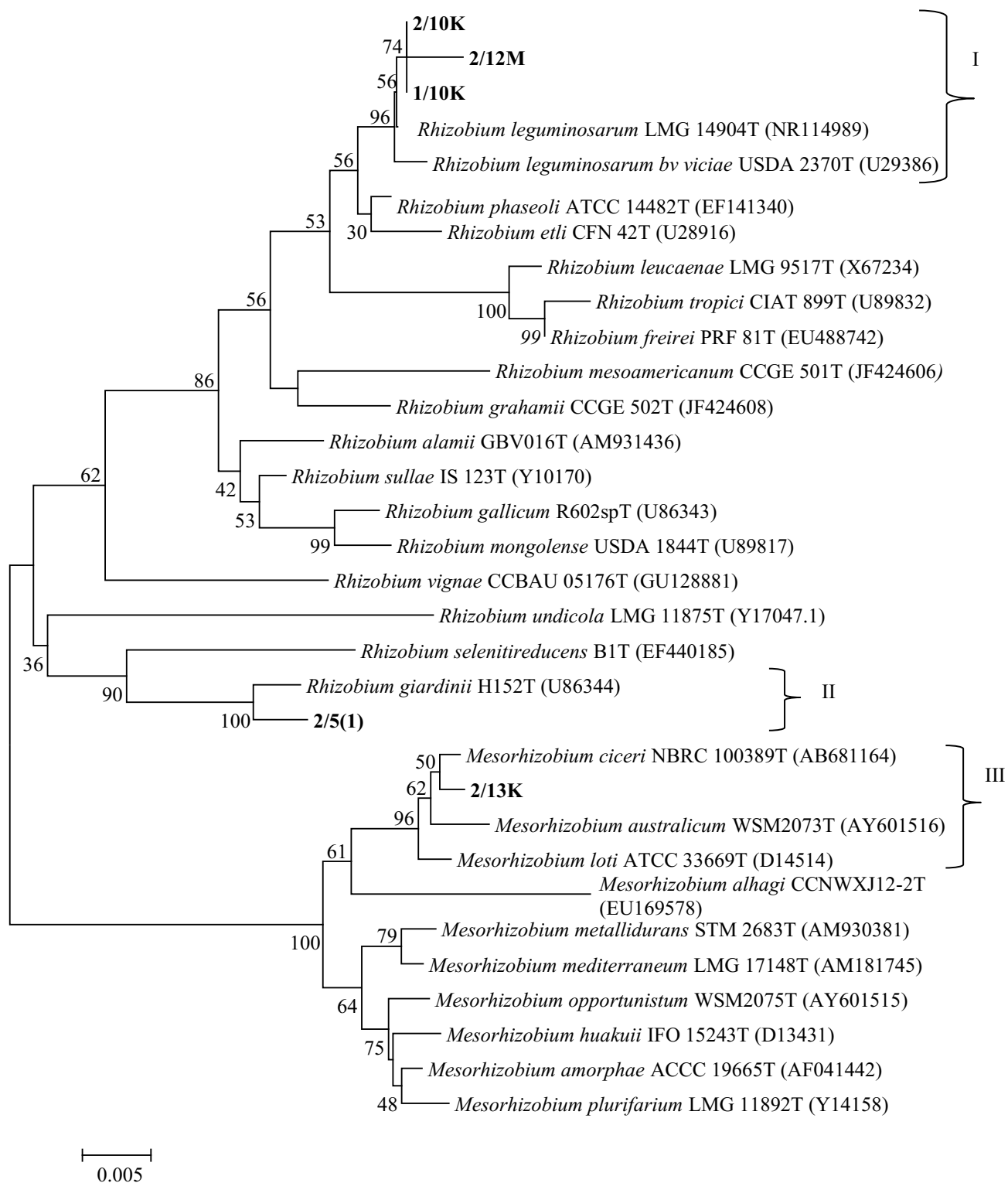


Рисунок 2. *Rrs*-филограмма, отражающая таксономическое положение исследуемых изолятов родов *Rhizobium* и *Mesorhizobium*, выделенных из клубеньков чины низкой. Литерой «Т» отмечены типовые штаммы. Номера изолятов выделены жирным шрифтом. I - III - статистически-достоверно различающиеся кластеры. Масштаб соответствует 0.005 заменам на 100 п.н. (эволюционным расстояниям). Цифрами указана статистическая значимость

кластеризации (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных деревьев.

Единственный медленно растущий ризобиальный изолят 1/11M, выделенный из клубенька чины низкой, сформировал кластер I с типовым штаммом *Tardiphaga robiniae* LMG26467T и был отнесен к этому виду (уровень сходства по гену *rrs* – 99.9 %) (Рисунок 3).

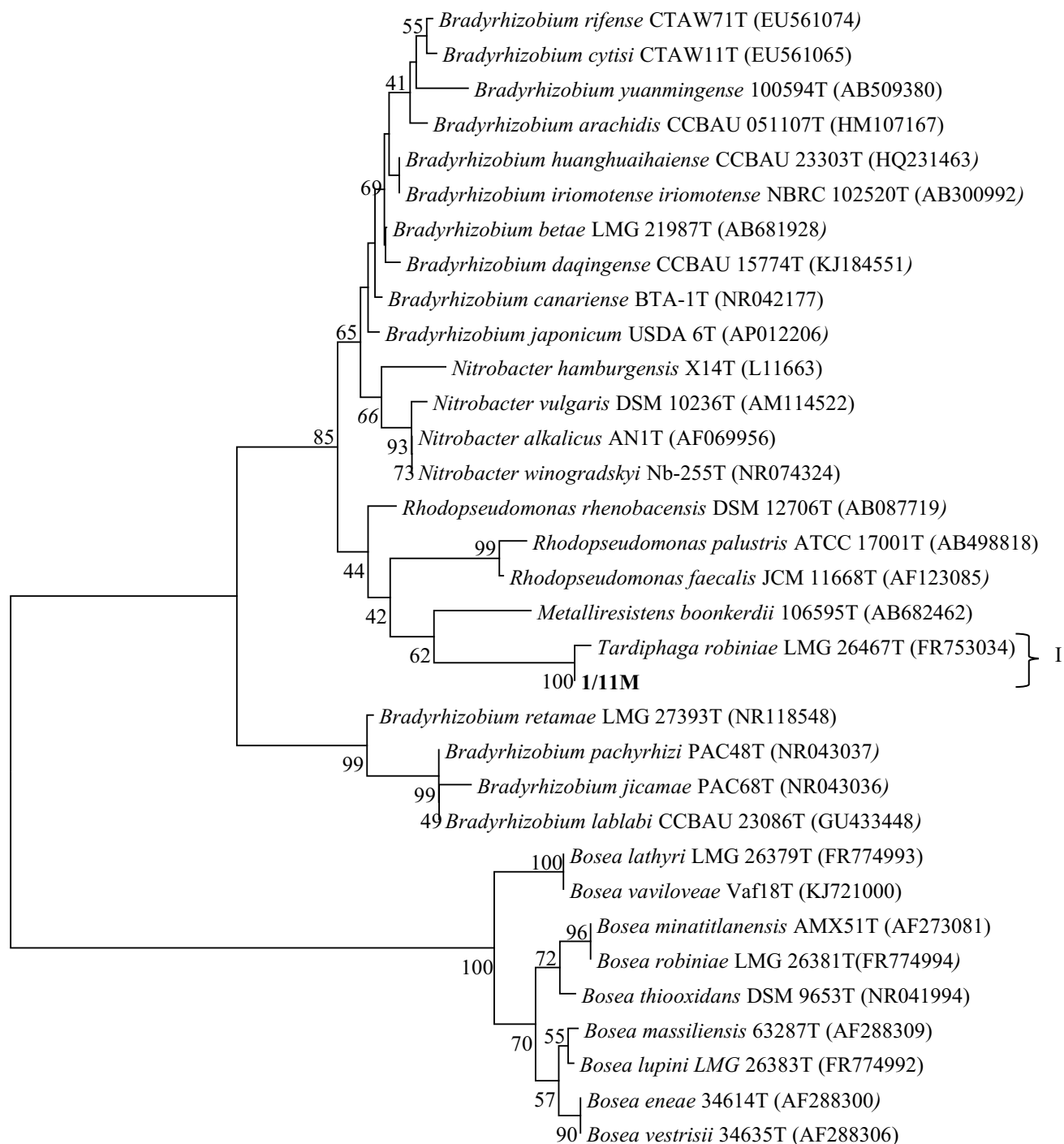


Рисунок 3. *Rrs*-филограмма, отражающая таксономическое положение изолята, относящегося к семейству *Bradyrhizobiaceae*, выделенного из клубенька чины низкой. Литерой «Т» отмечены типовые штаммы. Номер изолята выделен жирным шрифтом. I - статистически-достоверно отличающийся кластер. Масштаб соответствует 0.01 заменам на 100 п.н. (эволюционным расстояниям). Цифрами указана статистическая значимость кластеризации (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных деревьев.

Анализ последовательностей гена *rrs* у 4 других медленно растущих изолятов (1/3М, 1/5М, 1/14М, 1/15М) показал их принадлежность к роду *Herbiconiux* (сем. *Microbacteriaceae*) (сходство с типовым штаммом *H. ginsengi* wged11Т составило 99.2%). Штаммы объединялись в один кластер с *H. ginsengi* wged11Т с уровнем поддержки 98% (Приложение 1. Рисунок 1). По данным литературы, представители этого рода могут присутствовать в клубеньках бобовых растений [98, 147], а также быть обитателями ризосферы и филосферы различных растений [95, 170]. Кроме этого, по гену *rrs* было идентифицировано ещё 3 штамма относящихся к родам *Aeromicrobium* (изоляты 2/5(3), 2/5(4)) и *Mucilaginibacter* (изолят 1/9М) (Приложение 2.1). Представители этих родов являются типичными обитателями почв и относятся к семействам *Nocardioideae* и *Sphingobacteriaceae*, соответственно [140, 143].

Таким образом в работе было показано, что среди микросимбионтов чины низкой встречаются представители видов *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium* sp., (семейство *Rhizobiaceae*), *Mesorhizobium ciceri* (семейство *Phyllobacteriaceae*), *Tardiphaga robiniae* (семейство *Bradyrhizobiaceae*) (Таблица 2). Состав исследованных микросимбионтов, взятых в анализ, оказался довольно разнообразным. Тем не менее, большинство штаммов принадлежат роду *Rhizobium*.

Таблица 2. Виды микроорганизмов порядка *Rhizobiales*, выделенные из клубеньков чины низкой.

Семейство/Вид	Штаммы	Всего
Семейство <i>Rhizobiaceae</i>:		4
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	1/10К, 2/10К	2

<i>Rhizobium sp.</i>	2/5(1), 2/12М	2
Семейство <i>Phyllobacteriaceae</i>:		1
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	2/13К	1
Семейство <i>Bradyrhizobiaceae</i>:		1
<i>Tardiphaga robiniae</i>	1/11М	1

Известно, что род Чина (*Lathyrus L.*) входит в одну группу перекрестной инокуляции с родами трибы виковых Горох (*Pisum L.*), Горошек (*Vicia L.*) и Чечевица (*Lens Mill.*). Для этой группы характерны симбиотические отношения с различными штаммами вида *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* [113, 114, 197]. Однако, в последнее время в качестве микросимбионтов растений рода Чина были описаны и другие виды микроорганизмов. Например, из клубеньков растений чины, произрастающих в Китае, были выделены бактерии, близкие к *R. fabae*, *R. tropici* и *Sinorhizobium morelense* [190]. А в клубеньках чины нумидийской (*L. numidicus Batt.*) был найден штамм, относящийся к виду *Phyllobacterium ifriqiyense* [154]. У чины весенней (*L. vernus (L.) Bernh.*) и чины лесной (*L. sylvestris L.*) в клубеньках обнаружены ризобии, близкие к *R. tropici*, у чины болотной (*L. palustris L.*) - бактерии *Agrobacterium sp.*, а у чины Гмелина (*L. gmelinii Fritsch*) - штаммы, родственные виду *Phyllobacterium myrsinacearum* [3]. Результаты этой работы также подтверждают более широкий круг микросимбионтов чины, чем предполагалось ранее [28].

Вид *T. robiniae*, обнаруженный в клубеньках чины низкой, был впервые выделен из клубеньков робинии ложноакациевой (*Robinia pseudoacacia L.*). Также обнаружен в клубеньках реликтового вида В. прекрасной (*Vavilovia formosa (Steven) Fed.*) и узколокальных эндемиков: О. карликового (*Oxytropis pumilio (Pall.) Ledeb.*), О. прямого (*Oxytropis erecta Kom.*), О. анадырского (*Oxytropis anadyrensis Vass.*) и О. камчатского (*Oxytropis kamtschatica Hultén*) [178, 179, 180, 182]. Вид *T. robiniae* рассматривается как сопутствующий быстрорастущим штаммам и может участвовать в формировании пула *sym*-генов в клубеньковой популяции [33, 102].

Таким образом, показано, что растения рода *Lathyrus* могут вступать в симбиотические отношения не только с *R. leguminosarum* bv. *viciae*, но и с другими видами ризобий. Что выходит за пределы существующей теории групп перекрестной инокуляции. Одной из возможных причин данного явления может быть низкая хозяйская специфичность растений, относящихся к предковым формам, что выражается в повышенном промискуитете у эволюционно менее продвинутых видов [178]. Другая наиболее вероятная причина связана с горизонтальным переносом симбиотических генов, в результате чего ризобии могли поменять свою специфичность по отношению к растению-хозяину. В работах других авторов уже была показана такая возможность [83, 84, 93].

2.1.2 Видовой состав микросимбионтов копеечника щетинистого (*Hedysarum gmelinii* Ledeb. subsp. *setigerum* (Turcz. ex Fischer et Meyer) Kurbatsky)

Копеечник щетинистый (*Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum*) является многолетним травянистым растением рода Копеечник (*Hedysarum* L.), триба Копеечниковые (*Hedysareae* DC.). «Бесстебельное или с укороченным стеблем, вместе с цветоносами длиной до 33 см. Листочки в числе 4 - 6(8) пар, продолговатые или эллиптические, 0,5 - 2 см длиной, 0,2 - 0,7 см шириной. Цветки 14 - 19 мм, розовые, розово-пурпурные, розово-лиловые, в густой кисти. Венчик 14 - 20 мм. Плоды до 9 см в длину. Членики бобов в числе 3 - 6, волосистые, покрыты длинными или в центре короткими шипиками» [77]. Произрастает в горностепном, высокогорном, степном поясах, по каменистым, щебнистым, крутым склонам и в степях. Одним из мест обитания является Байкальский регион, включен в Красные книги нескольких республик и областей РФ [21, 79]. Ботанико-географический анализ показал принадлежность этого вида к плейстоценовым петрофитно-степным реликтам южносибирского происхождения [35, 43].

В ходе данной работы было получено 24 изолята выделенных из 10 клубеньков копеечника щетинистого, произрастающего на мысе Зундук (Таблица

1). Изоляты по скорости роста на среде YMSA делились на две группы: у трех штаммов видимые колонии образовывались на 4-5-е сутки (Hse-21, Hse-22 и Hse-32), у остальных - на 3-и сутки. Предварительный филогенетический анализ 18 штаммов, проведенный посредством ITS-RFLP, выявил, что 16 из них имеют уникальный ITS-RFLP профиль, и только два штамма Hse-19 и Hse-23 обладают схожими профилями (Рисунок 4).

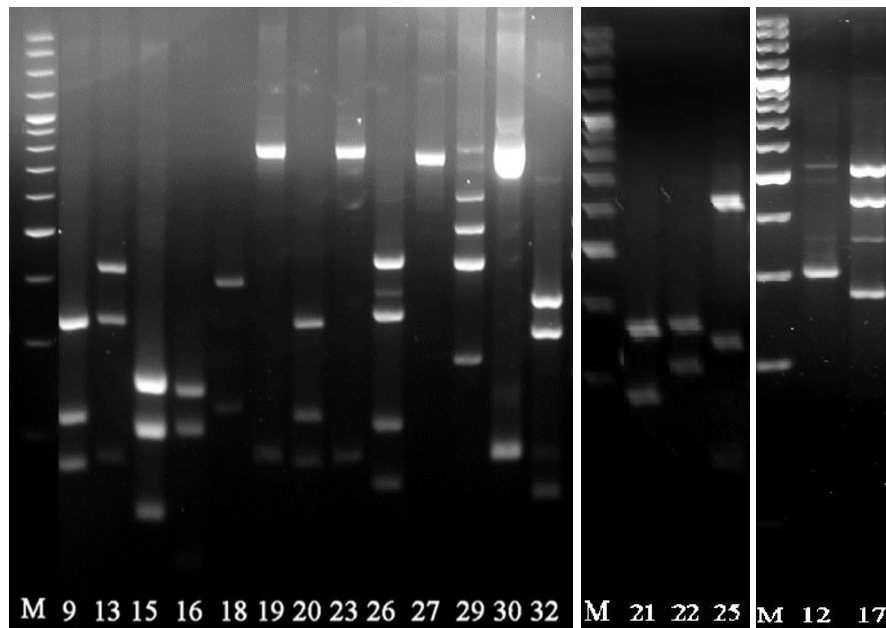


Рисунок 4. Электрофореграммы ITS-RFLP анализа 18 штаммов, выделенных из клубеньков копеечника щетинистого. Рестриктаза MspI. М - маркер длин ДНК 100-bp GeneRuler™. Цифрами обозначены номера Hse-изолятов.

Все штаммы, имеющие отличия в ITS-RFLP профиле, а также 2 дополнительных изолята Hse-10 и Hse-14, для которых ITS-RFLP анализ не проводился, были отобраны для секвенирования гена *rrs*. Всего объектами для идентификации с помощью секвенирования этого гена стало 19 штаммов.

Филогенетический анализ показал, что четырнадцать ризобийных изолятов принадлежат к трем родам: *Rhizobium* (сем. *Rhizobiaceae*), *Phyllobacterium* (сем. *Phyllobacteriaceae*) и *Bosea* (сем. *Boseaceae*).

Одиннадцать быстрорастущих штаммов принадлежат к родам *Phyllobacterium* и *Rhizobium* и формируют 3 статистически достоверно различающиеся кластера с уровнем поддержки 100 % (Рисунок 5).

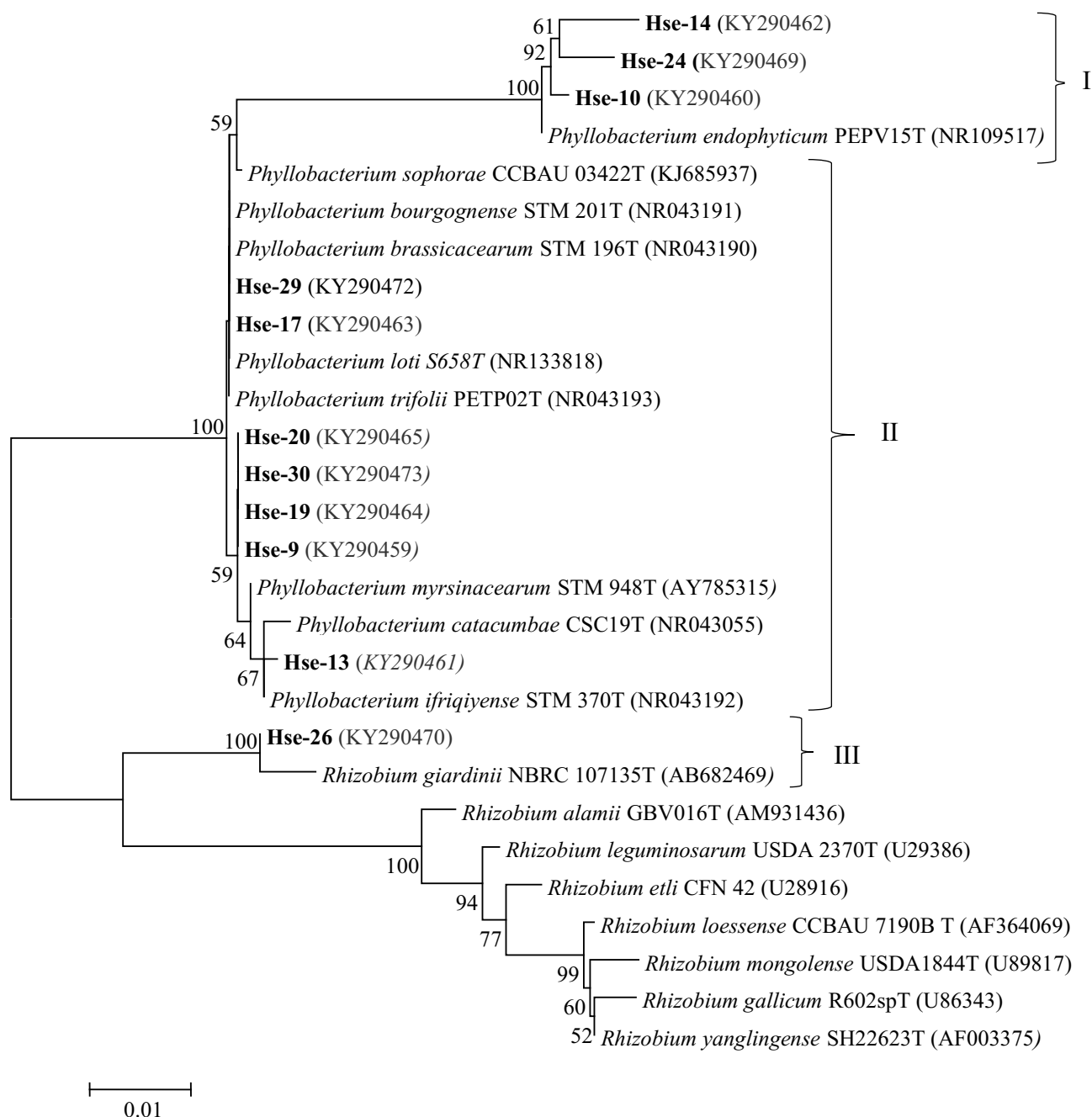


Рисунок 5. *Rrs*-филограмма быстрорастущих штаммов, выделенных из клубеньков копеечника щетинистого в Прибайкальском регионе, а также представителей родственных видов *Phyllobacterium* и *Rhizobium*. Типовые штаммы отмечены литерой «Т». Номера изолятов выделены жирным шрифтом. I-III - статистически-достоверно различающиеся кластеры. Масштаб соответствует 0.01 заменам на 100 п.н. (эволюционным расстояниям). Цифрами указана

статистическая значимость кластеризации (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных деревьев.

Кластер I включал штаммы Hse-14, Hse-24 и Hse-10, а также типовой штамм *Phyllobacterium endophyticum* PEPV15T. Штаммы Hse-24 и Hse-10 были идентифицированы как *P. endophyticum*, показав высокую гомологию гена *rrs* с таковым у типового штамма PEPV15T (соответственно 99.6 и 99.9%). Штамм Hse-14 был описан как *Phyllobacterium sp.* Проценты сходства генов *rrs* у быстрорастущих изолятов и типовых штаммов родов *Phyllobacterium* и *Rhizobium* представлены в Приложении 1. Таблица 2.

Кластер II объединил штаммы Hse-29, Hse-17, Hse-20, Hse-30, Hse-19, Hse-9, Hse-13 и типовые штаммы *P. sophorae* CCBAU03422T, *P. bourgognense* STM201T, *P. brassicacearum* STM 196T, *P. loti* S658T, *P. trifolii* PEP02T, *P. catacumbae* CSC19T, *P. myrsinacearum* STM 948T и *P. ifriqiyense* STM 370T (Рисунок 5). Штамм Hse-20 идентифицировали как *Phyllobacterium sp.*, поскольку по гену *rrs* он был наиболее близок к двум видам (степень сходства с типовыми штаммами *P. trifolii* PEP02T и *P. loti* S658T составляла, соответственно, 99.7 и 99.8%). Степень сходства гена *rrs* у штаммов Hse-9, Hse-19 и Hse-30 и типового штамма *P. loti* S658T достигала 99.8%. На этом основании перечисленные штаммы были описаны как *Phyllobacterium loti*. Изолят Hse-13 показал 99.9% сходства с двумя типовыми штаммами *P. myrsinacearum* STM 948T и *P. ifriqiyense* STM 370T, поэтому был идентифицирован только до рода и определен как *Phyllobacterium sp.* Штаммы Hse-17 и Hse-29 также были отнесены к *Phyllobacterium sp.*, поскольку имели низкую степень сходства (99.3%) с ближайшим типовым штаммом *P. brassicacearum* STM 196T (Приложение 1. Таблица 2).

Кластер III сформировали штамм Hse-26 и типовой штамм *Rhizobium giardinii* NBRC 107135T. На основании результатов секвенирования гена *rrs* изолят Hse-26 был идентифицирован как *Rhizobium sp.* (степень сходства по гену *rrs* с типовым штаммом *R. giardinii* NBRC 107135T - 98.9%).

Для трех медленно растущих ризобияльных изолятов была построена *rrs*-филограмма, отражающая их таксономическое положение в пределах семейств *Bradyrhizobiaceae* и *Boseaceae*. Они формировали отдельный кластер I с уровнем поддержки 99% (Рисунок 6).

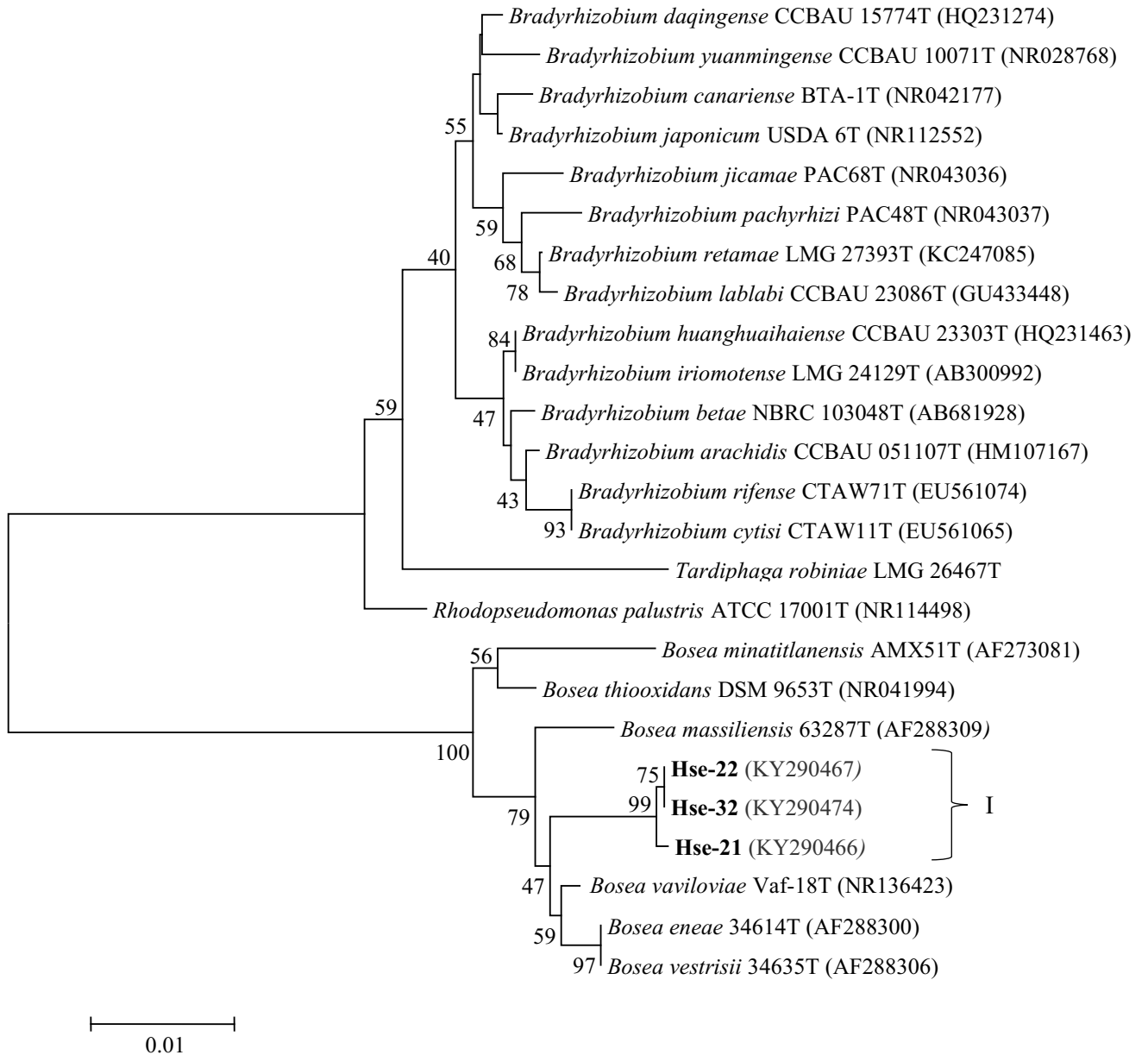


Рисунок 6. *Rrs*-филограмма медленно растущих штаммов, выделенных из клубеньков копеечника щетинистого в Прибайкальском регионе, а также представителей родственных видов из семейств *Bradyrhizobiaceae* и *Boseaceae*. Типовые штаммы отмечены литерой «Т». Номера изолятов выделены жирным шрифтом. I - статистически-достоверно отличающийся кластер. Масштаб соответствует 0.01 заменам на 100 п.н. (эволюционным расстояниям). Цифрами указана статистическая значимость кластеризации (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных деревьев.

По гену *rrs* штаммы Hse-21 и Hse-32 показали 98.5% гомологии с типовым штаммом *Bosea vaviloviae* Vaf-18T и 98.6% — с типовыми штаммами *B. eneeae* 34614T и *B. vestrisii* 34635T. Сходство по гену *rrs* у изолята Hse-22 и наиболее близкого типового штамма *B. vaviloviae* Vaf-18T составляло 98.0% (Приложение 1. Таблица 3). На этом основании штаммы Hse-21, Hse-22 и Hse-32 были идентифицированы как *Bosea* sp.

Таблица 3. Виды микроорганизмов порядка *Rhizobiales*, выделенные из клубеньков копеечника щетинистого.

Семейство/Вид	Штаммы	Всего
Семейство <i>Rhizobiaceae</i>:		1
<i>Rhizobium</i> sp.	Hse-26	1
Семейство <i>Phyllobacteriaceae</i>:		10
<i>Phyllobacterium endophyticum</i>	Hse-10, Hse-24	2
<i>Phyllobacterium loti</i>	Hse-9, Hse-19, Hse-30	3
<i>Phyllobacterium</i> sp.	Hse-13, Hse-14, Hse-17, Hse-20, Hse-29	5
Семейство <i>Boseaceae</i>:		3
<i>Bosea</i> sp.	Hse-21, Hse-22, Hse-32	3

Кроме 14 ризобийных изолятов, было выделено 5 штаммов, принадлежащих родам *Acinetobacter* (сем. *Moraxellaceae*) – штамм Hse-27, *Stenotrophomonas* (сем. *Xanthomonadaceae*) – штамм Hse-15, *Mycobacterium* (сем. *Mycobacteriaceae*) – штамм Hse-16, *Agromyces* (сем. *Microbacteriaceae*) – штамм Hse-18, *Sphingomonas* (сем. *Sphingomonadaceae*) – штамм Hse-25 (Приложение 2.2). Представители рода *Stenotrophomonas* были изолированы также из других бобовых растений Байкальского региона [28]. По литературным данным представители данных родов могут присутствовать в клубеньках бобовых растений, а также быть обитателями ризосферы и филосферы различных растений [103, 118, 204].

Таким образом, в настоящей работе впервые получена коллекция штаммов, изолированных из реликтового бобового растения копеечника щетинистого, произрастающего в Байкальском регионе (Таблица 3). В результате исследования было показано, что среди микросимбионтов этого растения могут встречаться

штаммы симбиотических клубеньковых бактерий (*Rhizobium sp.*), а также представители нетипичных видов (*P. endophyticum*, *P. loti* и *Bosea sp.*), способность которых самостоятельно формировать клубеньки ранее не наблюдалась [104, 107, 120, 185]. К настоящему времени только для двух видов *Phyllobacterium* (*P. sophorae* и *P. trifolii*) описано формирование азотфиксирующего симбиоза с растениями-хозяевами (*Sophorae flavescens*, *Trifolium repens* и *Lupinus albus*) [138, 196]. При этом у штаммов *P. sophorae* и *P. trifolii* были обнаружены общие гены нодуляции *nodACD*, а также ген *nifH*, кодирующий Fe-белок фермента нитрогеназы [138, 196, 207]. Формирование симбиоза представителями рода *Bosea* ранее не подтверждалась, хотя штаммы пяти видов (*B. lupini*, *B. lathyri*, *B. robiniae*, *B. spartocytisi* и *B. vaviloviae*) были изолированы из клубеньков бобовых растений *Lupinus*, *Lathyrus*, *Robinia*, *Spartocytisus* и *Vavilovia*, соответственно [107, 169, 180]. У нескольких штаммов этого рода, включая типовые штаммы *B. vestrisii* 34635Т и *B. eneae* 34614Т был обнаружен ген *nifH* (De Meyer, 2012).

Изоляты из клубеньков копеечника щетинистого, принадлежащие роду *Bosea*, а также бактерии рода *Phyllobacterium*, которые довольно часто встречаются в клубеньках дикорастущих бобовых умеренного климата [7], представляют большой интерес для дальнейшего изучения. Вероятно, что штаммы видов, неспособных самостоятельно образовывать клубеньки, присутствуют в них как носители генов, не участвующих непосредственно в формировании симбиоза, но влияющих на его эффективность. Следует также отметить, что из клубеньков других видов копеечника, произрастающих в Средиземноморье, северо-западных районах Китая и средней полосе России, микроорганизмы родов *Bosea* и *Phyllobacterium* не выделялись [60, 96, 189, 203].

Хотя состав исследованных микросимбионтов оказался довольно разнообразным, стоит отметить, что доминирующее число выделенных штаммов принадлежало роду *Phyllobacterium*, большинство из которых имело низкую степень сходства с ближайшими типовыми штаммами, что, возможно, говорит об их принадлежности к новым видам.

В литературе имеются данные о том, что из клубеньков других видов копеечника, например, копеечника колючейшего (*H. spinosissimum subsp. capitatum* (Rouy) Asch. and Graebn.) и некоторых других видов этого рода (*H. pallidum* Desf., *H. carnosum* Desf.), произрастающих в Средиземноморском регионе, выделяются бактерии, принадлежащие к классу *Gammaproteobacteria* — *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter cloacae*, *Leclercia adecarboxylata*, *Escherichia vulneris*, и *Pseudomonas sp.* [96]. Копеечник венечный *H. coronarium* L., нодулируется штаммами *Rhizobium sullae* [189]. По данным китайских исследователей, из клубеньков видов копеечника *H. scoparium* Fisch. и С.А.Мeyer и *H. polybotrys* Hand.-Mazz., произрастающих на северо-западе Китая, были также выделены представители рода *Rhizobium* [203]. Кроме того, было показано, что растения копеечника альпийского *H. alpinum* L. могут нодулироваться представителями рода *Mesorhizobium* [60]. Таким образом, можно говорить о том, что копеечники имеют достаточно широкий круг микросимбионтов, что подтверждает и данная работа. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что реликтовые бобово-ризобиальные симбиозы, формируемые, в частности, копеечником щетинистым, представляют собой прообраз современных симбиотических систем и отражают пути эволюции в направлении рекрутирования симбиотических генов разных микроорганизмов и повышения специфичности растительно-микробных взаимоотношений [58].

2.1.3 Видовой состав микросимбионтов остролодочника трехлисточкового (*Oxytropis triphylla* (Pall.) Pers.)

Остролодочник трехлисточковый (*Oxytropis triphylla*) относится к трибе Козлятниковые (*Galegeae* Dumort), подтриба Астрагаловые (*Astragalinae* DC.), род Остролодочник (*Oxytropis* DC). «Представляет собой многолетнее бесстебельное, дернистое растение с толстым основанием каудекса. Листочки в числе 3 - 5 пар, узкоовальные или удлинено-яйцевидные, 10 - 15(20) мм длиной и 3 – 5 (7) мм

шириной, с обеих сторон голые, по краю длиннореснитчатые. Цветоносы тонкие, волосистые, кисти 2 - 3-цветковые. Цветки крупные, 25 - 30 мм длиной, венчик красно-фиолетовый. Бобы округлояйцевидные, вздутые, тонкокожистые, беловойлочные, 12 - 15 мм длиной. Растет на сухих каменистых склонах, скалах, галечниках» [77].

Остролодочник трехлисточковый является эндемиком России (западное побережье оз. Байкал и о. Ольхон), включен в Красную книгу РФ [50] и относится к группе плиоценовых пустынно-степных реликтов [45, 194]. Вид, вероятно, входил в единый пояс горно-ксерофитной растительности от Гоби до Байкала, и имеет родственные признаки к гобийскому *O. rhizantha* Palib. [44]. И хотя растения рода *Oxytropis* не представляют особой сельскохозяйственной ценности, но они образуют естественные пастбища, успешно растут на бедных почвах северных умеренных, субарктических и арктических регионов [182].

Для изучения микросимбионтов остролодочника трехлисточкового было собрано 29 корневых клубеньков из популяций, произрастающих на мысе Зундук, и 13 клубеньков были получены в вегетационном опыте (Таблица 1). Всего было выделено 49 штаммов. Из них было отобрано 33 штамма для дальнейшей идентификации.

Анализ последовательностей гена *rrs* показал, что 5 изолятов относятся к роду *Phyllobacterium*: 2 из них (Tri-35, Tri-40) было идентифицировано как *Phyllobacterium ifriqiyense* (сходство с типовым штаммом *P. ifriqiyense* STM 370T составила 99.8%, 99.7%). Штаммы Tri-34, Tri-45, Tri-56 были определены как *Phyllobacterium sp.*, так как сходство с ближайшим типовым штаммом *P. bourgognense* STM 201T составило 99.3%, 99.4%, 99.4%. Изоляты Tri-44 и Tri-52 были отнесены к виду *Bosea vestrisii* (99.7% и 99.6% сходства с типовым штаммом *B. vestrisii* 34635T, соответственно). Штамм Tri-471 был идентифицирован как *Bosea sp.* (сходство с ближайшим типовым штаммом *B. vestrisii* 34635T - 98.9%). Пять штаммов принадлежат роду *Rhizobium*: 3 изолята (Tri-43, Tri-51, Tri-155) отнесены к виду *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (сходство с типовым штаммом

R. leguminosarum bv. *viciae* USDA 2370T по гену *rrs* - 100%). Два изолята рода *Rhizobium* были оставлены без видовой принадлежности: изолят Tri-152 имел 100% сходства сразу с несколькими типовыми штаммами (*R. azibense* 23C2T, *R. mongolense* subsp. *loessense* CCBAU 7190BT, *R. gallicum*), а изолят Tri-55 – 99.4% сходства с ближайшим типовым штаммом *R. lusitanum* P1-7T. Изолят Tri-146 был отнесен к виду *Neorhizobium galegae* (сходство с типовым штаммом *N. galegae* NBRC 14965T - 99.9%). Изолят Tri-143 имел 99.7% сходства сразу с двумя типовыми штаммами *N. galegae* NBRC 14965T и *N. huautlense* SO2T, поэтому был оставлен без видовой принадлежности как *Neorhizobium* sp., как и штамм Tri-149. Изолят Tri-42 описан как *Bradyrhizobium* sp. (сходство с ближайшими типовыми штаммами *B. lupini* USDA 3051T и *B. canariense* NBRC 103049T – 96.5%) (Таблица 4). Еще 8 штаммов, не относящихся к клубеньковым бактериям были отнесены к родам *Agromyces* (семейство *Microbacteriaceae*), *Sphingomonas* (семейство *Sphingomonadaceae*), *Acinetobacter* (семейство *Moraxellaceae*) и *Lysobacter* (семейство *Xanthomonadaceae*) (Приложение 2.3).

Таблица 4. Виды микроорганизмов порядка *Rhizobiales*, выделенные из клубеньков остролодочника трехлисточкового.

Семейство/Вид	Штаммы	Всего
Семейство <i>Rhizobiaceae</i>:		8
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Tri-43, Tri-51, Tri-155	3
<i>Rhizobium</i> sp.	Tri-55, Tri-152	2
<i>Neorhizobium galegae</i>	Tri-146	1
<i>Neorhizobium</i> sp.	Tri-143, Tri-149	2
Семейство <i>Phyllobacteriaceae</i>:		9
<i>Phyllobacterium ifriqiyense</i>	Tri-35, Tri-40	2
<i>Phyllobacterium</i> sp.	Tri-34, Tri-45, Tri-56	3
<i>Phyllobacterium zundukense</i>	Tri-36, Tri-38, Tri-48, Tri-53	4
Семейство <i>Boseaceae</i>:		7
<i>Bosea vestrisii</i>	Tri-37, Tri-39, Tri-44, Tri-49, Tri-54, Tri-52	6
<i>Bosea</i> sp.	Tri-471	1
Семейство <i>Bradyrhizobiaceae</i>:		1
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Tri-42	1

Наибольший интерес для изучения представляли четыре пары изолятов, каждая из которых была выделена из одного клубенька: Tri-36 и Tri-37, Tri-38 и Tri-39, Tri-48 и Tri-49, Tri-53 и Tri-54. Колонии парных изолятов на среде YMSA отличались скоростью роста: быстрорастущие появились на 3 сутки, медленно растущие на 6-7 сутки. Штаммы, которые составляли пары, присутствовали в клубеньках приблизительно в равной пропорции. Общее количество колониеобразующих клеток в одном клубеньке составляло около 10^4 . Предварительная идентификация изолятов путем секвенирования гена *rrs* показала, что медленно растущий штамм каждой пары (Tri-37, Tri-39, Tri-49 и Tri-54) относится к виду *Bosea vestrisii* (сходство с типовым штаммом *B. vestrisii* 34635T 99.6 - 99.8%). *Rrs*-филограмма данных изолятов и представителей семейств *Bradyrhizobiaceae* и *Boseaceae* представлена на Рисунке 7. Изоляты формировали общий кластер I с двумя типовыми штаммами *B. vestrisii* 34635T и *B. eneae* 34614T с уровнем поддержки 99%.

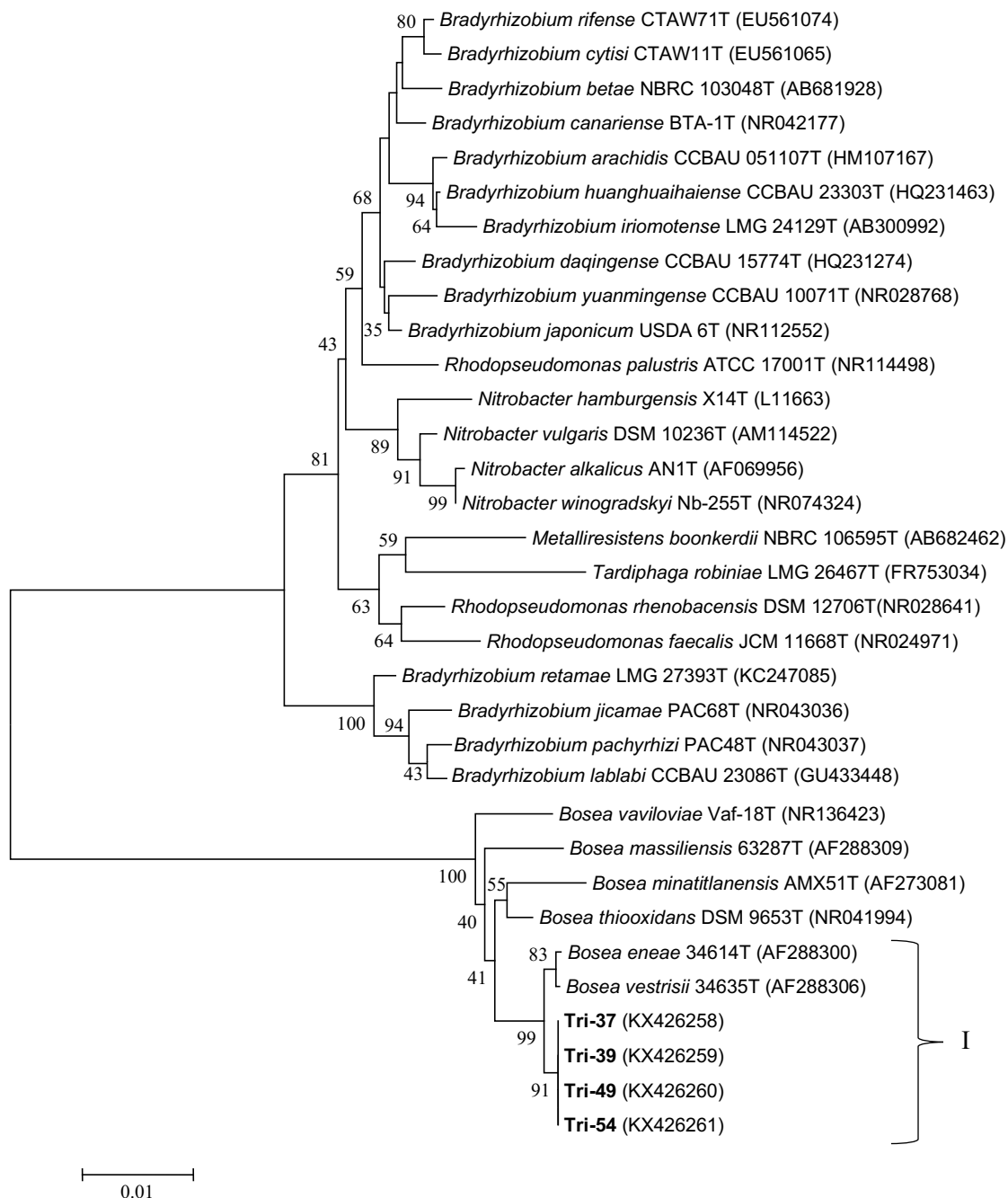


Рисунок 7. *Rrs*-филограмма представителей семейств *Bradyrhizobiaceae* и *Boseaceae*, включая изоляты из *O. трехлисточкового*. Типовые штаммы обозначены литерой «Т». Номера изолятов выделены жирным шрифтом. I - статистически достоверно отличающийся кластер. Масштаб соответствует 0.01 заменам на 100 п.н. (эволюционным расстояниям). Цифрами указана статистическая значимость кластеризации (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных деревьев.

Быстрорастущие изоляты Tri-36, Tri-38, Tri-48 и Tri-53 были филогенетически наиболее близки к типовым штаммам *Phyllobacterium endophyticum* PEPV15T (сходство по гену *rrs* 98.8 - 99.5%) и *Phyllobacterium bourgognense* STM 201T (сходство 98.8 - 99.3%) (Таблица 5). *Rrs*-филограмма изолятов и представителей семейств *Phyllobacteriaceae* и *Brucellaceae* представлена на Рисунке 8.

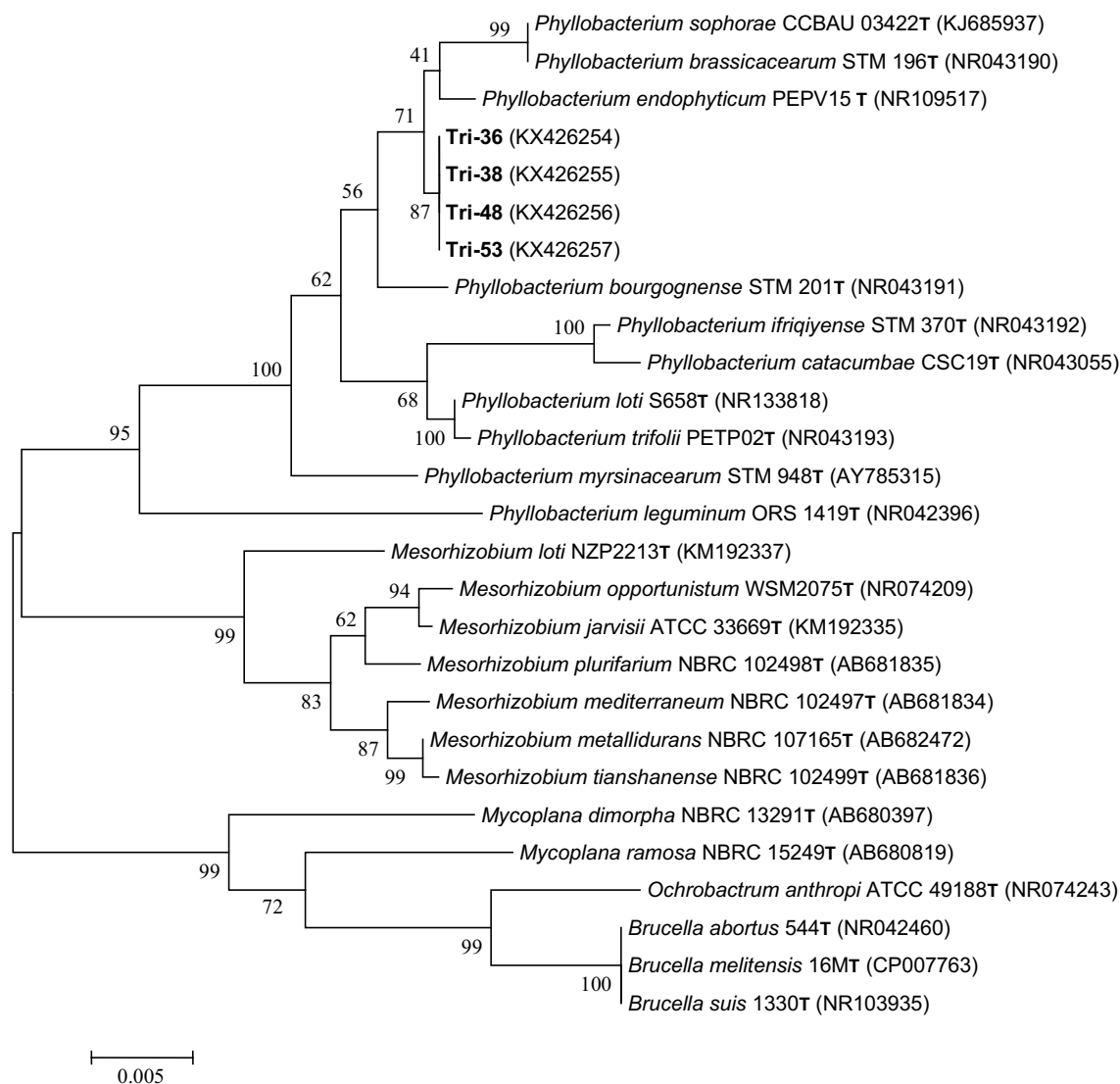


Рисунок 8. *Rrs*-филограмма представителей семейств *Phyllobacteriaceae* и *Brucellaceae*, включая изоляты из О. трехлисточкового. Типовые штаммы обозначены литерой «Т». Номера изолятов выделены жирным шрифтом. Масштаб соответствует 0.005 заменам на 100 п.н. (эволюционным расстояниям). Цифрами указана статистическая значимость кластеризации (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных деревьев.

Для более точной идентификации быстрорастущих изолятов был секвенирован участок 1280 bp между генами 16S и 23S рРНК (ITS регион), а также гены «домашнего хозяйства» *atpD*, *recA* и *glnII*, используемые в качестве маркерных генов для дифференциации близкородственных видов рода *Phyllobacterium* [185]. Сиквенсы гена *atpD* для типовых штаммов ближайших видов *Phyllobacterium spp.* были доступны в базе данных GenBank, остальные локусы (*recA* и *glnII*) для типовых штаммов *P. endophyticum* LMG26470T, *P. bourgognense* LMG22837T, *P. brassicacearum* LMG22836T и *P. sophorae* LMG27899T были секвенированы в данной работе. Сходство последовательностей генов *rrs*, *atpD*, *glnII*, *recA* и ITS региона между всеми исследуемыми изолятами и референтными штаммами представлено в Таблице 5.

Таблица 5. Сходство последовательностей генов *rrs*, *atpD*, *glnII*, *recA* и ITS региона между штаммами *Phyllobacterium*, выделенными из клубеньков *O.* трехлисточкового и типовыми штаммами близкородственных видов ризобий.

Сходство (%) с типовыми штаммами		Изоляты из остролодочника трехлисточкового			
Типовой штамм	Локус	Tri-36	Tri-38	Tri-48 ^T	Tri-53
<i>P. endophyticum</i> LMG26470T	<i>rrs</i>	98.8	99.5	99.0	99.4
	ITS	87.9	88.3	88.2	88.4
	<i>atpD</i>	89.4	89.6	89.4	89.8
	<i>glnII</i>	82.1	82.3	82.3	82.3
	<i>recA</i>	88.3	87.7	88.1	88.1
<i>P. brassicacearum</i> LMG22836T	<i>rrs</i>	99.1	98.8	98.7	99.2
	ITS	89.6	89.0	89.4	89.3
	<i>atpD</i>	88.0	88.0	88.0	88.0
	<i>glnII</i>	84.8	85.1	85.1	84.8
	<i>recA</i>	91.4	90.6	91.3	90.8
<i>P. sophorae</i> LMG27899T	<i>rrs</i>	98.7	98.8	98.6	99.0
	ITS	87.5	87.0	87.1	87.1
	<i>atpD</i>	91.6	91.6	91.6	91.6
	<i>glnII</i>	89.4	89.5	89.5	88.1
	<i>atpD</i>	91.6	91.6	91.6	91.6
<i>P. bourgognense</i> LMG22837T	<i>rrs</i>	99.2	99.3	98.8	99.3
	ITS	87.9	88.2	88.3	88.2
	<i>atpD</i>	91.8	91.8	91.8	91.8
	<i>glnII</i>	81.3	82.1	82.1	82.1

	<i>recA</i>	89.7	89.5	89.5	89.7
--	-------------	------	------	------	------

Последовательности генов *recA* и *glnII* исследуемых изолятов показали максимальное сходство с типовыми штаммами *P. sophorae* LMG27899T (95.4 и 89.5%, соответственно) и *P. brassicacearum* LMG22836T (91.4 и 85.1% соответственно). Последовательности ITS региона оказались наиболее близкими к типовым штаммам *P. brassicacearum* LMG 22836T и *P. endophyticum* LMG26470T (89.6 и 88.4% соответственно), тогда как ген *atpD* был ближе всего к штамму *P. bourgognense* LMG22837T (91.8%). Филогенетическое дерево по локусу *atpD* представлено на Рисунке 9 [174]. По остальным локусам дерева не представлены по причине отсутствия достаточной выборки последовательностей в базе данных NCBI.

Результаты секвенирования гена *rrs*, ITS региона и генов «домашнего хозяйства» *atpD*, *recA* и *glnII* позволили предположить, что группа штаммов Tri-36, Tri-38, Tri-48 и Tri-53 относится к новому виду рода *Phyllobacterium*. Для описания нового вида были проведены дополнительные эксперименты с использованием наиболее близкородственных типовых штаммов *P. sophorae* LMG27899T, *P. brassicacearum* LMG 22836T и *P. endophyticum* LMG26470T в качестве референтных.

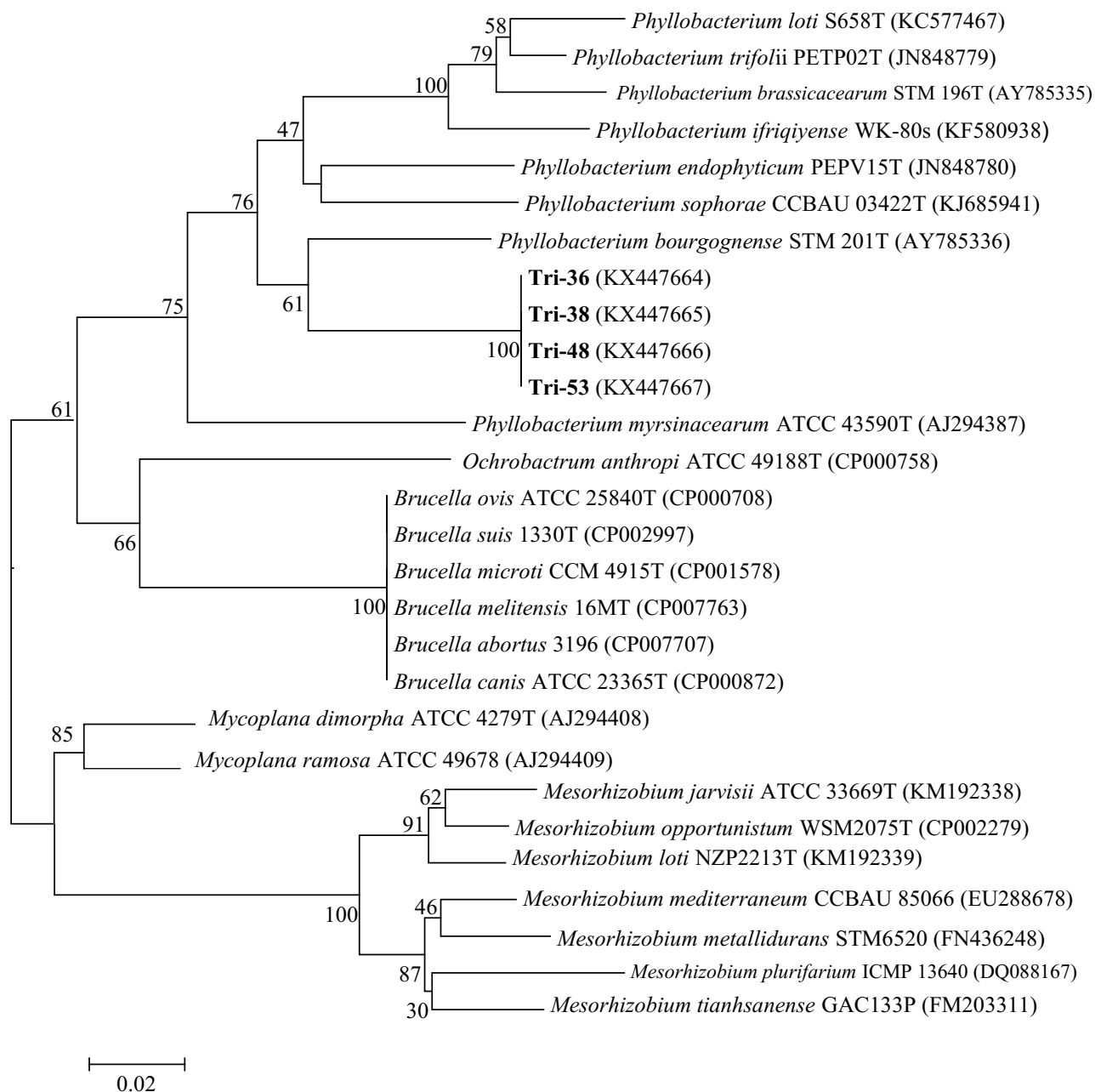


Рисунок 9. Филогенетическое дерево изолятов из *O.* трехлисточкового и филогенетически связанных штаммов основанное на последовательностях гена *atpD*, построенное методом Neighbour-Joining. Типовые виды обозначены буквой «Т». Изоляты из клубеньков остролодочника трехлисточкового выделены жирным шрифтом. Масштаб соответствует 0.02 заменам на 100 п.н. (эволюционным расстояниям). Цифрами указана статистическая значимость кластеризации (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных деревьев.

Результаты сравнительного анализа спектра жирных кислот (FAME) изолятов Tri-36, Tri-38, Tri-48, Tri-53 и референтных штаммов приведены в

Приложении 1. Таблица 4. Все изоляты и референтные штаммы содержали в качестве наиболее обильной жирную кислоту C18: 1 ω 7c (18.6 – 46.4%). Изоляты имели также значительное количество следующих жирных кислот: 11-метил 18:1 ω 7c (1.6 - 8.2%), 12:00 (9.7 – 14.9%), 16:0 (6.8-9.5%), 16:0 3ОН (2.0 – 3.8%), 17:0 ANTEISO (2.4 – 8.7%), 19:0 cyclo ω 8c (3.6-7.8%) и 20:00 (8.7 – 15.7%). В отличие от всех изолятов из *O. triphylla*, типовой штамм *P. endophyticum* LMG26470T характеризовался наличием 15:0 ANTEISO и неидентифицированной жирной кислоты с длиной цепи 16.582, а также отсутствием 16:0 3ОН и группы неразделяемых кислот Summed Feature 3; штамм *P. sophorae* LMG27899T отличался наличием жирной кислоты 18:00 и отсутствием 17:0 ANTEISO, Summed Feature 5 и неидентифицированной кислоты с длиной цепи 18.814; для типового штамма *P. brassicacearum* LMG 22836T было также характерно отсутствие 17:0 ANTEISO, Summed Feature 5 и неидентифицированной кислоты с длиной цепи 18.814. Таким образом, были показаны отличия в составе жирных кислот изолятов и референтных штаммов.

Было проведено также исследование фенотипических свойств Tri-36, Tri-38, Tri-48, Tri-53 и ближайших и типовых штаммов *P. sophorae* LMG27899T, *P. brassicacearum* LMG 22836T, *P. endophyticum* LMG26470T. Результаты сравнительного анализа приведены в Приложении 1. Таблица 5. Изоляты имели почти идентичный фенотипический профиль, за исключением нескольких признаков. Все они обладали уреазной и каталазной активностью и были способны ассимилировать мальтозу, D -трегалозу, сахарозу, D-туранозу, α -D-глюкозу и D-целлобиозу, гентиобиозу, D-галактозу, D-маннозу, D-фруктозу, фукозу, L -рамнозу, D-сорбит, D-маннит, D -арабитол, глицерин, L-аспарагиновую кислоту, L-глутаминовую кислоту, D-глюкуроновую кислоту, L-молочную кислоту, яблочную и пропионовую кислоты, уксусную и муравьиную кислоты и L-аргинин. Все изоляты не обладали способностью редукции нитратов и β -галактозидазной активностью, а также возможностью утилизировать декстрин, стахиозу, желатин, D -раффинозу, D -мелибиозу, α -D-лактозу, инозин, фузидиевую кислоту, D-

аспарагиновую кислоту, лимонную кислоту, муциновую кислоту, D-сахаровую кислоту и серин. Исследуемые штаммы были чувствительны к рифамицину, линкомицину, ванкомицину и налидиксовой кислоте и только два изолята выросли на 1% (w/v) NaCl. В отличие от всех типовых штаммов, изоляты росли в присутствии Tween 40, не росли при pH 6 и не были способны использовать лактон L-галактоновой кислоты, бромосукциновую кислоту и L-аланин. Все эти характеристики использовались при описании нового вида.

Кроме этого, были секвенированы геномы изолятов Tri-38 и Tri-48, а также типовых штаммов *P. brassicacearum*, LMG 22836T, *P. endophyticum* LMG26470T и *P. sophorae* LMG27899T. Размер генома штамма Tri-48 составлял 6.208.009 bp, включал хромосому 3.95 Mbp и 5 плазмид в диапазоне от 640 до 211 Kbp. Установлено, что содержание ДНК G+C составляет 57.22 моль%, найдено 5977 последовательностей, кодирующих белки. Геномные последовательности изолятов Tri-38 и Tri-48 имели очень высокий уровень сходства (средняя нуклеотидная идентичность ANI 99.99%). Значения ANI между геномами изолятов Tri-38, Tri-48 и референтными типовыми штаммами колебалась от 79.23% для штамма *P. endophyticum* LMG 26470T до 85.74 % для штамма *P. sophorae* LMG27899T (Таблица 6), в то время как уровень, рекомендуемый для разделения видов на основании значения ANI, не превышает 95-96%, что соответствует традиционному 70% порогу, используемому для теста ДНК-ДНК гибридизации [171].

Таблица 6. Результаты расчета средней нуклеотидной идентичности ANI (%) между геномами изолятов Tri-38, Tri-48 и типовых штаммов *P. sophorae* LMG 27899T, *P. brassicacearum* LMG 22836T и *P. endophyticum* LMG 26470T.

Штаммы	Tri-38	Tri-48	<i>P. brassicacearum</i> LMG 22836T	<i>P. endophyticum</i> LMG 26470T	<i>P. sophorae</i> LMG 27899T
Tri-38	100.0	-	-	-	-
Tri-48	99.99	100.0	-	-	-
<i>P. brassicacearum</i> LMG 22836T	83.24	83.02	100.0	-	-
<i>P. endophyticum</i> LMG 26470T	79.28	79.23	78.35	100.0	-

<i>P. sophorae</i> LMG 27899T	85.74	85.64	81.71	78.39	100.0
----------------------------------	-------	-------	-------	-------	-------

На основании результатов секвенирования генов *rrs*, *atpD*, *glnII*, *recA* и ITS региона штаммов Tri-38 и Tri-48, анализа их морфологических, физиологических свойств и жирнокислотного состава, а также расчета ANI был описан новый вид *Phyllobacterium zundukense* с типовым штаммом Tri-48T (=LMG 30371T, =RCAM 03910T) [175].

В литературе имеются данные о том, что из клубеньков других видов остролодочника, например, остролодочника карликового (*O. pumilio* (Pall.) Ledeb.) и некоторых других видов этого рода (*O. arctobia* Bunge, *O. deflexa* (Pall.) DC., *O. maydelliana* Trautv., *O. monticola* A.Gray, *O. riparia* Litv., *O. splendens* Douglas, *O. glabra* DC.) выделяются бактерии, принадлежащие роду *Rhizobium* [131, 135, 145, 182, 206]. Также среди микросимбионтов *O. glabra*, *O. pumilio*, *O. kamtschatica* Hultén и *O. erecta* Kom. были описаны представители родов *Mezorhizobium*, *Phyllobacterium* (для *O. pumilio* и *O. erecta*), *Bosea* и *Tardiphaga* (для *O. pumilio*, *O. kamtschatica*, *O. erecta* и *O. anadyrensis* Vass.) [131, 182]. Из клубеньков остролодочника лесного (*Oxytropis sylvatica* (Pall.) DC.) ранее были получены изоляты, относящиеся к видам *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (семейство *Rhizobiaceae*), *Tardiphaga robiniae* (семейство *Bradyrhizobiaceae*) и *Bosea* sp. (семейство *Boseaceae*) [28]. Это говорит о том, что растения рода *Oxytropis* не являются строгими симбионтами. Однако проведенное изучение микросимбионтов реликтового вида остролодочник трехлисточковый показало их необычайно широкое генетическое разнообразие, охватывающее представителей родов *Rhizobium*, *Neorhizobium* (сем. *Rhizobiaceae*), *Phyllobacterium* (сем. *Phyllobacteriaceae*), *Bosea* (сем. *Boseaceae*) и *Bradyrhizobium* (сем. *Bradyrhizobiaceae*) (Таблица 4). Подобные симбиотические системы бобовых, обладающие широким спектром микросимбионтов, являются многообещающими моделями для изучения эволюции специфичности растений-хозяев, влияния

естественного разнообразия ризобий на рост растений и многосторонних взаимодействий между всеми симбиотическими партнерами.

2.1.4 Видовой состав микросимбионтов остролодочника Попова (*Oxytropis popoviana* Peschkova)

Остролодочник Попова (*Oxytropis popoviana*) относится к трибе Козлятниковые (*Galegeae* Dumort), подтриба Астрагаловые (*Astragalinae* DC.), род Остролодочник (*Oxytropis* DC.). «Представляет собой бесстебельное дерновинное растение с толстым корнем и короткими ветвями каудекса. Листья прижато-беловолосистые, 5-15 см длиной. Листочки в числе 3-5 пар, продолговато-ланцетные, 10-20 мм длиной и 3-5 мм шириной. Цветоносы длиннее листьев и в 2-3 раза толще листовых черешков. Кисти короткие, округлые или овальные. Чашечка широкотрубчатая, с линейными зубцами, покрыта прижатыми белыми и черными волосками. Венчик розово-фиолетовый, флаг 22-28 мм длиной. Остроконечие лодочки 3(4) мм длиной. Бобы широкояйцевидные, 10-20 мм длиной и 9-10 мм шириной, тонкокожистые, покрыты белыми и черными волосками, с довольно узкой перегородкой по брюшному шву. Растет на каменисто-щебнистых степных склонах» [77]. Вид является реликтом древнесредиземноморской миоцен-плиоценовой флоры [76, 194]. Все известные современные популяции этого вида очень малочисленны и находятся на территории Прибайкальского национального парка и Байкало-Ленского заповедника. Внесен в Красную книгу Иркутской области. Произрастает на каменисто-щебнистых степных склонах и вершинах увалов, вдоль западного берега Байкала, а также в Селенгинском районе Бурятии [10].

В ходе экспедиции в Республику Бурятия было собрано 40 клубеньков с корней остролодочника Попова. Ещё 29 клубеньков были получены в лабораторных условиях (Таблица 1). Большинство клубеньков были удлиненные (иногда разветвленные) и имели розовую окраску, что предполагает наличие

леггемоглобина и азотфиксирующей активности. Форма клубеньков соответствовала удлинённому типу клубеньков обычно с одним, реже с двумя ветвями. Размер клубеньков варьировал от 1 до 5 мм.

Всего из клубеньков растений остролодочника Попова было выделено 62 штамма, которые на среде YMSA разделялись на 3 группы по скорости роста: быстрорастущие появились на 3-й день (25 штаммов), со средней скоростью роста на 4-5-й (35 штаммов) и медленно растущие - на 6-7-й (2 штамма). Сорок три изолята были идентифицированы методом секвенирования гена *rrs*.

Анализ последовательностей гена *rrs* показал, что 6 изолятов принадлежат роду *Rhizobium*, три из них (Оро-157, Оро-161, Оро-234) идентифицированы до вида *Rhizobium lusitanum* (сходство с типовым штаммом *R. lusitanum* P1-7T - 100%, 99.8% и 100%, соответственно). Изоляты Оро-8 и Оро-169 были определены как *Rhizobium* sp., так как сходство с ближайшим типовым штаммом *R. lusitanum* P1-7T составило 99.4% для обоих. Изолят Оро-247 показал 99.7% сходства с тремя типовыми штаммами *R. mayense* CCGE526T, *R. lusitanum* P1-7T и *A. rhizogenes* NBRC 13257T, поэтому был идентифицирован только до рода и определен как *Rhizobium* sp. Штамм Оро-7 был идентифицирован как *Neorhizobium galegae*, показав 99.7% сходства гена *rrs* с таковым у типового штамма NBRC 14965T. Один штамм Оро-230 был идентифицирован как *Bosea vaviloviae* (сходство с типовым штаммом *B. vaviloviae* Vaf-18T по гену *rrs* - 99.7%). Также обнаружены 2 представителя рода *Phyllobacterium*: один изолят Оро-5 определен как *Phyllobacterium ifriqiense* (сходство с типовым штаммом STM 370T по гену *rrs* - 99.6%), второй штамм Оро-160 - как *Phyllobacterium trifolli* (сходство с типовым штаммом РЕТР02Т по гену *rrs* - 99.6%).

Наибольшее же количество штаммов принадлежало роду *Mesorhizobium*. Филогенетический анализ показал, что 12 штаммов формируют 2 статистически достоверно различающихся кластера, с уровнем поддержки 87 и 82% (Рисунок 10).

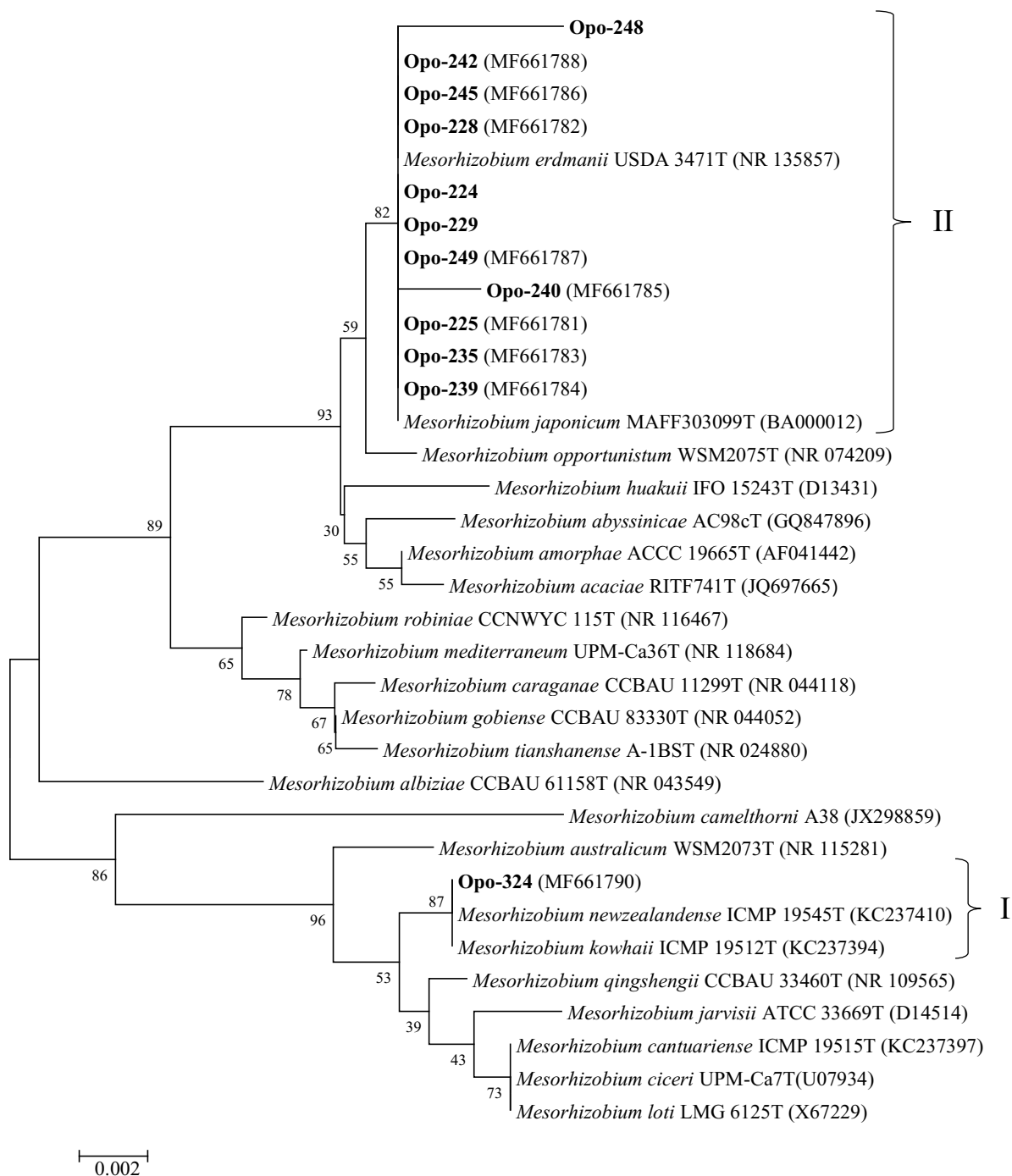


Рисунок 10. *Rrs*-филограмма, отражающая таксономическое положение изолятов, выделенных из клубеньков остролодочника Попова, и близкородственных видов *Mesorhizobium*. Типовые штаммы обозначены литерой «Т». Номера изолятов выделены жирным шрифтом. I-II - статистически достоверно различающиеся кластеры. Масштаб соответствует 0.002 заменам на 100 п.н. (эволюционным расстояниям). Цифрами указана статистическая значимость кластеризации (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных деревьев.

Кластер I объединил штамм Оро-324 и типовые штаммы *M. kowhii* ICMP 19512T и *M. newzealandense* ICMP 19545T (Рисунок 10), сходство по гену *rrs* составило 100% и 99.8%, соответственно. Таким образом, штамм Оро-324 был идентифицирован как *M. kowhii*.

Кластер II включал штаммы Оро-224, Оро-225, Оро-228, Оро-229, Оро-235, Оро-239, Оро-240, Оро-242, Оро-245, Оро-248 и Оро-249 и два типовых штамма *M. japonicum* MAFF 303099T и *M. erdmanii* USDA 3471T (Рисунок 10). Все изоляты имели высокую гомологию гена *rrs* с таковыми у типовых штаммов *M. japonicum* MAFF 303099T и *M. erdmanii* USDA 3471T (99.61 - 100% и 99.68 - 100%, соответственно) (Приложение 1. Таблица 6).

Чтобы более точно определить таксономическое положение изолятов кроме *rrs* гена был проанализирован ITS-регион, полученный при полногеномном секвенировании двух штаммов Оро-235 и Оро-242. ITS-филограмма показала, что оба изолята формируют отдельный кластер I при 100%-ной поддержке с типовым штаммом *M. japonicum* MAFF 303099T (Рисунок 11). Сходство по гену *rrs* с типовым штаммом *M. japonicum* MAFF 303099T составило 99.78% для обоих изолятов. Таким образом, штаммы Оро-235 и Оро-242 были идентифицированы до вида *M. japonicum*. Остальные изоляты в связи с высокими процентами сходства по гену *rrs* сразу с двумя типовыми штаммами были определены как *Mesorhizobium* sp.

Также ещё 9 штаммов, Оро-223, Оро-227, Оро-238, Оро-246, Оро-251, Оро-252, Оро-254, Оро-325 и Оро-326 были отнесены к *Mesorhizobium* sp., поскольку имели низкую степень сходства по гену *rrs* с ближайшими типовыми штаммами. Изоляты Оро-223, Оро-227, Оро-238 и Оро-246 были наиболее близки к типовому штамму *M. erdmanii* USDA 3471T (степень сходства 99.0 - 99.2%). Изоляты Оро-251, Оро-252, Оро-254 - к типовому штамму *M. sophorae* ICMP 19535T (степень сходства 99.4 - 99.5%). Штамм Оро-325 показал наибольшее сходство с типовым штаммом *M. australicum* WSM2073T (степень сходства - 99.2%), а штамм Оро-326 - с типовым штаммом *M. norvegicum* 10.2.2T (степень сходства составила 99.3%).

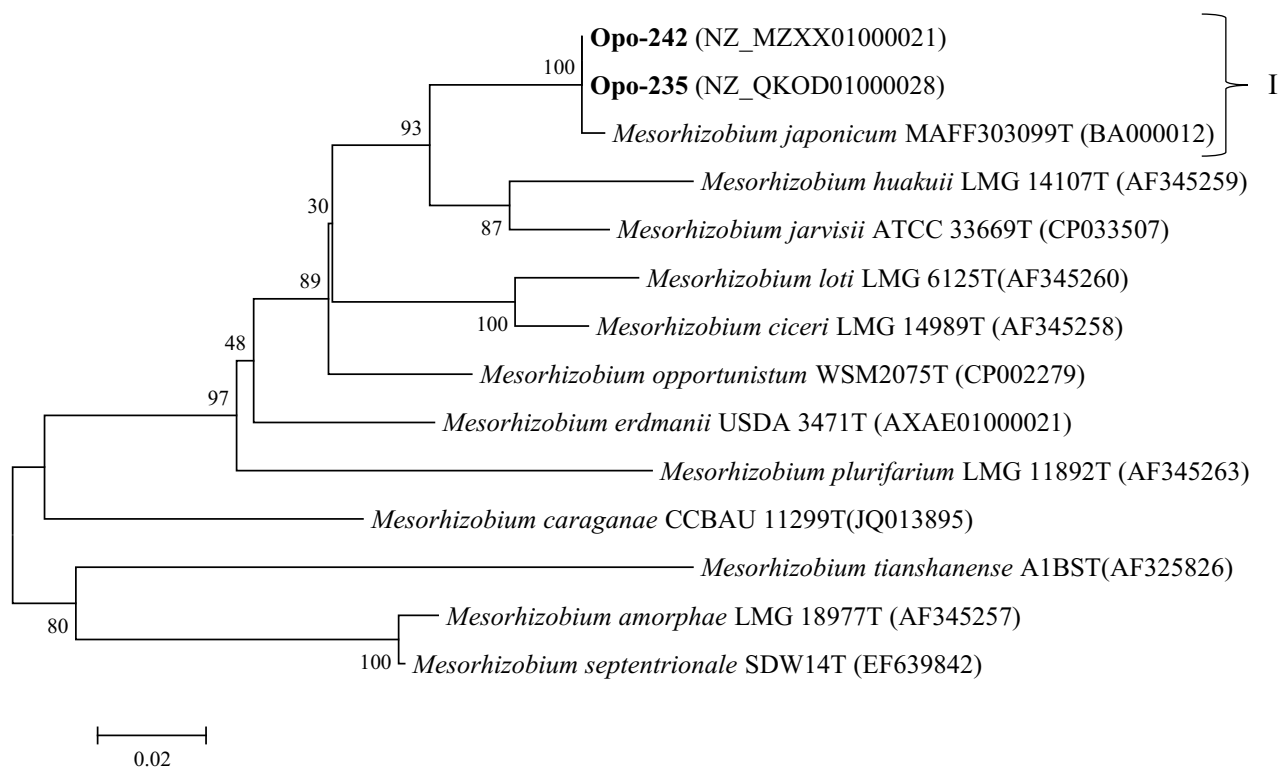


Рисунок 11. ITS-филограмма, отражающая таксономическое положение изолятов Оро-242 и Оро-235 и близкородственных видов *Mesorhizobium*. Типовые штаммы обозначены литерой «Т». Номера изолятов выделены жирным шрифтом. I - статистически-достоверно отличающийся кластер. Масштаб соответствует 0.02 заменам на 100 п.н. (эволюционным расстояниям). Цифрами указана статистическая значимость кластеризации (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных деревьев.

Штамм *M. japonicum* Оро-242 был изолирован совместно со штаммом Оро-243. В клубеньке они были представлены примерно в равной пропорции в размере 10^4 КОЕ, но отличались темпами роста. Секвенирование гена *rrs* медленнорастущего изолята Оро-243 показало, что этот изолят принадлежит к роду *Bradyrhizobium* и наиболее близок к типовому штамму *B. diazoefficiens* USDA 110T (Рисунок 12), который был выделен из сои культурной и изначально описан как *B. japonicum* [109].

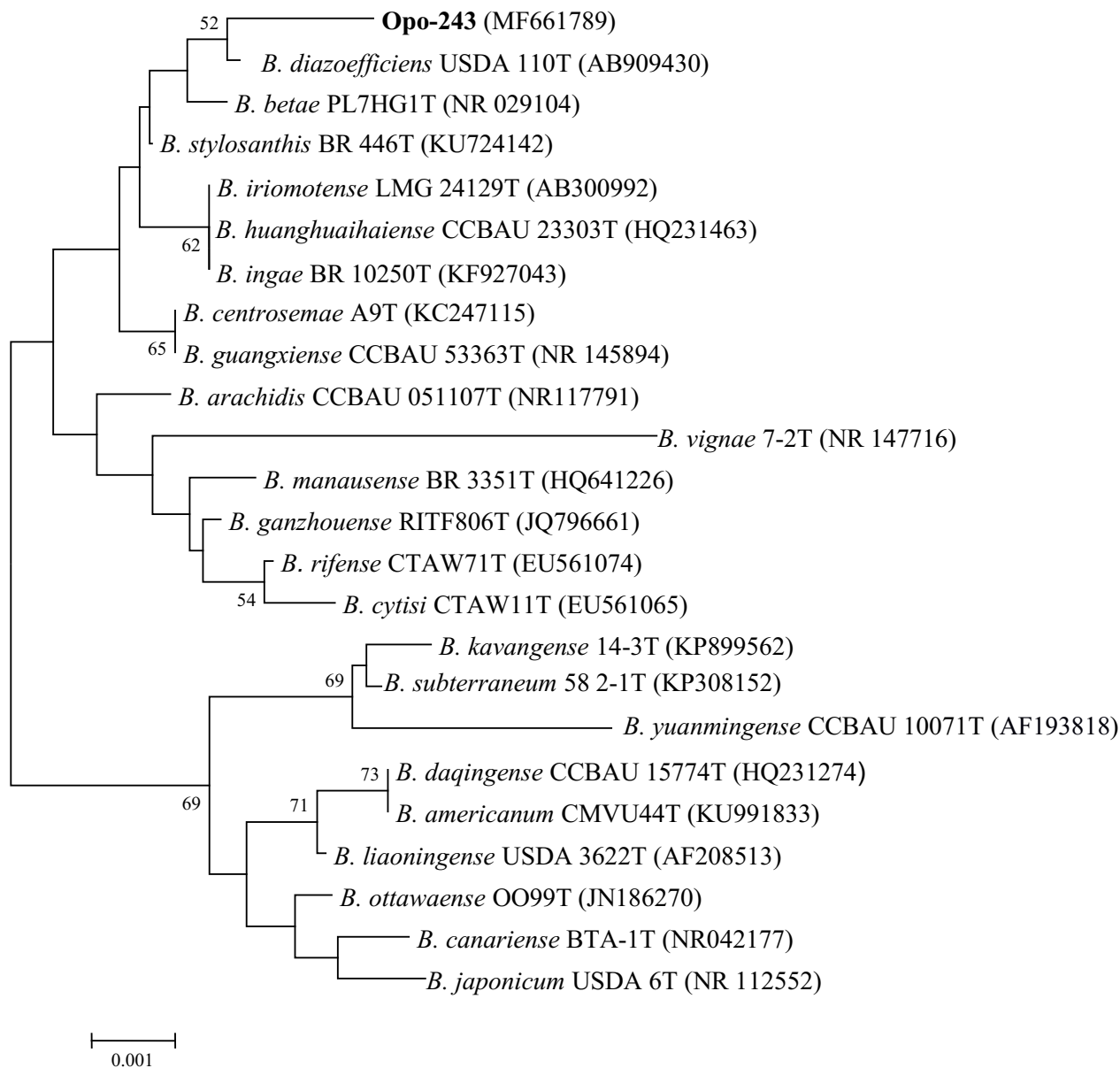


Рисунок 12. *Rrs*-филограмма, отражающая таксономическое положение изолята Оро-243 и близкородственных видов *Bradyrhizobium*. Типовые штаммы обозначены литерой «Т». Номер изолята выделен жирным шрифтом. Масштаб соответствует 0.001 заменам на 100 п.н. (эволюционным расстояниям). Цифрами указана статистическая значимость кластеризации (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных деревьев.

Тем не менее, низкий уровень поддержки (52%) говорит о значительном отличии этих штаммов. Процент сходства по гену *rrs* между изолятом Оро-243 и ближайшим типовым штаммом *B. diazoefficiens* USDA 110Т составлял 99.48% (Таблица 7).

Таблица 7. Сходство последовательностей между штаммом *Bradyrhizobium* sp. Оро-243 и типовыми штаммами наиболее близких видов. 1 - *B. diazoefficiens* USDA 110T, 2 - *B. japonicum* USDA 6T, 3 - *B. canariense* ВТА-1Т, 4 - *B. betae* LMG 21987Т, 5 - *B. rifense* СТАW71Т, 6 - *B. cytisi* СТАW11Т.

Локус	Сходство последовательностей					
	1	2	3	4	5	6
<i>rrs</i>	99.48	99.15	99.34	99.75	99.53	99.43
ITS	91.96	91.14	91.75	95.17	95.69	94.19
<i>recA</i>	95.14	94.56	94.52	94.69	94.00	94.84
<i>glnII</i>	95.32	96.23	94.11	94.19	95.91	95.91
<i>rpoB</i>	95.83	95.69	93.51	95.83	94.72	96.38

Чтобы более точно определить таксономическое положение изолята Оро-243, кроме *rrs* гена были проанализированы ITS-регион, а также гены *recA*, *glnII* и *rpoB*, полученные при полногеномном секвенировании. ITS-филограмма показала, что изолят Оро-243 формирует отдельный кластер I при 98%-ной поддержке с типовыми штаммами *B. japonicum* USDA 6T, *B. diazoefficiens* USDA 110T, *B. canariense* ВТА-1Т, *B. betae* LMG 21987Т, *B. rifense* СТАW71Т и *B. cytisi* СТАW11Т (Рисунок 13).

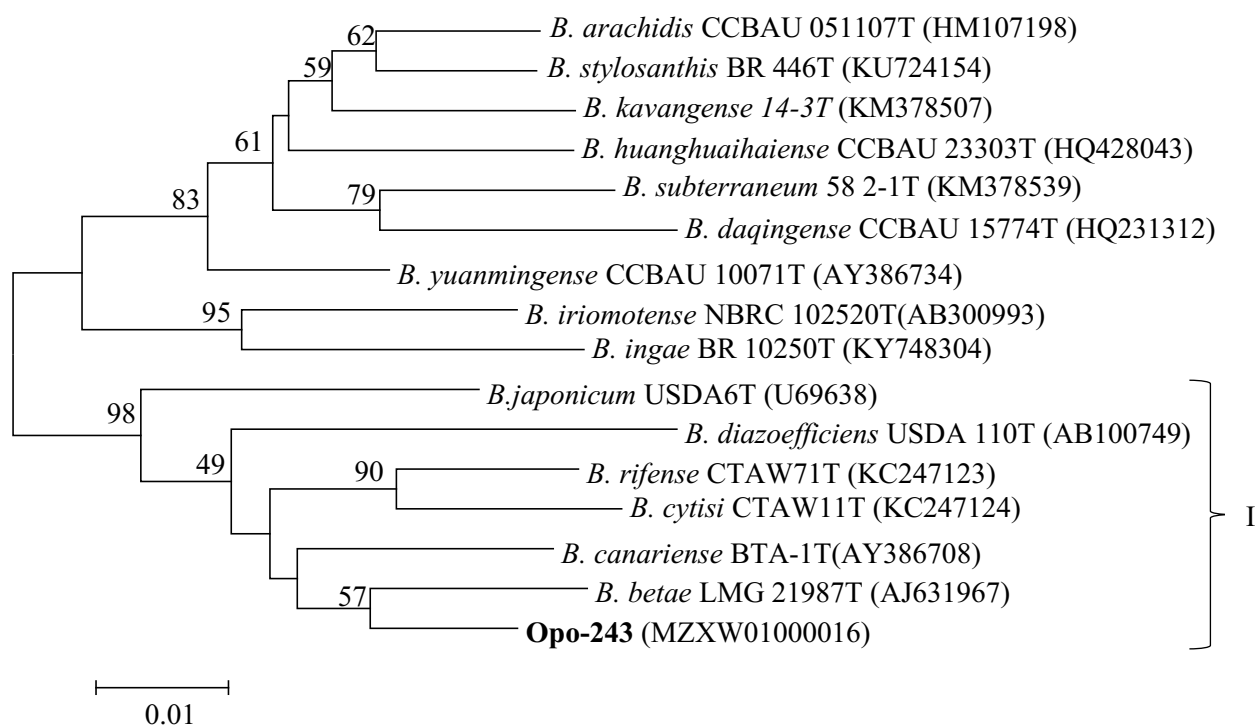


Рисунок 13. ITS-филограмма, отражающая таксономическое положение изолята Оро-243 и близкородственных видов *Bradyrhizobium*. Типовые штаммы обозначены литерой «Т». Номер изолята выделен жирным шрифтом. I - статистически-достоверно отличающийся кластер. Масштаб соответствует 0.01 заменам на 100 п.н. (эволюционным расстояниям). Цифрами указана статистическая значимость кластеризации (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных деревьев.

Филограмма построенная на основании конкатенированных генов *recA*, *glnII* и *proV* показала, что изолят Оро-243 наиболее близок к типовым штаммам *B. canariense* BTA1T, *B. rifense* СТАW71T и *B. cytisi* СТАW11T (Рисунок 14).

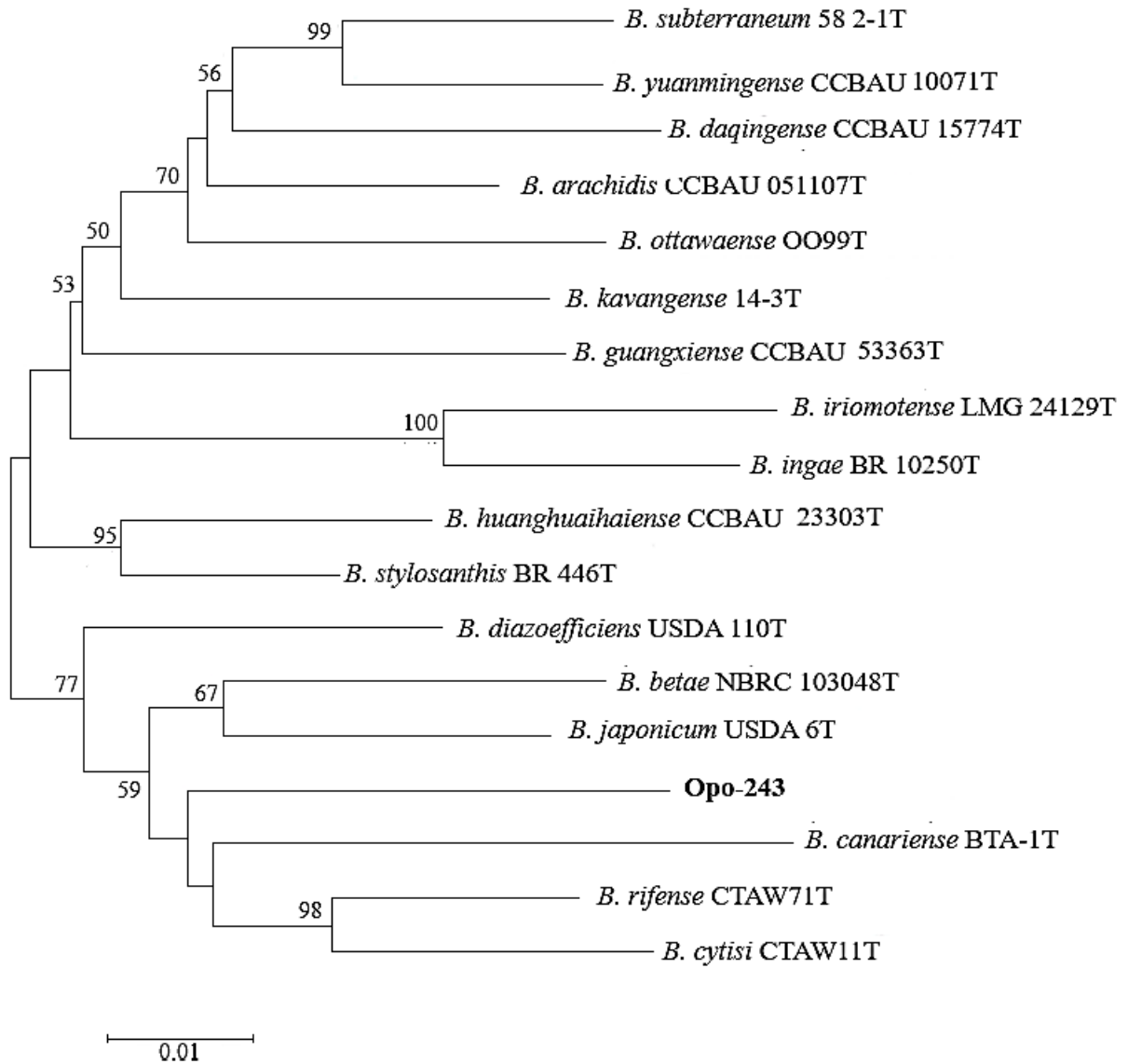


Рисунок 14. Филограмма на основе объединенных последовательностей генов *recA*, *glnII* и *rpoB*, отражающая таксономическое положение изолята Оро-243 и близкородственных видов *Bradyrhizobium*. Метод Neighbour-Joining. Типовые виды обозначены буквой «Т». Номер изолята выделен жирным шрифтом. Масштаб соответствует 0.01 замене на 100 п.н. (эволюционным расстояниям). Цифрами указана статистическая значимость кластеризации (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных деревьев.

Проценты гомологии по ITS региону и генам *recA*, *glnII* и *rpoB* между изолированным штаммом Оро-243 и типовыми штаммами, упомянутыми выше, представлены в Таблице 7. В связи с низкими процентами сходства по генам *rrs*,

recA, *glnII*, *rpoB* и ITS региону с ближайшими типовыми штаммами изолят Оро-243 был идентифицирован как *Bradyrhizobium sp.*

Также были обнаружены представители родов: *Acetobacter* (сем. *Acetobacteraceae*), *Acinetobacter* (сем. *Moraxellaceae*), *Burkholderia* (сем. *Burkholderiaceae*), *Microbacterium* (сем. *Microbacteriaceae*), *Sphingobacterium* (сем. *Sphingobacteriaceae*), *Stenotrophomonas* (сем. *Xanthomonadaceae*) - по 1 штамму; *Bacillus* (сем. *Bacillaceae*) - 2 штамма; *Sphingomonas* (сем. *Sphingomonadaceae*) - 3 штамма (Приложение 2.4.1 и 2.4.2).

Среди микросимбионтов, относящихся к порядку *Rhizobiales* были обнаружены представители родов *Rhizobium*, *Phyllobacterium*, *Mesorhizobium*, *Bosea* и *Bradyrhizobium* (Таблица 8).

Таблица 8. Виды микроорганизмов порядка *Rhizobiales*, выделенные из клубеньков остролодочника Попова.

Семейство/Вид	Штаммы	Всего
Семейство <i>Rhizobiaceae</i>:		7
<i>Rhizobium lusitanum</i>	Оро-157, Оро-161, Оро-234,	3
<i>Rhizobium sp.</i>	Оро-8, Оро-169, Оро-247	3
<i>Neorhizobium galegae</i>	Оро-7	1
Семейство <i>Phyllobacteriaceae</i>:		23
<i>Phyllobacterium ifriqiyense</i>	Оро-5	1
<i>Phyllobacterium trifolli</i>	Оро-160	1
<i>Mesorhizobium kowhaii</i>	Оро-324	1
<i>M. japonicum</i>	Оро-235, Оро-242	2
<i>Mesorhizobium sp.</i>	Оро-223, Оро-224, Оро-225, Оро-227, Оро-228, Оро-229, Оро-238, Оро-239, Оро-240, Оро-245, Оро-246, Оро-248, Оро-249, Оро-251, Оро-252, Оро-254, Оро-325, Оро-326	18
Семейство <i>Boseaceae</i>:		1
<i>Bosea vaviloviae</i>	Оро-230	1
Семейство <i>Bradyrhizobiaceae</i>:		1
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Оро-243	1

Доминирующее число изученных изолятов отнесено к роду *Mesorhizobium*, среди них обнаружены виды *M. japonicum*, который ранее был описан как

микросимбионт *Lotus* L. [157] и *M. kowhainii* - микросимбионт *Sophora* L. [108]. В литературе представители рода *Mesorhizobium* описаны как преобладающие бактерии, которые нодулируют растения рода *Oxytropis*, тогда как рода *Rhizobium*, *Sinorhizobium* и *Bradyrhizobium* были отнесены к минорным микросимбионтам [85, 145].

Вид *B. vaviloviae* впервые был выделен из клубеньков реликтового растения *Vavilovia formosa* (Северный Кавказ, РФ) в 2014 году [180], также обнаружен в клубеньках узкоэндемичных видов бобовых *O. pumilio*, *O. erecta*, *O. anadyrensis* и *O. kamtschatica*, произрастающих на полуострове Камчатка (РФ) [182]. В данной работе был обнаружен в клубеньках реликтовых бобовых *O. popoviana* и *A. chorinensis* (Байкальский регион, РФ). Вероятно, данный вид относится к примитивным микросимбионтам, которые могут вступать в низкоспецифичные взаимоотношения с широким спектром растений.

Проведенное исследование микросимбионтов реликтового вида остролодочника Попова показало их необычайно широкое генетическое разнообразие [176].

2.1.5 Видовой состав микросимбионтов астрагала хоринского (*Astragalus chorinensis* Bunge)

Астрагал хоринский (*Astragalus chorinensis*) относится к трибе Козлятниковые (*Galegeae* Dumort), подтриба Астрагаловые (*Astragalinae* DC.), род Астрагал (*Astragalus* L.). «Представляет собой многолетнее травянистое растение со стержневым корнем и развитым каудексом. Стеблей может быть несколько, они преподнимающиеся, 2 - 20 см высотой. Листочки линейно-ланцетные, в числе 4 - 5 (6) пар, 8 - 25 мм длиной, голые, реже оттопыренно-беловолосистые. Цветки (6 - 12) в густых коротких кистях. Венчик белый или светло-желтый, 14–15 мм длиной, с фиолетовым пятном на конце лодочки. Бобы шаровидно-вздутые, на короткой ножке, тонкоперепончатые, отогнутые или слегка поникающие. Растет в степях по

каменистым и щебнистым склонам, на песках» [77]. Является узколокальным эндемиком Приольхонья и Юго-Западного Забайкалья, внесён в Красную книгу Бурятии [34]. Реликт древнесредиземноморской миоцен-плиоценовой флоры [65].

В ходе экспедиции в Республику Бурятия были собраны образцы почвы и семена астрагала хоринского. В лабораторных условиях было получено 34 клубенька (Таблица 1). Из них было выделено 40 штаммов, 28 из которых было отобрано для дальнейшей идентификации. Предварительный филогенетический анализ 21 штамма, проведенный посредством RFLP анализа ITS-региона, выявил, что штаммы образуют 8 групп, имеющих разные типы профилей (Рисунок 15).

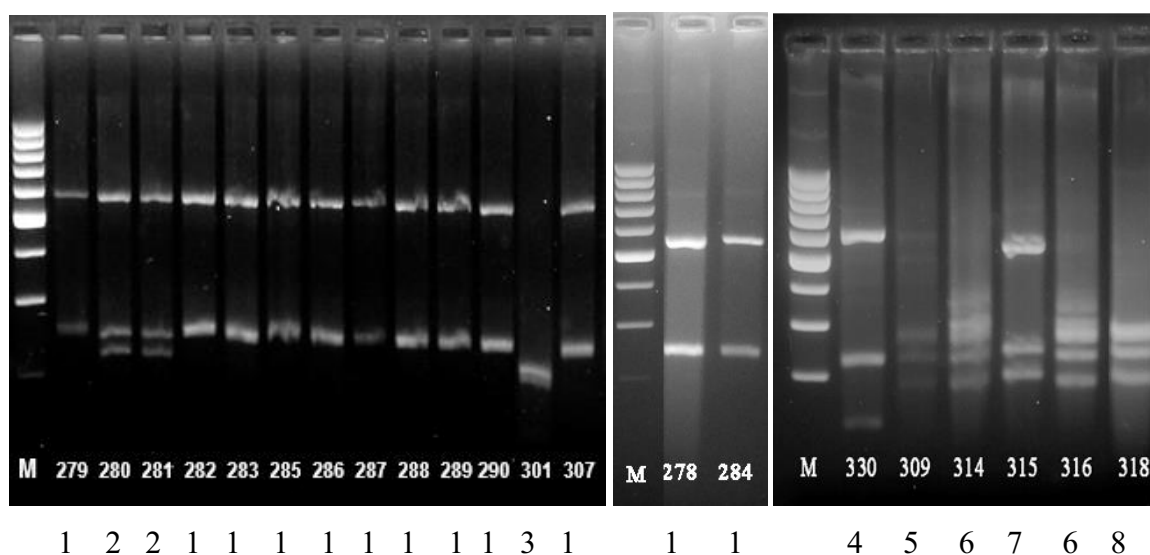


Рисунок 15. Электрофореграммы ITS-RFLP анализа 21 штамма, выделенного из клубеньков астрагала хоринского. Рестриктаза MspI. М - маркер длин ДНК 100-bp GeneRuler™; 1-8 - типы ITS-RFLP профиля.

С целью определения таксономической принадлежности представителей выявленных групп микроорганизмов и семи дополнительно взятых изолятов (без ITS-RFLP профилей) было проведено секвенирование гена *rrs* и сравнительный анализ с аналогичными последовательностями, депонированными в базе данных GenBank.

Один штамм, Ach-301, был быстрорастущим, колонии на среде YMSA появились на 3 сутки, он был отнесен к виду *Rhizobium lusitanum* (сходство с

типовым штаммом *R. lusitanum* P1-7T по гену *rrs* составила 99.7%). Идентификация путем секвенирования гена *rrs* 27 изолятов, колонии которых появились на среде YMSA на 5-й день, показала, что 12 из них (относящиеся к типу 1 ITS-RFLP профиля) принадлежат виду *Bosea vaviloviae* (сходство по гену *rrs* с типовым штаммом *B. vaviloviae* Vaf-18T - 99.7%).

Еще восемь ризобиальных штаммов (Ach-304, Ach-305, Ach-313, Ach-318, Ach-320, Ach-328, Ach-343 и Ach-347) были отнесены к разным видам рода *Mesorhizobium*. *Rrs*-филограмма, отражающая таксономическое положение исследуемых изолятов и типовых штаммов рода *Mesorhizobium*, представлена на Рисунке 16.

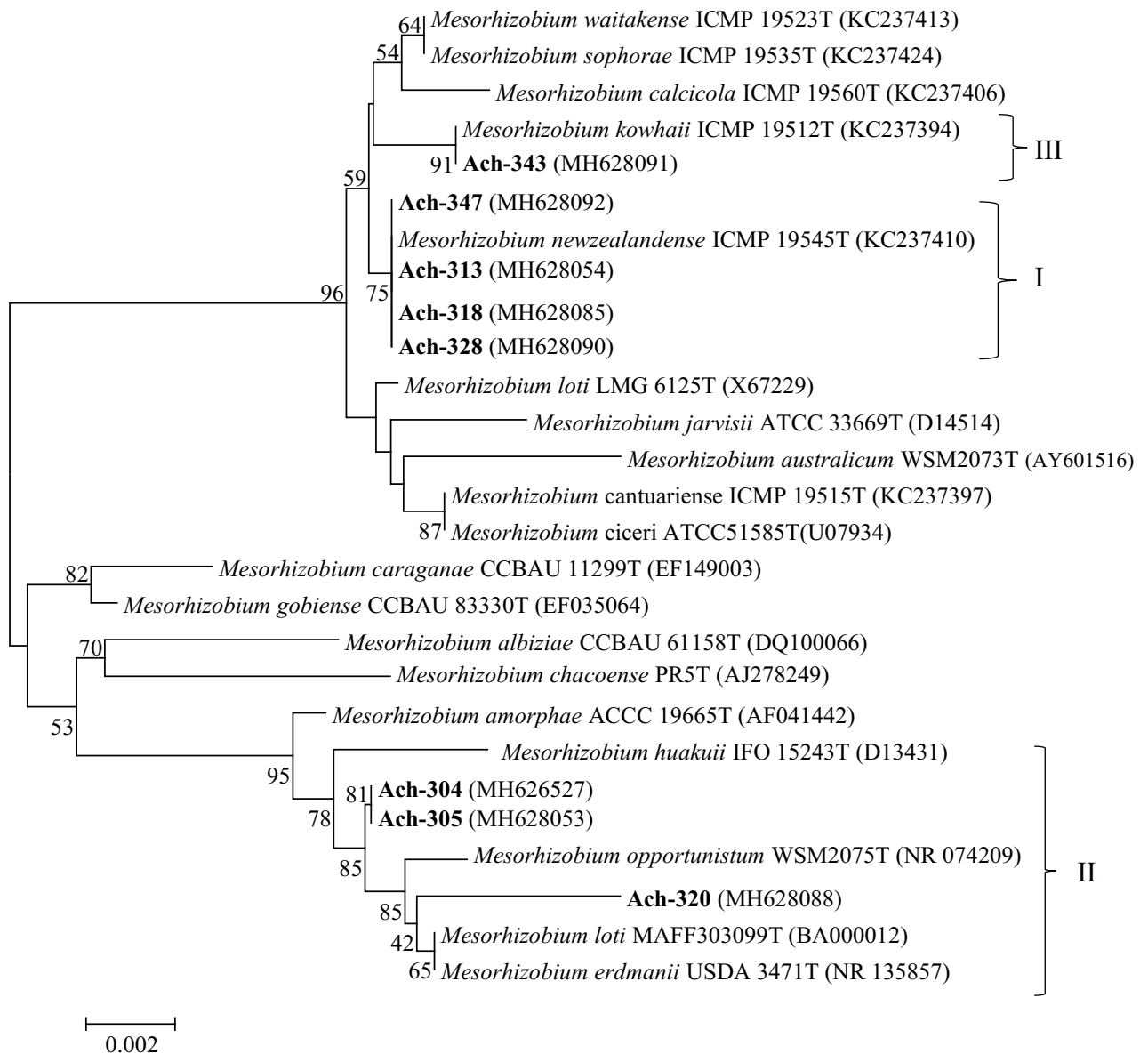


Рисунок 16. *Rrs*-филограмма, отражающая таксономическое положение исследуемых изолятов, выделенных из клубеньков астрагала хоринского и близкородственных видов рода *Mesorhizobium*. Литерой «Т» отмечены типовые штаммы. Номера изолятов выделены жирным шрифтом. I-II - статистически достоверно различающиеся кластеры. Масштаб соответствует 0.002 заменам на 100 п.н. (эволюционным расстояниям). Цифрами указана статистическая значимость кластеризации (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных деревьев.

Кластер I включал штаммы Ach-313, Ach-318, Ach-328, Ach-347 и типовой штамм *M. newzealandense* ICMP 19545T с уровнем поддержки 75% (Рисунок 16). Все они имели 100% сходство гена *rrs* с таковым у типового штамма и были описаны как *M. newzealandense*.

Изоляты Ach-304 и Ach-305 были сгруппированы вместе и были наиболее близки к типовому штамму *M. huakuii* IFO 5243T со степенью сходства по гену *rrs* 99.9% (кластер II, уровень поддержки 78%). Таким образом, штаммы Ach-304 и Ach-305 были отнесены к виду *M. huakuii*.

Кластер III включал штамм Ach-343 и типовой штамм *M. kowhaii* ICMP 19512T с уровнем поддержки 91%. Поскольку, сходство генов *rrs* между ними составляло 99.9%, штамм Ach-343 был описан как *M. kowhaii*.

Штамм Ach-320 был отнесен к *Mesorhizobium* sp. поскольку имел довольно низкую степень сходства (99.5%) с ближайшим типовым штаммом *M. japonicum* MAFF 303099T.

Еще семь штаммов: Ach-280, Ach-281, Ach-309, Ach-314, Ach-315, Ach-316 и Ach-330 были также определены только до рода и описаны как *Mesorhizobium* sp., так как имели низкую степень сходства по гену *rrs* с ближайшими типовыми штаммами. Изоляты Ach-280 и Ach-281 (относящиеся к типу 2 ITS-RFLP профиля) были наиболее близки к типовым штаммам *M. norvegicum* 10.2.2T и *M. loti* LMG 6125T (степень сходства изолята Ach-280 с обоими типовыми штаммами - 99.3%). Штаммы Ach-309 и Ach-330 (типы 5 и 4 ITS-RFLP профилей, соответственно), а также Ach-314 (тип 6 ITS-RFLP профиля вместе со штаммом Ach-316) были наиболее близки к типовому штамму *M. jarvisii* ATCC 33669T - степень сходства

составила 99.2 - 99.4%. Изолят Ach-315 имел 99.5% сходства по гену *rrs* с ближайшим типовым штаммом *M. australicum* WSM2073T (Приложение 2.5).

Таким образом, было показано, что астрагал хоринский также может вступать в симбиотические отношения с различными видами микроорганизмов семейств *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae* и *Boseaceae*. Однако наибольшее видовое разнообразие наблюдалось внутри рода *Mesorhizobium* (Таблица 9).

Таблица 9. Виды микроорганизмов порядка *Rhizobiales*, выделенные из клубеньков астрагала хоринского.

Семейство/Вид	Штаммы	Всего
Семейство <i>Rhizobiaceae</i>:		1
<i>Rhizobium lusitanum</i>	Ach-301	1
Семейство <i>Phyllobacteriaceae</i>:		15
<i>Mesorhizobium newzealandense</i>	Ach-313, Ach-318, Ach-328, Ach-347	4
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	Ach-304, Ach-305	2
<i>Mesorhizobium kowhaii</i>	Ach-343	1
<i>Mesorhizobium sp.</i>	Ach-280, Ach-281, Ach-309, Ach-314, Ach-315, Ach-316, Ach-320, Ach-330	8
Семейство <i>Boseaceae</i>:		12
<i>Bosea vaviloviae</i>	Ach-278, Ach-279, Ach-282, Ach-283, Ach-284, Ach-285, Ach-286, Ach-287, Ach-288, Ach-289, Ach-290, Ach-307	12

Виды *M. newzealandense* и *M. kowhaii*, обнаруженные в клубеньках астрагала хоринского, были недавно описаны как микросимбионты новозеландских эндемичных видов софоры распростертой (*Sophora prostrata* Buchanan) и софоры мелколистной (*Sophora microphylla* Aiton) [108]. Ризобияльный вид *M. huakuii* описан уже давно [100] и до сих пор был известен только как специфический микросимбионт астрагала синусового (*Astragalus sinicus* L.) [121, 136]. Из клубеньков других видов, например, астрагала приподнимающегося (*Astragalus adsurgens* Pall.) были выделены штаммы, относящиеся к видам *M. septentrionale* и *M. temperatum*, а также представители родов *Agrobacterium*, *Rhizobium* и *Sinorhizobium* [122]. Среди микросимбионтов астрагала острошероховатого

(*Astragalus scaberrimus* Bunge) описан вид *M. amorphae* [138]. Литературные данные по микросимбионтам рода *Astragalus* подтверждают их широкое разнообразие. Они принадлежат различным родам порядка *Rhizobiales*: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Mesorhizobium* [61, 122, 145, 202]. Очевидно, что растения рода *Astragalus* не являются строгими симбионтами, преобладание же определенных групп микросимбионтов у астрагала хоринского может быть связано с условиями произрастания (каменистые, преимущественно южные склоны, берега рек, галечники). Возможно, представители рода *Mesorhizobium* более приспособлены к подобным условиям существования.

2.2 Симбиотические гены изолятов

Проведение анализа симбиотических генов было необходимо для определения роли разных изолятов, выделенных из одного клубенька, в формировании симбиотических отношений между микроорганизмами и растением. Для этого было отобрано 6 пар микросимбионтов, относящихся к разным бактериальным таксонам. Три пары были изолированы из остролодочника трехлисточкового, две пары – из остролодочника Попова и одна пара - из астрагала хоринского. Результаты поиска симбиотических генов *nod*, *fix*, *nif*, *noe* и *nol* показали значительные отличия между изолятами: у некоторых из них были обнаружены единичные симбиотические гены, в то время как другие изоляты обладали достаточно полными наборами генов для успешного формирования симбиоза. Полученные результаты представлены в виде таблицы (Таблица 10).

Таблица 10. Гены, ответственные за формирование и функционирование симбиоза (*nod*, *fix*, *nif*, *noe* и *nol*) у 6 пар микросимбионтов, относящихся к разным ризобийным таксонам и изолированным из остролодочника трехлисточкового, остролодочника Попова и астрагала хоринского. Каждая пара изолятов была выделена из одного клубенька.

Растение-хозяин	Пары изолятов	Род, вид	Симбиотические гены				
			<i>nod</i>	<i>nif</i>	<i>fix</i>	<i>nol</i>	<i>noe</i>
Остролодочник трехлисточковый	Tri-38	<i>Phyllobacterium zundukense</i>	<i>GNPQ</i>	-	-	-	-
	Tri-39	<i>Bosea vestrisii</i>	-	-	-	-	-
	Tri-48	<i>Phyllobacterium zundukense</i>	<i>GMNPQVW</i>	-	<i>NO</i>	-	-
	Tri-49	<i>Bosea vestrisii</i>	<i>MPQ</i>	-	<i>JL</i>	<i>O</i>	-
	Tri-43	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	-	<i>LS</i>	-	-	<i>KJ</i>
	Tri-44	<i>Bosea vestrisii</i>	-	-	-	-	-
	Остролодочник Попова	Оро-242	<i>M. japonicum</i>	<i>ABCDEFGHIJGNLMTZ</i>	<i>ABHDK ENQTZX WSU</i>	<i>ABCXGHI SJKLNOP Q</i>	-
Оро-243		<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>GNPQT</i>	<i>LS</i>	<i>GHISJKL NOPQ</i>	<i>K</i>	<i>L</i>
Оро-234		<i>Rhizobium lusitanum</i>	<i>GMNPQT</i>	-	<i>AB</i>	<i>L</i>	<i>K</i>
Оро-235		<i>M. japonicum</i>	<i>ABCDEFGHIJLPQTWZ</i>	<i>ABHDK ENTZXV WS</i>	<i>ABCXGHI SJKLNOP Q</i>	<i>L</i>	<i>K</i>
Ach-343		<i>Mesorhizobium kowhainii</i>	<i>ABCDEFGHIJGNLMP QZ</i>	<i>ABHDK ENQTZX WS</i>	<i>ABCXGHI SNOPOQ</i>	-	-
Ach-307	<i>Bosea vaviloviae</i>	<i>MT</i>	<i>U</i>	<i>ABR</i>	<i>L</i>	-	

Изоляты *M. japonicum* Оро-242, *M. japonicum* Оро-235 и *M. kowhainii* Ach-343 имели общие гены *nodABC*, необходимые для клубенькообразования [201] и некоторые другие гены *nod*, *nol* и *noe*, участвующие в биосинтезе, модификации и транспорте ризобияльных Nod-факторов (NFs) [86, 152, 153, 167], а также гены *nif* и *fix*, необходимые для фиксации азота: гены *nifHDK* и *nifENB*, кодирующие структурные и каталитические компоненты нитрогеназного комплекса [112], а также гены *fixABCX*, *fixNOPQ* и *fixGHIS*, участвующие в переносе электронов к нитрогеназе и оксидазному комплексу [116, 119]. Штамм *Bradyrhizobium* sp. Оро-243 не содержал основных генов *nod*, *nif* и *fix*, однако были обнаружены некоторые другие симбиотические гены: *nodNTGPQ*, *nifLS*, *fixNOPQGHISJKL*, *nolK* и *noeL*.

В изолятах Tri-38 и Tri-48T, относящихся к новому виду *Phyllobacterium zundukense*, также отсутствовали общие гены *nodABC*, однако были обнаружены отдельные симбиотических гены, имеющие хромосомную локализацию: гены *nodG*, *nodM*, *nodN*, *nodPQ*, *nodVW*, *fixN*, *fixO* - в штамме Tri-48T; гены *nodG*, *nodN*, *nodPQ* - в штамме Tri-38. Данные гены, в частности *nodG*, *nodM* и *nodN*, кодируют ферменты, которые участвуют в биосинтезе и модификации Nod-факторов: 3-оксоацил-АПБ редуктазы [152], глюкозаминсинтазы [91, 151] и дегидратазы [91], гены *nodPQ* отвечают за синтез донора сульфатной группы комплексом из АТФ-сульфуриказы (*nodP*) и АФС-киназы (*nodQ*), *nodVW* - за транскрипционную регуляцию генов *nod/nol/noe* [66]. А гены *fixN*, *fixO* участвуют в переносе электронов к нитрогеназе и оксидазному комплексу [116, 119].

Из этого можно сделать предположение, что штаммы, не имеющие основных генов нодуляции, следуют за клубенькообразующими ризобиями во время формирования симбиоза и участвуют в образовании многокомпонентной симбиотической системы. Одновременное присутствие на корнях микросимбионтов, которые могут иметь комплементарные симбиотические гены, вероятно, может влиять и на эффективность симбиотических отношений с реликтовыми видами бобовых растений.

2.3 Комплементация симбиотических генов, эффективность и хозяйская специфичность изолятов

Для изучения феномена комплементации симбиотических генов у ризобиальных микросимбионтов было отобрано 2 пары изолятов: *M. japonicum* Оро-242 и *Bradyrhizobium* sp. Оро-243 (выделены из одного клубенька на остролодочнике Попова), а также *M. kowhii* Ach-343 и *M. japonicum* Оро-235 (выделены из клубеньков на астрагале хоринском и остролодочнике Попова, соответственно). Изолят Оро-242 имел основные *nod*, *nif* и *fix* гены, парный штамм Оро-243 ими не обладал, однако содержал 5 дополнительных генов (*nodPQ*, *nifL*,

nolK и *noeL*), влияющих на специфичность растительно-микробных взаимодействий посредством модификации Nod-факторов (Таблица 11). Гены *nolK* и *noeL* ответственны за фукозилирование Nod-факторов [139, 159], а гены *nodPQ*, участвуют в их сульфатировании [173]. Ранее было показано, что мутации в этих четырех генах приводят к неспособности ризобий вступать в симбиоз с растением-хозяином или значительно снижают конкурентоспособность [146, 188, 201].

Вторая пара изолятов (*M. kowhainii* Ach-343 и *M. japonicum* Оро-235) была отобрана, как имеющая наибольшее количество комплементарных локусов: изолят Ach-343 содержал дополнительные гены *nodG*, *nodM*, *nodN*, и *nifQ*, в то время как гены *nodT*, *nodW*, *nifV* и *fixJKL* присутствовали только у изолята Оро-235. Кроме того, штамм Оро-235 имел два дополнительных гена для модификации Nod-факторов, отсутствующие у Ach-343: ген *noeK*, который участвует в фукозилировании [146] и ген *nolL*, участвующий в ацетилировании фукозильного остатка [104] (Таблица 11).

Таблица 11. Штаммы, выделенные из клубеньков остролодочника Попова (*M. japonicum* Оро-242, Оро-235, *Bradyrhizobium sp.* Оро-243) и астрагала хоринского (*M. kowhainii* Ach-343), имеющие разные наборы симбиотических генов и отобранные для проведения микровегетационных опытов. Пара изолятов Оро-242 и Оро-243 была выделена из одного клубенька, изоляты Ach-343 и Оро-235 – из клубеньков разных растений. В квадратных скобках отмечены гены, отсутствующие у парного изолята.

Пары изолятов	Симбиотические гены				
	<i>nod</i>	<i>nif</i>	<i>fix</i>	<i>nol</i>	<i>noe</i>
Оро-242	[ABCDEFGHIJ]GN[L M]T[Z]	[ABHDKENQZ XW]S[U]	[ABCX]GHISJ KLNOPQ	-	[K]
Оро-243	GN[PQ]T	[L]S	GHISJKLNOP Q	[K]	[L]
Ach-343	ABCDEFGHIJ[GN]L[M]PQZ	ABHDKEN[Q] TZXWS	ABCXGHISNO PQ	-	-
Оро-235	ABCDEFGHIJLPQ[T W]Z	ABHDKENTZ X[V]WS	ABCXGHIS[JK L]NOPQ	[L]	[K]

Вегетационный опыт №1

Чтобы определить симбиотических фенотип первой пары штаммов *M. japonicum* Оро-242 и *Bradyrhizobium* sp. Оро-243 были проведены два стерильных вегетационных опыта в аналогичных условиях с использованием вариантов моно- и совместной инокуляции растения-хозяина (остролодочник Попова). Результаты влияния различной инокуляции на биомассу проростков, корней и ацетилен-редуктазную активность в условиях стерильного вегетационного опыта представлены в Таблице 12.

Таблица 12. Эффект моно- и совместной инокуляции растений остролодочника Попова штаммами *M. japonicum* Оро-242 и *Bradyrhizobium* sp. Оро-243 в условиях стерильного вегетационного опыта. Изолят Оро-243 не образует клубеньки. Данные представляют собой средние значения \pm SD, $n = 12$. Обозначения: DW – сухой вес, * - различные литеры показывают достоверные различия между вариантами инокуляции (LSD тест, $P < 0.05$).

Вариант инокуляции	Биомасса проростков, мг DW растение ⁻¹	Биомасса корней, мг DW растение ⁻¹	Ацетилен-редуктазная активность, $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ растение ⁻¹ час ⁻¹
Контроль без инокуляции	2.2 \pm 0.3 a*	0.7 \pm 0.2 a	0.1 \pm 0.02 a
Оро-243	2.3 \pm 0.2 a	0.6 \pm 0.1 a	0.1 \pm 0.01 a
Оро-242	2.8 \pm 0.2 ab	1.0 \pm 0.1 b	2.1 \pm 0.4 b
Оро-242 + Оро-243	3.2 \pm 0.3 b	1.2 \pm 0.2 b	2.3 \pm 0.3 b

Как и предполагалось, фиксирующие азот клубеньки наблюдались в двух вариантах инокуляции: изолятом Оро-242 и в варианте совместной инокуляции обоими штаммами. Штамм *Bradyrhizobium* sp. Оро-243 не мог самостоятельно образовывать клубеньки, однако после совместной инокуляции с изолятом *M. japonicum* Оро-242 значительно повышалась скорость образования и размер клубеньков. Результаты по скорости образования клубеньков после инокуляции

Оро-242 и совместной инокуляции обоими штаммами представлены графически (Рисунок 17).

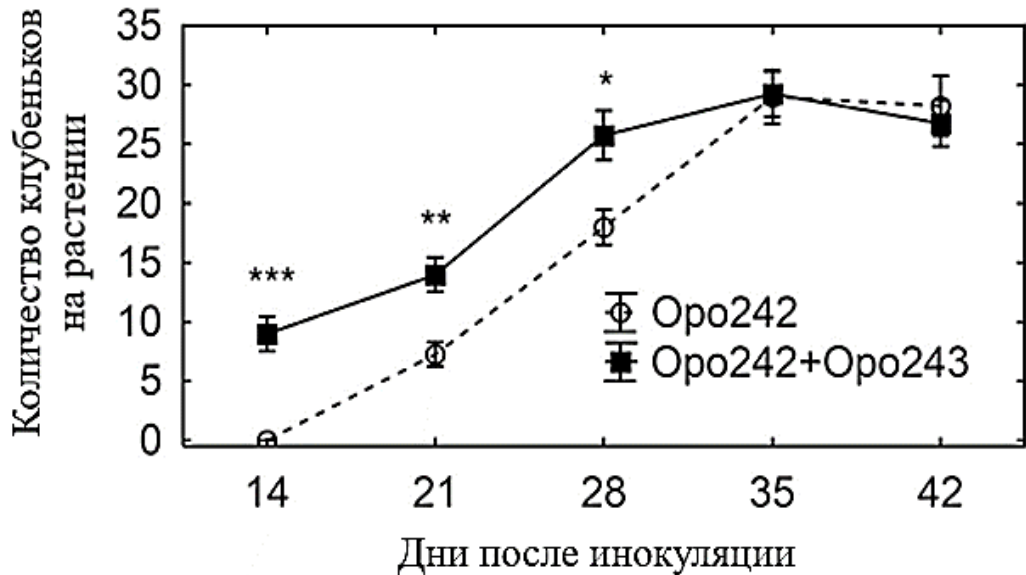
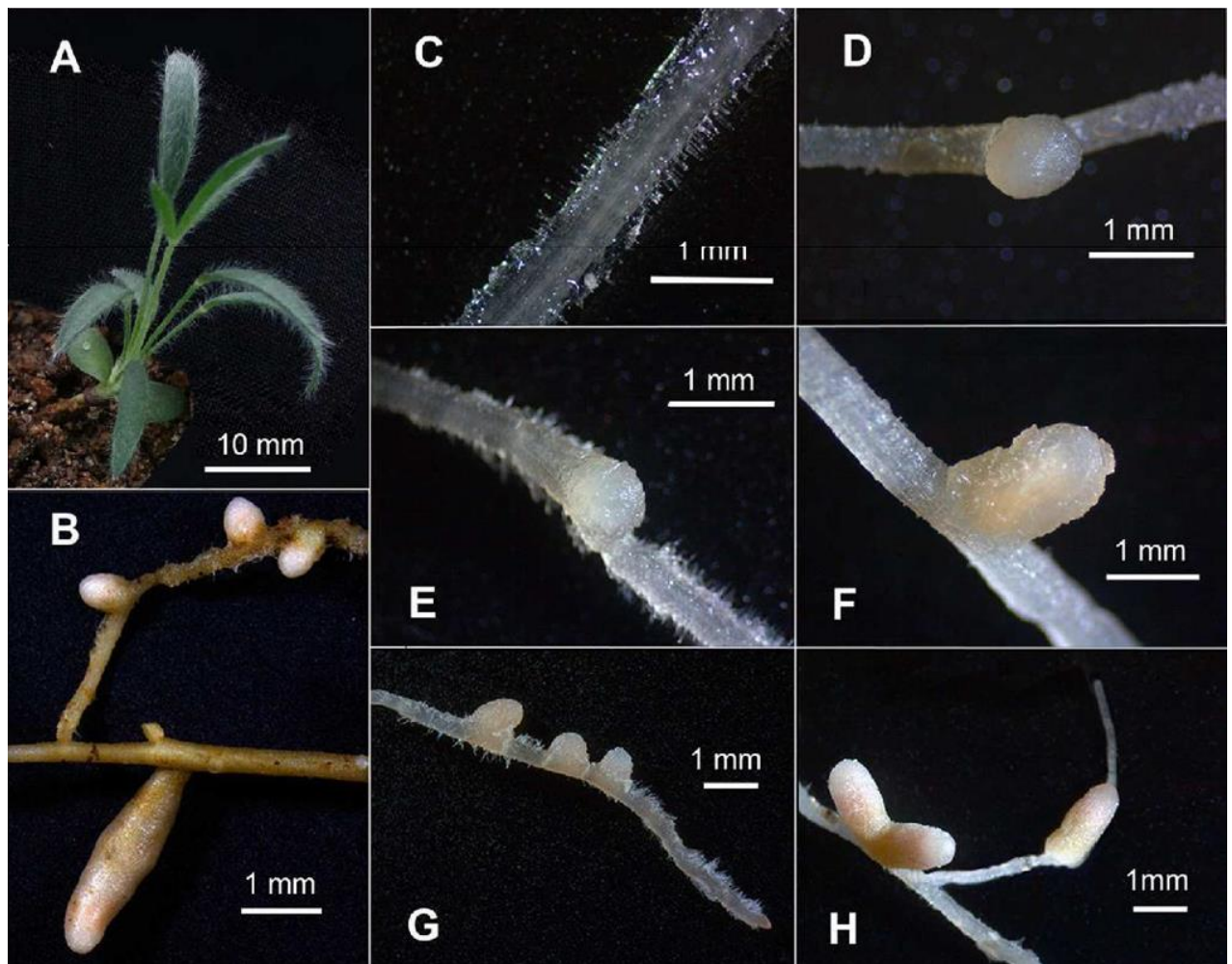


Рисунок 17. Клубенькообразование на корнях остролодочника Попова после моноинокуляции изолятом Оро-242 и совместной инокуляции изолятами Оро-242 и Оро-243 в стерильных вегетационных опытах. Звездочки указывают вероятность при $P < 0,0001$ (***), $P < 0,001$ (**) и $P < 0,05$ (*), соответственно (t-тест Стьюдента). Данные двух экспериментов в 6-кратной повторности.

При одновременной инокуляции штаммами Оро-242 и Оро-243 первые клубеньки появились через 2 недели, тогда как при инокуляции одним штаммом Оро-242 только через 3 недели. Количество клубеньков значительно увеличилось в ходе эксперимента и стабилизировалось через 4 недели при совместной инокуляции и через 5 недель, при инокуляции растений штаммом Оро-242 (Рисунок 17). Можно предположить, что ускорение процесса нодуляции было связано с дополнительной модификацией Nod-факторов, которая определялась присутствием генов *nodK*, *nodL* и *nodPG* в штамме Оро-243. Выделенные из клубеньков штаммы, идентифицированные секвенированием гена *rrs*, соответствовали тем, которые использовались для инокуляции. Соотношение штаммов Оро-242 и Оро-243 составляло приблизительно 20 к 1. Неизвестно, как изолят Оро-243 проникает в клубеньки, однако ранее было показано, что некоторые

штаммы, связанные с *Bradyrhizobium*, не имеющие общих генов *nodABC*, могли заражать растения тропических бобовых растений *Aeschynomene spp.* через эпидермальные «трещины» [126, 161, 166].

Фотографии растения и клубеньков остролодочника Попова, полученных в стерильном в вегетационном опыте после 2, 4 и 6 недель роста представлены на Рисунке 18.



50x29mm (300 x 300 DPI)

Рисунок 18. Фотографии растения и клубеньков остролодочника Попова, полученных в вегетационном опыте (А, В) и после 2, 4 и 6 недель роста в гнотобиотических условиях (С - Н): С, Е, G – моноинокуляция изолятом Оро-242; В, D, F, Н – совместная инокуляция изолятами Оро-242 и Оро-243; С, D – после 2 недель; Е, F – после 4 недель; В, G, Н – после 6 недель культивирования.

Форма клубеньков была округлой на ранних стадиях (Рисунок 18. Фото D, E), но позже они становились более вытянутыми и преимущественно без ветвлений (Рисунок 18. Фото F - H). Клубеньки отличались по своим размерам: образованные штаммом Оро-242, были примерно вдвое меньше, чем появившиеся после инокуляции смесью штаммов Оро-242 и Оро-243. Это явление может быть связано с более ранним образованием клубеньков при совместной инокуляции.

Таким образом, впервые было продемонстрировано, что штаммы, выделенные из одного и того же клубенька на реликтовом бобовом растении остролодочник Попова, могут иметь комплементарные наборы симбиотические генов, а их одновременное присутствие на корнях повышает скорость клубенькообразования [29, 176].

Вегетационный опыт №2

Симбиотические свойства второй пары штаммов *M. kowhainii* Ach-343 и *M. japonicum* Оро-235, а также флуоресцентно-меченых вариантов Ach-343(pHC60) и Оро-235(pMP4655) были изучены в вегетационном опыте с растениями-хозяевами астрагалом хоринским и остролодочником Попова. Штамм Ach-343(pHC60) содержал плазмиду pHC60 (с кодирующей последовательностью красного флуоресцентного белка mCherry), штамм Оро-235(pMP4655) плазмиду pMP4655 (с геном зеленого флуоресцентного белка EGFP). Все штаммы образовали азотфиксирующие клубеньки на обоих видах растений. Однако влияния штаммов на биомассу проростков растений остролодочника Попова обнаружено не было. Результаты измерений количества клубеньков, биомассы проростков и ацетилен-редуктазной активности в условиях стерильных вегетационных опытов представлены в Таблице 13. Разницы в симбиотических параметрах между немечеными штаммами и их флуоресцентно-мечеными вариантами также обнаружено не было (Таблица 13).

Таблица 13. Симбиотические свойства немеченых штаммов *M. kowhaili* Ach-343 и *M. japonicum* Оро-235, а также их флуоресцентно-меченых вариантов в вегетационном опыте с их растениями-хозяевами астрагалом хоринским и остролодочником Попова. Данные представляют собой средние значения \pm SD, полученные в одном опыте ($n = 12$). Обозначения: NN – количество клубеньков (растение⁻¹), PB – биомасса растения (мг сырого веса растения⁻¹), ARA – ацетиленредуктазная активность (nmol C₂H₄ растение⁻¹ час⁻¹), ND – не определялось. Различные литеры показывают достоверные различия между вариантами инокуляции (LSD тест, $P < 0.05$).

Штамм	Растение хозяин					
	Астрагал хоринский			Остролодочник Попова		
	NN	PB	ARA	NN	PB	ARA
Ach-343	2.7 \pm 0.7a	121 \pm 11a	68 \pm 23a	1.0 \pm 0.5a	68 \pm 7a	20 \pm 6a
Ach-343 (pHC60)	3.2 \pm 0.5a	142 \pm 17a	76 \pm 22a	1.2 \pm 0.7a	60 \pm 7a	22 \pm 7a
Оро-235	2.8 \pm 0.6a	146 \pm 19a	55 \pm 16a	1.6 \pm 0.6a	73 \pm 9a	16 \pm 4a
Оро-235(pMP4655)	2.5 \pm 0.7a	135 \pm 18a	70 \pm 19a	2.0 \pm 0.9a	65 \pm 6a	25 \pm 9a
Контроль без инокуляции	ND	76 \pm 6b	ND	ND	65 \pm 8a	ND

Вегетационный опыт №3

Для изучения симбиотической комплементации генов и хозяйской специфичности были отобраны флуоресцентно-меченые штаммы *M. kowhaili* Ach-343(pHC60) и *M. japonicum* Оро-235(pMP4655). Штаммы имели значительные различия в наборах симбиотических генов и дополняли друг друга 12 генами *nod*, *nif*, *fix*, *noe* и *nol* (Таблица 11). Вегетационный опыт был поставлен с использованием вариантов моно- и совместной инокуляции пяти видов бобовых растений. Их семена были собраны в ходе экспедиций в Байкальский регион. Астрагал шелковисто-седой (*Astragalus sericeocanus* Gontsch.) - редкий, эндемичный для восточного побережья озера Байкал вид, который является источником ценных вторичных метаболитов, обладающих лекарственным действием [82]. Солодка уральская (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) - реликт пустынной палеогеновой флоры, одним из местонахождений является территория Прибайкальского национального парка, ценное лекарственное растение [11].

Остролодочник дерновинный (*Oxytropis caespitosa* Pall.) - эндемик Забайкалья и ксеротермический реликт Амурской области, численность которого сокращается в результате изменения условий существования [64]. Также были использованы широко распространенные кормовые бобовые растения: люцерна посевная (*Medicago sativa* L.) и клевер луговой (*Trifolium pratense* L.).

Результаты опыта показали, что штаммы Ach-343 и Оро-235 имеют широкий спектр растений-хозяев, включая различные виды и роды бобовых из триб Козлятниковые (род Астрагал, Остролодочник, Солодка) и Клеверные (род Клевер). Уже после 2 недель культивирования клубеньки наблюдались на корнях *A. sericeocanus* (во всех вариантах инокуляции) и *G. uralensis* (при совместной инокуляции), на остальных растениях они появились после 3 недель. Количество клубеньков и их активность по восстановлению ацетилена различались в зависимости от видов растений и варианта инокуляции: как правило, штамм Оро-235 вызывал образование большего числа клубеньков и активнее восстанавливал ацетилен, чем штамм Ach-343 (Таблица 14).

Таблица 14. Эффект моно- и совместной инокуляции астрагала шелковисто-седого, солодки уральской, остролодочника дерновинного, люцерны посевной и клевера лугового штаммами *M. kowhainii* Ach-343 и *M. japonicum* Оро-235 в условиях стерильного вегетационного опыта. Данные представляют собой средние значения \pm SD, полученные в одном опыте (n = 15). Обозначения: NN – количество клубеньков (растение⁻¹), PB – биомасса растения (мг сырого веса растения⁻¹), ARA – ацетиленредуктазная активность (nmol C₂H₄ растение⁻¹ час⁻¹), ND – не определялось. Различные литеры показывают достоверные различия между вариантами инокуляции (LSD тест, P < 0.05).

Штамм для инокуляции	Растение-хозяин												
	Астрагал шелковисто-седой			Солодка уральская			Остролодочник дерновинный			Люцерна посевная		Клевер луговой	
	NN	PB	ARA	NN	PB	ARA	NN	PB	ARA	NN	PB	NN	PB
Ach-343	4.4 \pm 1.4a	235 \pm 24ab	14 \pm 4a	3.0 \pm 0.7a	139 \pm 10a	ND	3.3 \pm 0.8a	86 \pm 8a	10 \pm 2a	2.6 \pm 0.8a	191 \pm 14a	10 \pm 3a	169 \pm 26a
Оро-235	9.3 \pm 2.6b	384 \pm 49c	216 \pm 78b	1.5 \pm 0.6a	159 \pm 33a	6 \pm 4a	5.0 \pm 1.2a	121 \pm 13b	31 \pm 8b	1.6 \pm 0.7a	188 \pm 13a	25 \pm 12b	189 \pm 27a

Ach-343 + Оро-235	5.9 ± 1.3ab	289 ± 16b	32 ± 11a	8.0 ± 1.7b	277 ± 37b	54 ± 38b	3.5 ± 0.4a	113 ± 7b	30 ± 6b	1.9 ± 0.8a	180 ± 15a	11 ± 2a	138 ± 22a
Контроль без инокуляции	ND	190 ± 22a	ND	ND	167 ± 21a	ND	ND	78 ± 14a	ND	ND	170 ± 14a	ND	149 ± 35a

Эффект от совместной инокуляции штаммами Ach-343 и Оро-235 зависел от вида растений. Наблюдались изменения различных симбиотических параметров, включая азотфиксирующую активность и биомассу растений, как показатель симбиотической эффективности. Для наглядности ниже приведена диаграмма, демонстрирующая влияние совместной инокуляции штаммами *M. kowhainii* Ach-343 и *M. japonicum* Оро-235 на эффективность симбиозов с астрагалом шелковистоседым (*A. sericeocanus*), солодкой уральской (*G. uralensis*), остролодочником дерновинным (*O. caespitosa*) и клевером луговым (*T. pratense*) (Рисунок 19).

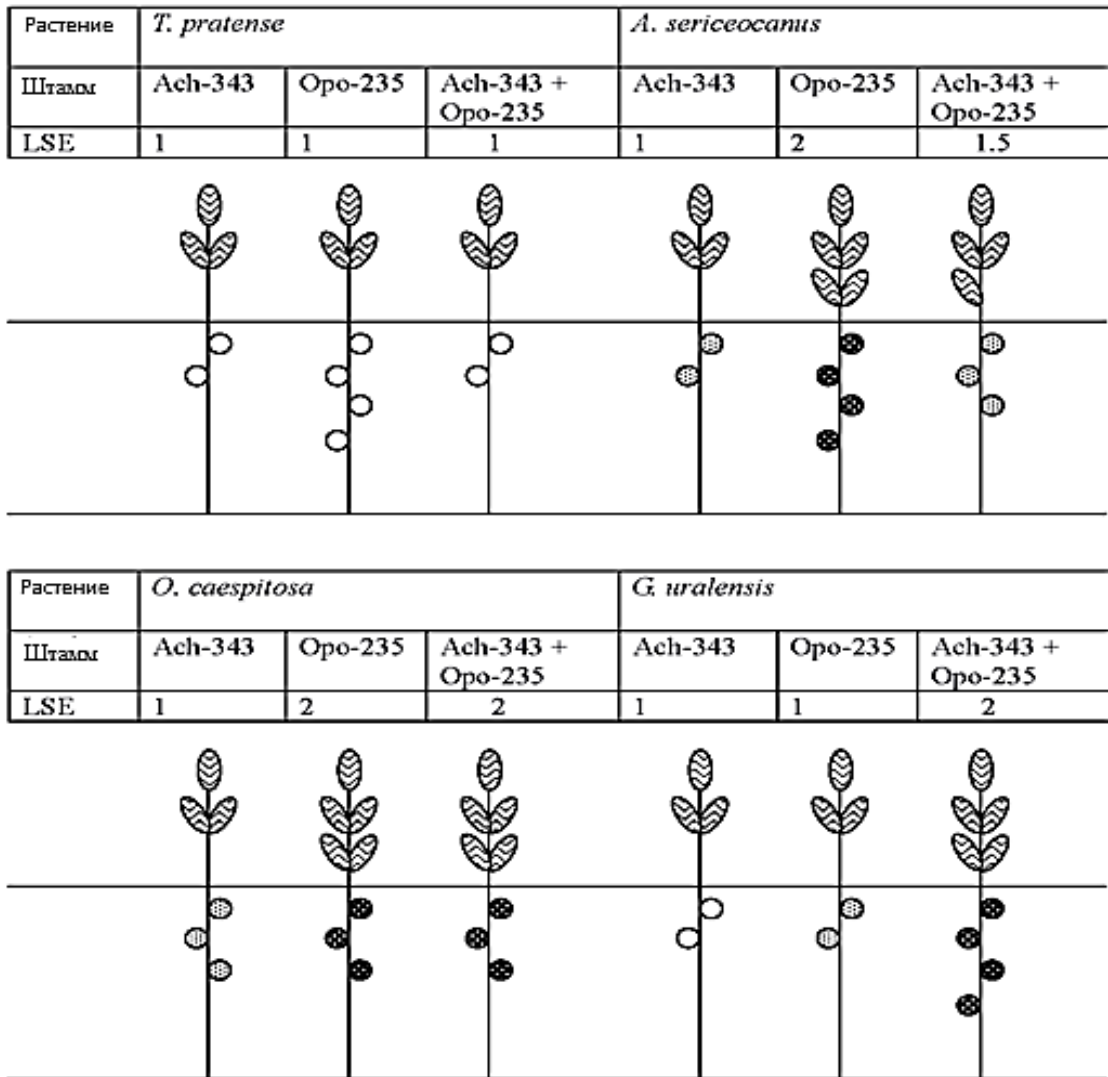


Рисунок 19. Диаграмма, демонстрирующая влияние совместной инокуляции штаммами *M. kowhii* Ach-343 и *Mesorhizobium* sp. Opo-235 на эффективность симбиозов с клевером луговым (*T. pratense*), астрагалом шелковисто-седым (*A. sericeocanus*), остролодочником дерновинным (*O. caespitosa*) и солодкой уральской (*G. uralensis*). Штаммы Ach-343 и Opo-235 содержали плазмиды pHC60 и pMP4655 и экспрессировали флуоресцентные белки mCherry (красный) и EGFP (зеленый) соответственно. LSE означает условный уровень симбиотической эффективности (растительная биомасса), ○ неактивные клубеньки, ⊙ более низкий уровень активности восстановления ацетилена, и ● более высокий уровень активности восстановления ацетилена.

Пояснение: если симбиотическую эффективность (LSE) штамма Ach-343 условно принять за уровень 1, то эффективность штамма Opo-235 соответствует уровням 1 или 2 (в зависимости от вида растения). При таком допущении симбиотическую эффективность в вариантах Ach-343 + Opo-235 можно обозначить как 1, 1.5 или 2, что соответствует уровню одного микросимбионта (клевер луговой

и остролодочник дерновинный), среднему уровню между двумя штаммами (астрагал шелковисто-седой) или уровню, превышающему оба штамма (солодка уральская).

Самым выразительным примером положительного комплементарного взаимодействия являлось увеличение всех измеренных симбиотических параметров на растениях Солодки уральской после совместной инокуляции штаммами *M. kowhaii* Ach-343 и *M. japonicum* Oro-235 по сравнению с моноинокуляцией обоими штаммами. Активность восстановления ацетилена в клубеньках солодки в варианте совместной инокуляции повышалась в 9 раз (Таблица 14). При этом совместная инокуляция астрагала шелковисто-седого привела к уменьшению количества клубеньков, снижению активности восстановления ацетилена и биомассы растений по сравнению с наиболее эффективным штаммом Oro-235. Полученные результаты позволяют предположить, что комплементация генов, ответственных за специфическую модификацию *Nod*-факторов у разных штаммов, может не только повысить эффективность нодуляции растения-хозяина, но и уменьшить её (эпистаз). Также возможно, что в этот процесс вовлечены другие генетические факторы.

Ранее было показано, что штамм Ach-343 имеет дополнительный ген *nifQ*, тогда как гены *nifV* и *fixJKL* присутствуют только в штамме Oro-235. Ген *nifQ* кодирует связывающий белок молибденового иона с редуктазной активностью, который известен как специфический донор молибдена для биосинтеза FeMo-кофактора [132]. Гены *nifV* требуются для созревания нитрогеназного MoFe-белка через синтез гомоцитратов [117]; гены *fixJKL* важны для экспрессии некоторых генов *nif* и *fix* [119]. Однако, механизмы комплементации генов *nif* и *fix*, локализованных в разных микросимбионтах внутри одного и того же клубенька, пока не ясны. По-видимому, изменение симбиотической активности может происходить из-за секретлируемых продуктов этих (или некоторых других) генов, внеклеточных метаболитов или определенных факторов, высвобождаемых в результате деградации бактерий. Одним из возможных механизмов, оказывающих положительное влияние на азотофиксирующую активность симбиоза, является

увеличение количества восстановленного молибдена, требуемого для высокой нитрогеназной активности и обеспечиваемого специальными Мо-связывающими белками.

Локализация флуоресцентно меченых штаммов *M. kowhii* Ach-343 (pHC60) и *M. jaronicum* Оро-235 (pMP4655) в клубеньках была подтверждена результатами конфокальной микроскопии (Рисунки 20, 21).

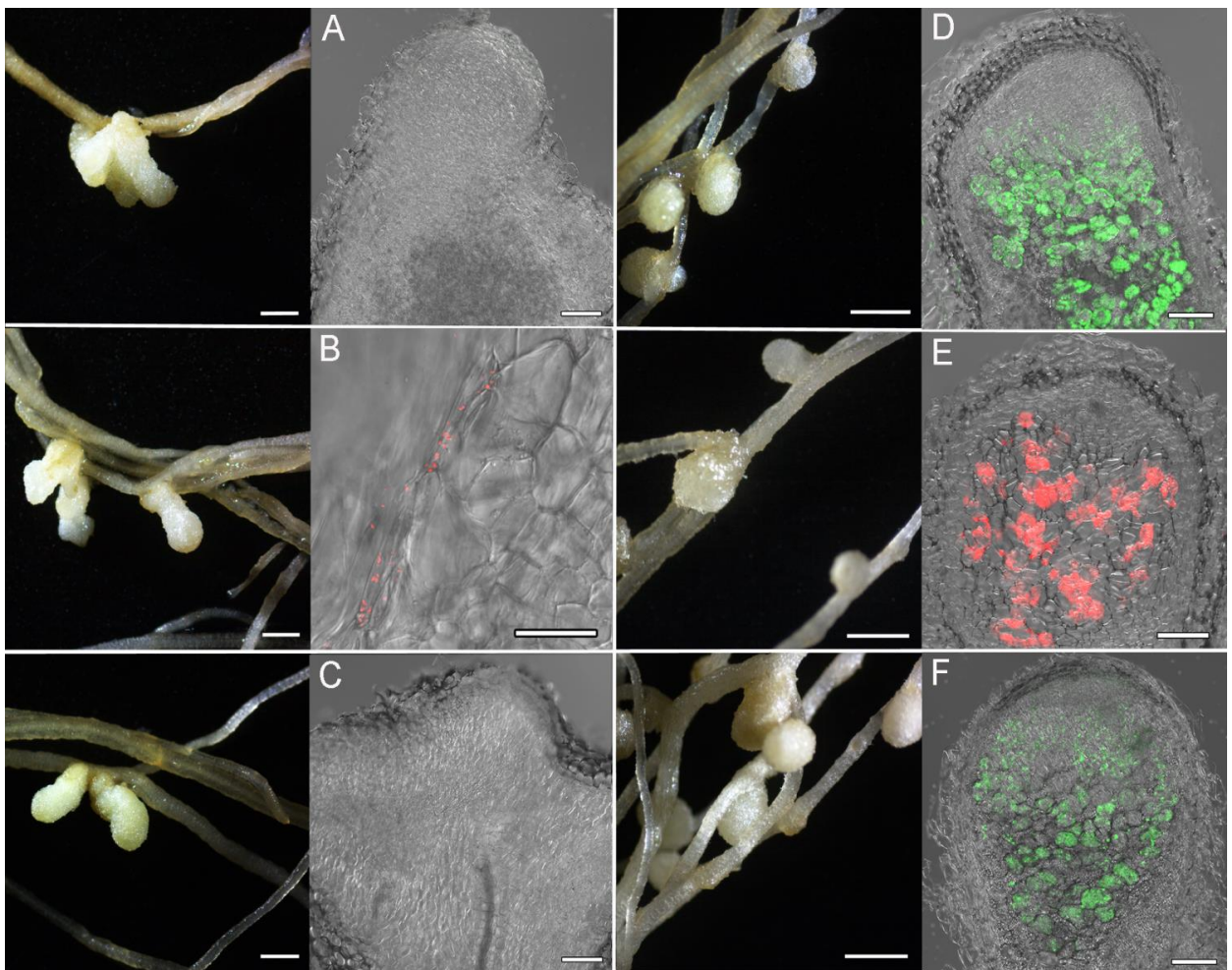


Рисунок 20. Изображения клубеньков, образованных флуоресцентно мечеными штаммами *M. jaronicum* Оро-235 (pMP4655) и *M. kowhii* Ach-343 (pHC60) на растениях люцерны посевной и клевера лугового в стерильном вегетационном опыте. Виды растений: А, В, С - люцерна посевная; D, E, F - клевер луговой. Инокуляция штаммами: А, D - Оро-235, наложение дифференциального интерференционного контраста (DIC) и зеленого канала; В, E - Ach-343, наложение DIC и красного канала; С, F - Оро-235 + Ach-343, наложение DIC, зеленого и красного каналов. В колонках 1 и 3 представлены общие виды клубеньков (шкала = 1 мм), колонки 2 и 4 - изображения конфокальной микроскопии (шкала = 100 мкм). Оро -235 бактерии в зеленом цвете, Ach-343 бактерии в красном цвете.

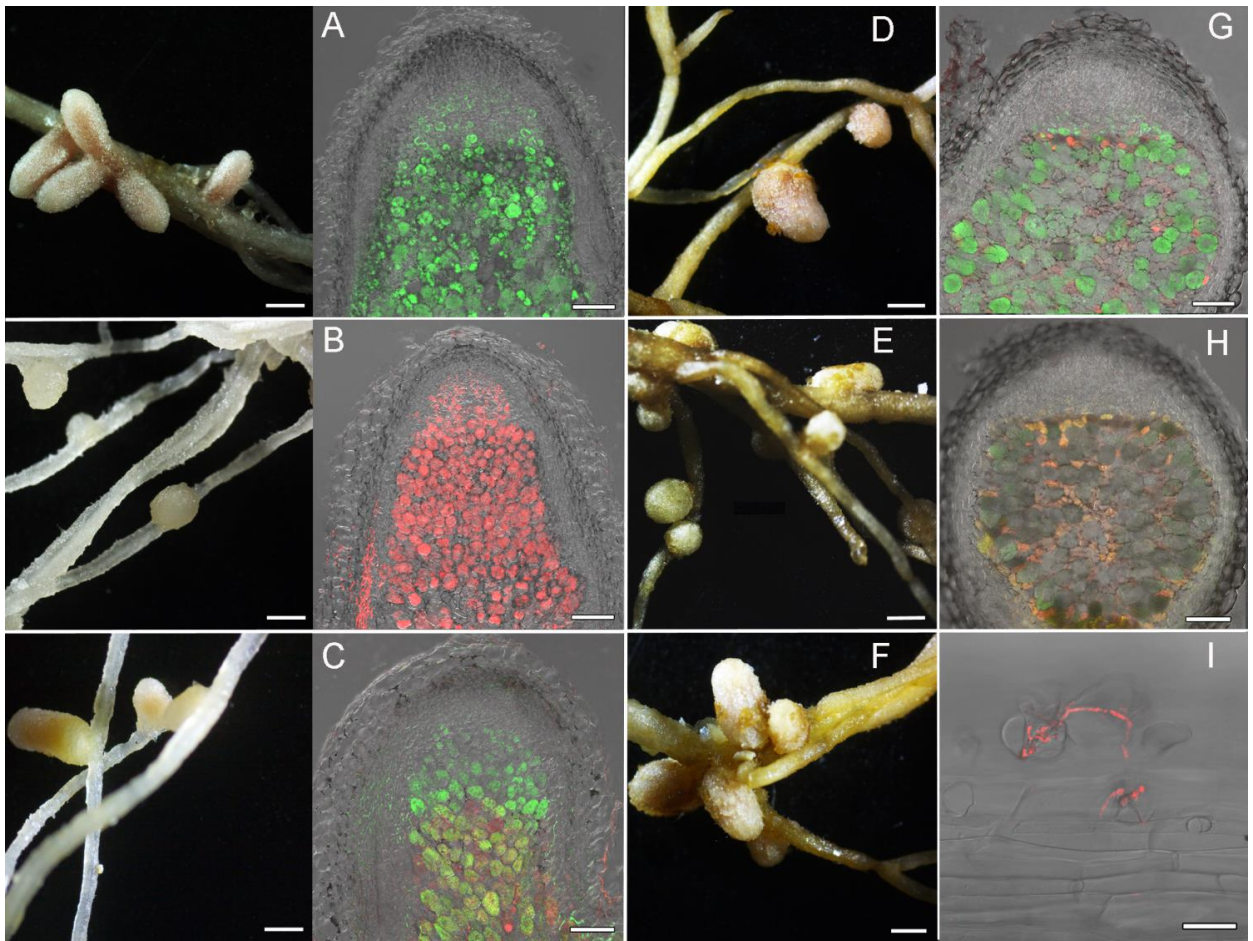


Рисунок 21. Изображения клубеньков, образованных флуоресцентно мечеными штаммами *M. kowhaii* Ach-343 (pHC60) и *M. japonicum* Oro-235 (pMP4655) на растениях астрагала шелковисто-седого, солодки уральской и остролодочника дерновинного в стерильном вегетационном опыте. Виды растений: А - астрагал шелковисто-седой; В, С - остролодочник дерновинный; D-I - солодка уральская. Инокуляция штаммами: А, D - Oro-235 в зеленом цвете; В, Е - Ach-343 бактерии в красном цвете; С, F, G, H, I - Oro-235 + Ach-343; G, H – совместная инфекция растительных клеток штаммами Oro-235 и Ach-343 в клубеньках солодки уральской; G - клубенек, в котором штаммы занимали разные клетки; H - клубенек, в котором имеются клетки с обоими штаммами (в желто-оранжевом цвете); I - инфекционная нить, образованная штаммом Ach-343. В колонках 1 и 3 представлены общий вид клубенька (шкала = 1 мм), колонки 2 и 4 - изображения конфокальной микроскопии (шкала = 100 мкм). А - наложение дифференциального интерференционного контраста (DIC) и зеленого канала; В, I - наложение DIC и красного канала; С, G, H - наложение DIC, зеленого и красного каналов.

На изображении можно видеть, что псевдоклубеньки, образованные на корнях люцерны посевной во всех вариантах инокуляции, не содержали ризобий

(Рисунок 20. Фото А-С), хотя на поверхности корня присутствовали бактериальные клетки штамма Ach-343 (Рисунок 20. Фото В). Напротив, в клубеньках на корнях клевера лугового, инокулированного штаммами Oro-235 (pMP4655) или Ach-343 (pHC60), присутствовали соответствующие бактерии (Рисунок 20. Фото D, E), тогда как в варианте совместной инокуляции наблюдались только клубеньки со штаммом Oro-235 (pMP4655) (Рисунок 20. Фото F). Во всех вариантах моноинокуляции растений астрагала шелковисто-седого, солодки уральской и остролодочника дерновинного соответствующие штаммы были обнаружены в клубеньках. При совместной инокуляции все клубеньки содержали штамм Oro-235 (pMP4655), однако штамм Ach-343 (pHC60) также наблюдался в некоторых клубеньках остролодочника (Рисунок 21. Фото С), а также во всех клубеньках и некоторых инфекционных нитях солодки уральской (Рисунок 21. Фото G-I). Следует отметить, что в клубеньках остролодочника дерновинного, содержащих оба штамма, некоторые растительные клетки были одновременно инфицированы обоими штаммами бактерий, но в некоторых растительных клетках присутствовал только один из штаммов (Рисунок 21. Фото С). В 3-х из 5 клубеньков солодки уральской оба штамма преимущественно присутствовали в одних и тех же клетках растений (Рисунок 21. Фото H); однако, в других клубеньках штаммы занимали разные клетки, а клетки, инфицированные Ach-343, были значительно меньше, чем клетки, инфицированные Oro-235 (Рисунок 21. Фото G). Форма клубеньков была различной в зависимости от вида растений и ризобияльного микросимбионта и варьировала от неправильной формы до круглой или удлиненной с одной или несколькими лопастями (Рисунок 20, 21).

Таким образом, показан феномен комплементарного взаимодействия, при котором совместная инокуляция растений таксономически различными микросимбионтами, которые могут занимать одни и те же клубеньки, приводит к симбиотическим фенотипам, отличающимся скоростью образования корневых клубеньков, их количеством, уровнем азотфиксации и/или значением биомассы растений. Было показано, что штаммы *M. kowhii* Ach-343 и *M. japonicum* Oro-235,

выделенные из клубеньков реликтовых бобовых *A. chorinensis* и *O. popoviana*, соответственно, имеют широкий спектр растений-хозяев, включая разные рода бобовых (Астрагал, Остролодочник, Солодка и Клевер) [183].

Полученные данные согласуются с предположением о том, что симбиотические системы реликтовых растений являются архаичными и могут быть образованы при участии разнообразных ризобиальных штаммов, принадлежащих различным таксономическим группам [178, 180]. Гены, ответственные за становление и эффективность симбиоза могут быть распределены между разными штаммами ризобиальных микросимбионтов.

ВЫВОДЫ ПО РАЗДЕЛУ

Исследование генетического разнообразия, филогении и симбиотического фенотипа микросимбионтов реликтовых бобовых растений в соответствии с темой настоящей работы позволило получить следующие результаты.

1. Создана уникальная коллекция микросимбионтов реликтовых бобовых растений Прибайкальского региона (195 штаммов), которая депонирована в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) и размещена для долгосрочного гарантированного хранения в УНУ «Станция низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов при -80°C». Информация о штаммах доступна в Интернет-базе данных ВКСМ (<http://arriam.ru/kollekciya-kul-tur1/>).

2. Впервые изучено генетическое разнообразие микросимбионтов таких реликтовых бобовых растений как чина низкая (триба Бобовые); копеечник щетинистый (триба Копеечниковые); остролодочник трехлисточковый, остролодочник Попова и астрагал хоринский (триба Козлятниковые), произрастающих в Байкальском регионе. С помощью молекулярно-генетических методов определено таксономическое положение 136 штаммов, из которых 105 относились к разным семействам и родам порядка *Rhizobiales*: *Mesorhizobium* и *Phyllobacterium* (сем. *Phyllobacteriaceae*) – 58 штаммов; *Neorhizobium* и *Rhizobium* (сем. *Rhizobiaceae*) – 21 штамм; *Bosea* (сем. *Boseaceae*) – 23 штамма; *Tardiphaga* и *Bradyrhizobium* (сем. *Bradyrhizobiaceae*) – 3 штамма. Многие изоляты относятся, вероятно, к новым видам, поскольку их сходство с ближайшими типовыми ризобияльными штаммами по гену *rrs* составляло менее 99.5%. Таким образом, показано значительное генетическое разнообразие микросимбионтов данных реликтовых бобовых растений.

3. В ходе исследования был описан новый вид *Phyllobacterium zundukense*, выделенный из клубеньков остролодочника трехлисточкового, с типовым штаммом Tri-48T = LMG 30371T = RCAM 03910T. Для видового разделения

изолятов и референтных штаммов использовали метод ANI, проводили сравнение спектра жирных кислот с референтными штаммами и изучение фенотипических свойств с помощью системы мультисубстратного тестирования GENIII MicroPlate (BioLog). Он не имел общих генов *nodABC*, однако содержал некоторые другие симбиотических гены, имеющие хромосомную локализацию.

4. В условиях стерильных вегетационных опытов изучена способность исследуемых штаммов нодулировать растения-хозяева. Показано успешное образование клубеньков на растениях остролодочника Попова и астрагала хоринского.

5. У растений остролодочника трехлисточкового, остролодочника Попова и астрагала хоринского обнаружено присутствие в одном клубеньке двух ризобияльных штаммов, имеющих разную таксономическую принадлежность. Проведено полногеномное секвенирование 12 штаммов и определены геномы ризобий, которые обладают комплементарными наборами генов, участвующих в выполнении взаимодополняющих задач в процессе становления и функционирования симбиоза. Результаты анализа симбиотических генных систем показали значительные отличия между изолятами. Сделано предположение, что штаммы, которые не имеют основных генов нодуляции, следуют за клубенькообразующими ризобиями во время формирования симбиоза, в результате чего образуются многокомпонентная симбиотическая система.

6. В ходе работы описано явление комплементарного взаимодействия, при котором совместная инокуляция растений таксономически-разными микросимбионтами, которые занимают одни и те же клубеньки, а в некоторых случаях и одни и те же клетки, приводит к появлению нового симбиотического фенотипа, отличного от формируемого каждым из штаммов отдельно. Эффект от совместной инокуляции растений двумя штаммами микросимбионтов в ряде случаев достоверно положителен и связан с выраженным ускорением процесса клубенькообразования, увеличением общего количества клубеньков и повышением уровня их азотфиксирующей активности.

7. Показано, что микросимбионты реликтовых бобовых имеют широкий спектр растений-хозяев, включая различные виды и роды бобовых из триб Козлятниковые (род Астрагал, Остролодочник и Солодка) и Клеверные (род Клевер). Локализация флуоресцентно маркированных вариантов штаммов Ach-343 (pHC60mCherry, red) и Oro-235 (pMP4655egfp, green) в клубеньках астрагала шелковисто-седого, солодки уральской, остролодочника дерновинного и клевера лугового доказана с помощью конфокальной микроскопии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование растительно-микробных симбиозов имеет ярко выраженные фундаментальные и прикладные аспекты. Это одно из важнейших развивающихся направлений в современной сельскохозяйственной биологии. Одним из основных модельных объектов для всестороннего изучения симбиотических отношений является бобово-ризобиальный симбиоз. Однако для изучения эволюционно более ранних растительно-микробных взаимоотношений было предложено использовать в качестве модельных объектов симбиотические системы с участием реликтовых бобовых растений, которые являются промежуточным звеном между исчезнувшими и ныне живущими видами. Изучение таких систем должно помочь в расшифровке механизмов взаимодействия симбионтов и определении закономерностей естественной эволюции симбиоза. Что будет способствовать проведению научно обоснованной селекции и созданию высокоэффективных симбиотических систем для экологически устойчивого сельского хозяйства.

Поэтому, в настоящей работе, впервые, было изучено таксономическое разнообразие клубеньковых микросимбионтов таких реликтовых бобовых растений как чина низкая (триба Бобовые), копеечник щетинистый (триба Копеечниковые), остролодочник трехлисточковый, остролодочник Попова и астрагал хоринский (триба Козлятниковые), произрастающих в Байкальском регионе. В работе применяли современные методы геносистематики. Полученные результаты свидетельствуют о том, что симбиотические системы реликтовых растений формируются с участием широкого спектра различных по таксономическому положению ризобий. В частности, показано необычайно большое разнообразие штаммов - микросимбионтов, которые относились к разным семействам порядка *Rhizobiales*: *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Boseaceae*. У всех растений были выделены представители семейств *Rhizobiaceae* и *Phyllobacteriaceae*. Однако наибольшее количество выделенных штаммов принадлежало семейству *Phyllobacteriaceae* роду

Mesorhizobium. И только у остролодочников обнаружены представители рода *Phyllobacterium* из семейства *Phyllobacteriaceae*. Также у всех растений, кроме чины низкой, из клубеньков были выделены штаммы, относящиеся к семейству *Boseaceae* (род *Bosea*). Представители же семейства *Bradyrhizobiaceae* были обнаружены только у чины низкой (род *Tardiphaga*) и остролодочников (род *Bradyrhizobium*). Кроме того, в ходе работы было выявлено, что в одном клубеньке могут присутствовать два ризобияльных штамма, относящихся к разным таксонам. Комбинации штаммов в парах были разнообразны: *Phyllobacterium* + *Bosea*; *Mesorhizobium* + *Bradyrhizobium*; *Rhizobium* + *Bosea*; *Rhizobium* + *Mesorhizobium*; *Mesorhizobium* + *Bosea*.

Отношения между растением и ризобиями не являются исключительными. В работах других авторов уже показана возможность колонизации одного и того же клубенька несколькими штаммами одного вида ризобий [99, 155, 160]. Была также показана возможность образования азотфиксирующих клубеньков при одновременной инокуляции растения-хозяина двумя мутантами одного штамма, которые по отдельности были не эффективны [141, 162].

В этой работе мы показали возможность образования клубеньков, которые содержат два штамма, относящиеся к разным таксономическим группам, и определили влияние каждого из них на формирование клубеньков и эффективность симбиоза. Для изучения феномена ризобияльной синергии (способность штаммов с разным таксономическим положением и комплементарными наборами симбиотических генов одновременно присутствовать в клубеньках и повышать эффективность симбиоза) были найдены и проанализированы симбиотические гены в парах микросимбионтов, выделенных из одного клубенька. А также были составлены пары штаммов, выделенных из разных клубеньков, но которые обладают комплементарными наборами генов. Проведенные вегетационные опыты с различными парами микросимбионтов показали, что штаммы, выделенные из реликтовых симбиотических систем, могут обладать широким спектром растений-

хозяев, а эффект от совместной инокуляции значительно варьирует в зависимости от вида растений.

Полученные результаты подтверждают предположение о том, что симбиотические системы реликтовых растений могут быть многокомпонентными и включать ризобиальные штаммы, принадлежащие к разным таксономическим группам, что создает предпосылки для эффективного обмена генетическим материалом между микросимбионтами, совместно обитающими в корневых клубеньках. Это помогает объяснить эволюцию ризобий путем рекрутирования в одном штамме широкого набора генов, которые являются обязательными или перспективными для симбиоза, но распределяются по различным бактериальным таксонам.

Таким образом, проведенная работа способствовала совершенствованию систематики клубеньковых бактерий и расширению представлений о симбиотических системах реликтовых бобовых растений, внесла свой вклад в изучение симбиотической функции микроорганизмов-партнеров и определение роли каждого из них в формировании микробно-растительного симбиоза.

Дальнейшие исследования, направленные на поиск и изучение ризобиальных микросимбионтов, имеющих комплементарные наборы симбиотических генов, будут способствовать раскрытию механизмов эффективной интеграции между партнерами и использованию феномена ризобиальной синергии для повышения эффективности биологических систем на основе бобовых растений и их микросимбионтов. Этот способ будет иметь явное преимущество перед применяемой в настоящее время смешанной инокуляцией бобовых растений ризобиями и ростстимулирующими ризосферными бактериями (PGPR), поскольку предполагает гораздо более тесное взаимодействие между симбиотическими партнерами на основе комплементации генов, имеющих непосредственное отношение к становлению эффективных симбиотических взаимоотношений с растением. Наиболее удачные комбинации геномов симбиотических ризобий, могут быть использованы в качестве основы для отбора и направленного

генетического конструирования штаммов, перспективных для сельскохозяйственной практики.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф. Возможности и перспективы применения методов массивного параллельного секвенирования в диагностике и эпидемиологическом надзоре за инфекционными заболеваниями (аналитический обзор) // МедиАль. - 2014. - № 2 (12) - С. 6-28. / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: http://www.medial-journal.ru/uploads/objects/rf_journal_article/1/110/pdf/алексеева (дата обращения 08.12.2020).
2. Алесина Н.В. Изучение смены бактериальных компонентов в ризосфере и ризоплане в процессе вегетации растения на примере овса (*Avena sativa*) // Вестн. Моск. гос. обл. ун-та. Сер. «Естественные науки». - 2010. - №1. - С. 5 - 9.
3. Баймиев Ан.Х., Птицын К.Г., Мулдашев А.А., Баймиев Ал. Х. Генетическая характеристика клубеньковых бактерий бобовых рода *Lathyrus*, произрастающих на территории республики Башкортостан // Экологическая генетика. - 2011. - Т. IX. - № 2 - С. 3 - 8.
4. Баймиев Е. Обзор. Современное состояние проблемы изучения симбиоза микроорганизмов с растениями / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://biohim2005.narod.ru/biotechnology/mikoriza.htm> (дата обращения 10.09.2019).
5. Баймиев Ан.Х., Гуменко Р.С., Матниязов Р.Т., Чубукова О.В., Баймиев Ал.Х. / Современная систематика клубеньковых бактерий // Биомика. - 2013. - Т.5 - №3(4). - С. 136 -157.
6. Баймиев Ан.Х, Иванова Е.С., Гуменко Р.С, Чубукова О.В., Баймиев Ал.Х. Анализ влияния ризосферных бактерий *Phyllobacterium sp.* штамма СА8 на урожайность бобовых культур. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. - 2013. - Т. 15. № 3 (5). - С.1559-1562.
7. Баймиев Ан.Х, Иванова Е.С., Птицын К.Г., Белимов А.А., Сафронова В.И., Баймиев Ал.Х. Генетическая характеристика клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых Южного Урала. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2012. - №1. - С.29-34. DOI:10.3103/S0891416812010028.
8. Баймиев А.Х., Владимирова А.А., Акимова Е.С., и др. Филогенетическая характеристика клубеньковых бактерий эндемичных для Южного Урала видов рода *Oxytropis (Fabaceae)* // Экологическая генетика. - 2020. - Т. 18, №2. - С. 157-167. DOI: 10.17816/ecogen17805.

9. Белимов А.А. Взаимодействие ассоциативных бактерий и растений в зависимости от биотических и абиотических факторов: дис. на соиск. науч. ст. д.б.н. - Санкт-Петербург, 2009. - 320с.
10. Верховина А.В. БайкалРу. Остролодочник Попова. / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://baikalru.ru/baikal/krasnaja-kniga-irkutskoi-oblasti/sosudistyje-rastenija/ostrolodochnik-popova.html> (дата обращения 20.12.2019).
11. Вишнякова М.А., Бурляева М.О. Потенциал хозяйственной ценности и перспективы использования российских видов чины (обзор) // Сельскохозяйственная биология. - 2006. - Т.41, №6. - С. 85-97.
12. Гайкова О.Ю., Попов В.В., Абаринова Н.Г., Берман М.И. и др. Красная книга Иркутской области. // Иркутск: ООО Изд. «Время странствий», 2010. - 480 с.
13. Глик Б.Р., Пастернак Д. Молекулярная биотехнология: принципы и применение: учебник. - М.: Мир, 2002.- 589 с.
14. Глянько А.К. Сигнальные системы ризобий (*Rhizobiaceae*) и бобовых растений (*Fabaceae*) при формировании бобово-ризобиального симбиоза (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. - 2015. - том 51, № 5. - С. 453–464.
15. Глянько А.К., Ищенко А.А., Филинова Н.В. Бобово-ризобиальный симбиоз: некоторые современные знания. // Вестник ХНАУ серия Биология. - 2017. - 3 (42), - С. 6-22 / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: http://www.knau.kharkov.ua/uploads/visn_biology/v7_3/1.pdf (дата обращения 10.08.2019).
16. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология: учебник для вузов, 5-е изд., перераб. и доп. - М.: Дрофа, 2005. - 445 с., ил.
17. Жук А.В. Формы и место мутуализма в системе симбиотических взаимоотношений высших растений с другими организмами // Вестник Санкт-Петербургского университета. - 2005. - Сер.3, Вып. 1. - С. 3-19.
18. Жуков В. А., Рычагова Т. С., Штарк О. Ю., Борисов А. Ю., Тихонович И. А. Генетический контроль специфичности взаимодействия бобовых растений с клубеньковыми бактериями // Экологическая генетика. - 2008. - VI, № 4. - С. 12 - 19.
19. Иванова Е. С., Баймиев Ан. Х., Ибрагимов Р. И., Баймиев Ал. Х. Симбиотические гены клубеньковых бактерий и влияние их горизонтального переноса на видовой состав микросимбионтов бобовых растений // Вестник Башкирского университета. - 2011. - Т. 16, №4. - С. 1210 -1213.
20. Идентификация микроорганизмов. Системы для идентификации и исследования свойств микробных культур Biolog. / [Электронный ресурс]. -

- Режим доступа: <http://www.ld.ru/microbiology/ilist-3958.html> (дата обращения 12.10.2019).
21. Информационно-аналитическая система «Особо охраняемые природные территории России». База биоразнообразия. *Hedysarum gmelinii* Ledeb. / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://oopt.aari.ru/bio/44968> (дата обращения 12.10.2020).
 22. Инфоурок. Реликтовые растения и эндемики Урала. / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://infourok.ru/reliktovie-rasteniya-i-endemiki-urala-476112.html> (дата обращения 17.09.2020).
 23. Ирkipedia. Флора байкальской природной территории. Высшие растения. / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: http://irkipedia.ru/content/flora_baykalskoy_prirodnoy_territorii_vysshie_rasteniya (дата обращения 06.06.2022).
 24. Коничев А.С. Молекулярная биология: учебник для студ. учреждений высш. проф. образования / А.С. Коничев, Г. А. Севастьянова. - 4-е изд., перераб. и доп. - М.: Издательский центр «Академия», 2012. - 400 с.
 25. Красилов В.А. Универсальная энциклопедия Кирилла и Мефодия. Реликтовые растения. / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://megabook.ru/article/Реликтовые%20растения> (дата обращения 17.09.2019).
 26. Кривенко Д. А. Эндемики прибайкалья *Astragalus olchonensis* Gontsch. и *Astragalus sericeocanus* Gontsch. (*Fabaceae*): эколого-биологические особенности ценопопуляций, вопросы филогении, охрана: дис. на соиск. науч. ст. к.б.н. - Иркутск, 2014. - 129с.
 27. Круглов Ю.В. Микробное сообщество почвы: физиологическое разнообразие и методы исследования // Сельскохозяйственная биология. - 2016. - Т. 51, № 1.- С. 46 - 59.
 28. Кузнецова И.Г., Сазанова А.Л., Сафронова В.И., Пинаев А.Г., Верхозина А.В. и др. Генетическое разнообразие микросимбионтов байкальских видов чины (*Lathyrus*), горошка (*Vicia*), остролодочника (*Oxytropis*) и астрагала (*Astragalus*). // Сельскохозяйственная биология. - 2015. - Т. 50. - № 3. - С. 345 - 352. DOI: 10.15389/agrobiology.2015.3.345rus.
 29. Кузнецова И. Г., Сафронова В. И., Белимов А.А., Сазанова А.Л., Чирак Е.Р. и др. Два ризобиальных ко-микросимбионта, выделенных из реликтового бобового *Oxytropis poroviana*, имеющих комплементарные наборы симбиотических генов и совместно повышающих эффективность нодуляции растений. // Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего. Материалы Международной научной конференции, Уфа, 13-17

- июня 2018 года. - Уфа: Электронное издание. Постоянный адрес размещения <http://plamic.ru/sbornik/>, 2018. - С. 173.
30. Курильщикова А.М., Тикунова Н.В., Кабилов М.Р. Методы и объекты метагеномных исследований. // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. - 2012. - Т.10, № 1. - С. 191 - 201.
 31. Кацы Е.И. Молекулярно-генетические процессы, влияющие на ассоциативное взаимодействие почвенных бактерий с растениями / Под ред. В.В. Игнатова. - Саратов: Изд-во Саратов. ун-та. - 2003. - 169 с.
 32. Князев М. С. Бобовые (*Fabaceae* Lindl.) Урала: видообразование, географическое распространение, историко-экологические свиты. Том 1: дис. на соиск. уч. ст. д.б.н. // Екатеринбург, 2014. - 463с.
 33. Копать В.В., Чирак Е.Р., Кимеклис А.К., Сафронова В. И., Белимов А.А. и др. Эволюция генов *FIXNOQP*, кодирующих цитохромоксидазу с высоким сродством к кислороду, у ризобий и родственных им бактерий. // Генетика. - 2017. - Т.53, №7. - С.795 - 804. DOI.org/10.7868/S0016675817070062.
 34. Красная книга Республики Бурятия, 2013. / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: http://minpriroda-rb.ru/redbook/2014/detalnoe-opisanie.php?ELEMENT_ID=44712 (дата обращения 20.09.2020).
 35. Куликов П.В. Конспект флоры Челябинской области (сосудистые растения). - Екатеринбург, 2005. - 543с.
 36. Лазыкин А.Г. Спецкурс «Частная микробиология. Систематика микроорганизмов». Сборник лекций / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://cyberpedia.su/9x1438a.html> (дата обращения 12.10.2019).
 37. Лесная энциклопедия: В 2-х т./ Гл.ред. Воробьев Г.И.; Ред.кол.: Анучин Н.А., Атрохин В.Г., Виноградов В.Н. и др. - М.: Сов. энциклопедия, 1985.-563 с., ил.
 38. Малая энциклопедия Забайкалья: Природное наследие / гл. ред. Р. Ф. Гениатулин. - Новосибирск: Наука, 2009. - 698 с.
 39. Малышев Л. И., Пешкова Г.А. Особенности и генезис флоры Сибири (Предбайкалье и Забайкалье). - Новосибирск: Наука, 1984. - 265 с.
 40. Матященко Г. В. Островные экосистемы оз. Байкал и их охрана // Байкал и естествознание за 100 лет. - Иркутск, 1993. - С. 166-173.
 41. Медведев С. С. Физиология растений: учебник. - СПб.: БХВ-Петербург, 2012. - 512 с.: ил.
 42. Мережковский К.С. Теория двух плазм как основа симбиогенеза, нового учения о происхождении // Уч. Записки Казан. Ун-та. - 1909. - Т. 76. - С.93.
 43. Мулдашев А.А., Галеева А.Х., Маслова Н.В., Елизарьева О.А. О природоохранном статусе копеечника Гмелина *Hedysarum gmelinii* Ledeb.

- (*Fabaceae*) в Республике Башкортостан. // Вестник Оренбургского государственного университета. - 2009. - 6. - С. 254 - 257.
44. Намзалов Б.Б. К вопросу о реликтах во флоре и растительности степных экосистем байкальской сибиря. // Растительный Мир Азиатской России. - 2012. - № 2(10). - С. 94 - 100.
 45. Намзалов Б.Б. Эндемизм и реликтовые явления во флоре и растительности степных экосистем Байкальской Сибири. // Биоразнообразия Байкальской Сибири / В.М. Корсунов, Н.М. Пронин, Г.Г. Гончиков и др. - Новосибирск, 1999. - С. 184 - 192.
 46. Намзалов Б. Ц. Б., Тайсаев Т.Т. Эндемизм биоты Байкальской природной территории: истоки, новейшие узлы и перспективы исследований // Вестник Бурятского научного центра Сибирского отделения Российской академии наук. - 2015. - № 1(17). - С. 164 - 174.
 47. Неретина О.В. Химический состав экстрактивных веществ копеечника щетинистого: *Hedysarum setigerum* Turcz. ex Fisch. Et Meyer: дис. на соиск. уч. ст. к.х.н. // Иркутск, 2004. - 157с.
 48. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов высших учебных заведений. - М.: Издательский центр «Академия», 2005. - 608 с.
 49. Особо охраняемые природные территории ЮГРБ. Чина приземистая *Lathyrus humilis* (Ser.) Spreng. Составители: А.Л. Васина, М.С. Князев. / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://ugraopt.admhmao.ru/redbook/74077/2537893/> (дата обращения 17.11.2020).
 50. Пешкова Г.А. Красная книга. Остролодочник трехлистный. / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://cicon.ru/oxytropis-triphylla.html> (дата обращения 20.12.2018).
 51. Природа Байкала. Авторский проект В. Петухина. / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://nature.baikal.ru/hiero.shtml?hiero=nature&pnt=Fabaceae#Fabaceae> (дата обращения 06.06.2022).
 52. Проворов Н.А. Растительно-микробные симбиозы как эволюционный континуум. // Журн. общ. биологии. - 2009. - Т. 70, № 1. - С. 10-34.
 53. Проворов Н.А., Воробьев Н.И., Андронов Е.Е. Макро- и микроэволюция бактерий в системах симбиоза. // Генетика. - 2008. - Т4, №1. - С.12 - 28.
 54. Проворов Н. А., Штарк О. Ю., Долгих Е. А. Эволюция азотфиксирующих симбиозов, основанная на миграции бактерий из микоризных грибов и почвы в ткани растений. // Общая биология. - 2016. - Т.77. - №5. - С.329 - 345
 55. Проворов Н. А. Адаптивная макроэволюция бобово-ризобиального симбиоза // Сельскохозяйственная биология. - 2015. - Т.50, №3. - С. 323 - 331.

56. Проворов Н. А. Антон де Бари (Anton de Bary). Явление симбиоза (die Erscheinung der symbiose). // С.-х. биол. - 2014. - №3. - С. 113-126.
57. Румянцева М. Л. Биологическое разнообразие клубеньковых бактерий в экосистемах и агроценозах. Теоретические основы и методы / под ред. Румянцевой М. Л., Симарова Б. В. // Российская акад. с.-х. наук, ГНУ Всероссийский научно-исслед. ин-т с.-х. микробиологии. Санкт-Петербург, 2011. - 104 с.
58. Сазанова А.Л., Кузнецова И.Г., Сафронова В.И., Белимов А.А., Попова Ж.П., Тихомирова Н.Ю., Оследкин Ю.С. Изучение генетического разнообразия микросимбионтов Копеечника щетинистого *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum*, произрастающего в Прибайкалье // Сельскохозяйственная биология. - 2017. - Т.52. № 5. - С.1004 - 1011. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.5.1004rus.
59. Санданов Д.В. Редкие бобовые (*Fabaceae* Lindl.) Бурятии: географическое распространение, эколого-ценотическая приуроченность, популяционное разнообразие и вопросы охраны // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология. - 2020. - 13(1). - С. 81-93. DOI: 10.17516/1997-1389-028.
60. Сафронова В.И., Чижевская Е.П., Белимов А.А., Павлова Е.А. Определение таксономического положения штаммов-микросимбионтов копеечника (*Hedysarum*) и астрагала (*Astragalus*) путем анализа генов рибосомальных РНК. // Сельскохозяйственная биология. - 2011. - 3. - С. 61 - 64.
61. Сидорова К.К., Шумный В.К., Власова Е.Ю., Гляненько М.Н., Мищенко Т.М. и др. Симбиогенетика и селекция макросимбионта на повышение азотфиксации на примере гороха (*Pisum sativum* L.) // Вестник ВОГиС. - 2010. - Том 14, № 2. - С.357 - 374.
62. Спайнк Г. *Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями. / Г. Спайнк, А. Кондороши, П. Хукас. - Санкт-Петербург. - 2002. - 568 с.
63. Стародумова И.П., Присяжная Н.В., Тарлачков С.В., Дорофеева Л.В., Василенко О.В., Евтушенко Л.И. Систематика *Rhizobium*: от традиционных подходов до анализа геномов // Первая Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». Сборник тезисов. Пущино. - 2014. - С. 7 - 11.
64. Старченко В. М., Дарман Г.Ф. Остролодочник дерновинный - *Oxytropis caespitosa* (Pall.) Pers. Красная книга Амурской области: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных, растений и грибов: Официальное издание. 2-е издание, исправленное, переработанное и дополненное. // Благовещенск: Дальневосточный государственный аграрный университет. - 2020. – С. 264.

65. Степанцова Н.В., Берлов О.Э., 2006 - 2015: Растения Прибайкалья. / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://baikalflora.narod.ru> (дата обращения 20.09.2020).
66. Тихонович И. А, Проворов Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агроэкологических систем будущего. - СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2009. - 210с.
67. Троян Т.Н. Формирование эффективного бобово-ризобияльного симбиоза и его роль в повышении продуктивности агроэкологических систем: дис. на соиск. уч. ст. к. б.н. // Москва, 2010. - 157с.
68. Турова Т.Н. Применение методов геносистематики для решения вопросов таксономии и изучения биоразнообразия прокариот: дис. в виде науч. докл. на соиск. уч. ст. д.б.н. - Москва, 2009. - 86с.
69. Тюлюкин С. Растения-эндемики Иркутской области. / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://pandia.ru/text/82/001/39875.php> (дата обращения 21.09.2020).
70. Холина, А.Б., Козыренко, М.М., Артюкова, Е.В., Санданов, Д.В. Современное состояние популяций эндемичных видов *Oxytropis* Байкальской Сибири и их филогенетические связи по данным секвенирования маркеров хлоропластной ДНК. // Генетика. - 2018. - Т.54, № 7. - С. 795-806. DOI:10.1134/S0016675818070056.
71. Хоулт Дж. Определитель бактерий Берджи: в 2 томах Т1. Пер. с англ. 9е издание. / Под.ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. - М.: Мир. - 1997.- 432с., ил.
72. Широких А.А., Мерзаева О.В., Широких И.Г. Методические подходы к изучению микроорганизмов прикорневой зоны растений (обзор). // Сельскохозяйственная биология. - 2007. - № 1. - С. 43 - 55.
73. Штарк О. Ю., Борисов А.Ю., Жуков В.А., Неманкин Т.А., Тихонович И.А. Многокомпонентный симбиоз бобовых с полезными почвенными микроорганизмами: генетическое и эволюционное обоснование использования в адаптивном растениеводстве // Экологическая генетика. - 2011. - Т. IX, - № 2. - С. 80-94.
74. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия: Учебно-справочное пособие. - Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. - 496 с.
75. Фаминцын А.С. О роли симбиоза в эволюции организмов // Записки Императорской АН. Сер. 8. - 1907. - Т. 20. - № 3. - С. 1 - 14.
76. Флора Байкало-ленского заповедника. Флористическое разнообразие особо охраняемой природной территории. / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://baikal-1.ru/specialists/baikal-lena/flora/> (дата обращения 12.12.2018).

77. Флора Сибири. Том 9. *Fabaceae (Leguminosae)* / Сост. В.А. Положий, С.Н. Выдрина, В.И. Курбатский, О.Д. Никифорова. В 14 томах. - Новосибирск: Сибирская издательская фирма ВО «Наука», 1994г. - 280с.
78. Электронная база данных Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ). / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.arriam.spb.ru>. Без даты.
79. Электронный каталог сосудистых растений Азиатской России, 27.11.2002. / [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www-sbras.nsc.ru/win/elbib/atlas/flora/271.html> (дата обращения 12.11.2020).
80. Яценко-Степанова Т.Н., Немцева Н.В., Игнатенко М.Е. Многообразие симбиозов и их роль в эволюции органического мира // Вестник ОГУ. - 2014. - №13 (174). - С.142 - 147.
81. Ahemad M., Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. // J. King Saud Univ.-Sci. - 2014. - 26. - pp. 1 - 20. DOI: 10.1016/j.jksus.2013.05.001.
82. Ambros E., Kotsupy O., Novikova T., Vysochina G. Клональное микроразмножение редкого вида *Astragalus sericeocanus* Gontsch. и содержание фенольных соединений в условиях *in vitro* // Turczaninowia, 2018. - Т. 21, № 4. С. 87-99. DOI: 10.14258/turczaninowia.21.4.10.
83. Andam C. P., Mondo S. J., Parker M. A. Monophyly of *nodA* and *nifH* genes across Texas and Costa Rican populations of *Cupriavidus* nodule symbionts. // Applied and Environmental Microbiology. - 2007. - 73(14). - pp. 4686 - 4690. DOI: 10.1128/AEM.00160-07.
84. Andam C. P., Parker, M. A. Novel Alphaproteobacterial root nodule symbiont associated with *Lupinus texensis*. // Applied and Environmental Microbiology. - 2007. - 73 (17). - pp. 5687-5691. DOI: 10.1128/AEM.01413-07.
85. Ampomah O. Y., Mousavi S. A., Lindstrom K., Huss-Danell K. Diverse *Mesorhizobium* bacteria nodulate native *Astragalus* and *Oxytropis* in arctic and subarctic areas in Eurasia. // Syst. Appl. Microbiol. - 2017. - 40. - P. - 51 - 58. DOI: 10.1016/j.syapm.2016.11.004.
86. Aoki S., Ito M., Iwasaki W. From β - to α -Proteobacteria: the origin and evolution of rhizobial nodulation genes *nodIJ*. // Mol Biol Evol. 2013. - 30(11). - P.2494–2508. DOI: 10.1093/molbev/mst153.
87. David R. Whole-Genome Analyses: Average Nucleotide Identity// Methods in Microbiology. - 2014. - V. 41. - pp. 103-122 (DOI: 10.1016/bs.mim.2014.07.002).
88. Ardley J.K., Parkerb M.A., De Meyer S.E. et al. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen

- with geographically and taxonomically separate legume hosts // *Int J Syst Evol Microbiol.* - 2012. - 62. - pp. 2579 - 2588.
89. Aryal S. Online Microbiology and Biology Notes. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) / [Электронный ресурс]. - URL: <https://microbenotes.com/author/sagararyalnepal/> \o "View all posts by Sagar Aryal" (дата обращения 22.12.2020).
 90. Aziz R.K., D. Bartels, A. A. Best, M. DeJongh, T. Disz, R. A. Edwards et. all. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology // *BMC Genomics.* - 2008. - 9(75). - P. 15. DOI.org/10.1186/1471-2164-9-75.
 91. Baev N., Schultze M., Barlier I., Ha D.C., Virelizier H., Kondorosi E., Kondorosi A. *Rhizobium nodM* and *nodN* genes are common *nod* genes: *nodM* encodes functions for efficiency of nod signal production and bacteroid maturation. // *J. Bacteriol.* - 1992. - 174. - pp. 7555 - 7565.
 92. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M. et other authors. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and ITS Applications to Single-Cell Sequencing. // *J. Comput. Biol.* 2012. - 19(5). - pp. 455 - 477.
 93. Barcellos F. G., Menna P., da Silva Batista J. S., Hungria M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. // *Applied and Environmental Microbiology.* - 2007. - 73(8). - pp. 2635-2643. DOI: 10.1128/AEM.01823-06.
 94. Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L. E. *Azospirillum*–plant relationships: Physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003) // *Canadian Journal of Microbiology.* - 2004. - 50(8). - pp. 521-577. DOI:10.1139/w04-035.
 95. Behrendt U., Schumann P., Hamada M., Suzuki K., Spröer C., et al. Reclassification of *Leifsonia ginsengi* (Qiu et al. 2007) as *Herbiconiux ginsengi* gen. nov., comb. nov. and description of *Herbiconiux solani* sp. nov., an actinobacterium associated with the phyllosphere of *Solanum tuberosum* L. // *Int. J Syst. Evol. Microbiol.* - 2011. - 61(5). - pp. 1039 - 1047. DOI: 10.1099/ij.s.0.021352-0.
 96. Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A., et al. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. // *Systematic and Applied Microbiology.* - 2004. - 27(4). - pp. 462 - 468. DOI: 10.1078/0723202041438527.
 97. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. // *Nat. Methods.* - 2010.- Vol. 7, - № 5. - pp. 335-336. DOI: 10.1038/nmeth.f.303.
 98. Cardoso J.D., Hungria M., Andrade D.S. Polyphasic approach for the

- characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2012. - 93. - pp. 2035-2049. DOI: 10.1007/s00253-011-3708-2.
99. Checcucci A., Azzarello E., Bazzicalupo M., Galardini M., Lagomarsino A., et al. Mixed nodule infection in *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* symbiosis suggest the presence of cheating behavior. // Frontiers in Plant Science. - 2016. - Vol. 7 (Art. 835). - 11p. DOI: 10.3389/fpls.2016.00835.
 100. Chen G. W.X., Li S., Qi Y. L., Wang E. T., Yuan H. L., Li J. L. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 1991. - 41. - pp. 275-280. DOI: 10.1099/00207713-41-2-275.
 101. Cheng, H.P., Walker G.C. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. // J. Bacteriol. - 1998. - 180. - pp. 5183 - 5191.
 102. Chirak E.R., Kimeklis A.K., Karasev E.S., KopatV.V., Safronova V.I. et al. Search for ancestral features in genomes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains isolated from the relict legume *Vavilovia formosa*. // Genes. - 2019. - 10(12), 990. - P. 20. URL: <https://DOI.org/10.3390/genes10120990>.
 103. Corretto E., Antonielli L., Sessitsch A., Compant S., Gorfer M. et al. *Agromyces aureus* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Salix caprea* L. grown in a heavy-metal-contaminated soil. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2016. - 66(9). - P. 3749-3754. DOI: 10.1099/ijsem.0.001260.
 104. Corvera A., Promé D., Promé J.-C., Martínez-Romero E., Romero D. The *nolL* gene from *Rhizobium etli* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor. // Mol. Plant Microbe Interact. - 1999. - Vol. 12, - N°3. - P. 236-246. DOI:10.1094/mpmi.1999.12.3.236.
 105. Dagan T., Martin W. Getting a better picture of microbial evolution en route to a network of genomes// Phil. Trans. R.Soc. B. - 2009. - V. 364. - P. 2187 - 2196.
 106. De Meyer S.E., Coorevits A., Willems A. *Tardiphaga robiniae* gen. nov., sp. nov., a new genus in the family *Bradyrhizobiaceae* isolated from *Robinia pseudoacacia* in Flanders (Belgium). // Systematic and Applied Microbiology. - 2012. - 35 (4) - pp. 205-214. DOI: 10.1016/j.syapm.2012.02.002.
 107. De Meyer S.E., Willems A. Multilocus sequence analysis of *Bosea* species and description of *Bosea lupini* sp. nov., *Bosea lathyri* sp. nov. and *Bosea robiniae* sp. nov., isolated from legumes. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2012, - 62. - pp. 2505-2510. DOI: 10.1099/ijs.0.035477-0.
 108. De Meyer S.E., Tan H.W., Andrews M., Heenan P.B., Willems A. *Mesorhizobium calcicola* sp. nov., *Mesorhizobium waitakense* sp. nov., *Mesorhizobium sophorae* sp. nov., *Mesorhizobium newzealandense* sp. nov. and *Mesorhizobium kowhii* sp.

- nov. isolated from *Sophora* root nodules. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2016. - 66. - pp. 786 - 795. DOI: 10.1099/ijsem.0.000796.
109. Delamuta J.R., Ribeiro R.A., Ormeño-Orrillo E., Melo I.S., Martínez-Romero E., Hungria M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2013. - 63(9). - pp. 3342 - 3351. (DOI: 10.1099/ijms.0.049130-0).
110. Delcher A.L., Kasif S., Fleischmann R.D. et al. Alignment of Whole Genomes. // Nucleic Acids Research. - 1999. - V. 27, - №11. - pp. 2369 - 2376. DOI: 10.1093/nar/27.11.2369.
111. Deloger M, E., Karoui M., Petit M.A. A genomic distance based on MUM indicates discontinuity between most bacterial species and genera. // J. Bacteriol. - 2009. - 191, - № 1. - pp. 91- 99. DOI:10.1128/JB.01202-08.
112. Dos Santos P.C., Fang Z., Mason S.W., Setubal J. C., Dixon R. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. // BMC Genomics. - 2012. - 13. - pp. 162. DOI: 10.1186/1471-2164-13-162.
113. Drouin P., Prevost D., Antoun H. Physiological adaptation to low temperatures of strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* associated with *Lathyrus* spp. // FEMS Microbiol. Ecol. - 2000. - 32. - pp. 111 - 120.
114. Drouin P., Prevost D., Antoun H. Classification of bacteria nodulating *Lathyrus japonicus* and *Lathyrus pratensis* in Northern Quebec as strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. // Int. J Syst. Bacteriol. - 1996. - 46 (4). - pp. 1016-1024. DOI:10.1099/00207713-46-4-1016.
115. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. // Nucleic Acids Res. - 2004. - Vol. 32, - № 5. - pp. 1792-1797. DOI:10.1093/nar/gkh340.
116. Edgren, T., Nordlund S. The *fixABCX* genes in *Rhodospirillum rubrum* encode a putative membrane complex participating in electron transfer to nitrogenase. // J. Bacteriol. - 2004. - 186(7). - pp. 2052 - 2060.
117. Evans D.J., Jones R., Woodley P.R., Wilborn J.R., Robson, R.L. Nucleotide sequence and genetic analysis of the *Azotobacter chroococcum* *nifUSVWZM* gene cluster, including a new gene (*nifP*) which encodes a serine acetyltransferase. // J. Bacteriol. - 1991. - 173(17). - pp. 5457 - 5469.
118. Ezzakkioui F., El Mourabit N., Chahboune R., Castellano-Hinojosa A., Bedmar E.J., Barrijal S. Phenotypic and genetic characterization of rhizobia isolated from *Hedysarum flexuosum* in Northwest region of Morocco. // Journal of Basic Microbiology. - 2015. - 55(7). - pp. 830-837. DOI: 10.1002/jobm.201400790.
119. Fischer H.-M. Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobia*. // Microbiol. - 1994. - Rev. 58. - pp. 352 - 386.

120. Flores-Félix J.D., Carro L., Velázquez E., Valverde Á., Cerda-Castillo E., et al. *Phyllobacterium endophyticum* sp. nov., isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris*. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2013. - 63. - pp. 821 - 826.
121. Fuli X., Wenlong Z., Xiao W., Jing Z., Baohai H. et al. A genome-wide prediction and identification of intergenic small RNAs by comparative analysis in *Mesorhizobium huakuii* 7653R. // Front. Microbiol. - 2017. - V. 8., A. 1730. - P. 15. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01730.
122. Gao J., Terefework Z., Chen W., Lindstrom K. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China. // Journal of Biotechnology. - 2001. - 91(2-3). - pp. 155 - 168.
123. Garg B., Dogra R.C., Sharma P.K. High-efficiency transformation of *Rhizobium leguminosarum* by electroporation. // Appl. Environ. Microbiol. - 1999. - 65. - pp. 2802 - 2804.
124. Gaunt M.W., Turner S.L., Rigottier-Gois L., Lloyd-Macgilp S.A., Young J.P. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2001-V. 51(Pt 6) - pp. 2037- 48. DOI: 10.1099/00207713-51-6-2037.
125. GenBank sequence database. The National Center for Biotechnology Information. / [Электронный ресурс]. - URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Без даты.
126. Giraud E., Moulin L., Vallenet D., Barbe V., Cytryn E. et al. Legumes symbioses: absence of *Nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. // Science. - 2007. - 316. - pp. 1307 - 1312. DOI: 10.1126/science.1139548.
127. Glaeser S.P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. // Syst. Appl. Microbiol. - 2015. - 38(4)/ - 237 - 245. DOI: 10.1016/j.syapm.2015.03.007.
128. Goris J., Konstantinidis K.T., Coenye T., Vandamme P., Tiedje J.M. DNA-DNA hybridization values and their relation to whole genome sequence // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2007. - V. 57. - pp. 81- 91. DOI:10.1099/ijs.0.64483-0.
129. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies // Bioinformatics - 2013. - V.29, - I.8. - pp. 1072 -1075. URL: <https://DOI.org/10.1093/bioinformatics/btt086>.
130. Gyllenberg M., Preteasa D., Yan P. Ecology and evolution of symbiosis in metapopulations // Journal of Biological Dynamics. - 2009. - Vol. 3. - № 1. - pp. 39- 57.
131. Han T. X., Han L. L., Wu L. J., Chen W. F., Sui X. H., et al. *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2008. - 58 (11). - pp. 2610-2618. DOI: 10.1099/ijs.0.2008/000125-0.

132. Hernandez J.A., George S.J., Rubio, L.M. Molybdenum trafficking for nitrogen fixation. // *Biochemistry*. - 2009. - 48(41). - P. 9711 - 9721. DOI: 10.1021/bi901217p.
133. Hoffmann M., Monday S.R., Allard M.W. et al. *Vibrio caribbeanicus* sp. nov., isolated from the marine sponge *Scleritoderma cyanea*. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* - 2012. - 62. - pp.1736 -1743. DOI: 10.1099/ijs.0.032375-0.
134. Hordt A., Lopez M.G., Meier-Kolthoff J.P., Schleuning M., Weinhold L.M. et al. Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of *Alphaproteobacteria*. // *Front. Microbiol.* - 2020. - V. 11. A. 468. - P. 112. DOI:10.3389/fmicb.2020.00468.
135. Hou B. C., Wang E. T., Li Y., Jia R. Z., Chen W. F. et al. Rhizobial resource associated with epidemic legumes in Tibet. // *Microb. Ecol.* - 2009. - 57(1). - pp. - 69-81. DOI: 10.1007/s00248-008-9397-4.
136. Jarvis B.D.W., Van Berkum P., Chen W.X., Nour S.M., Fernandez M.P. et al. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* -1997. - 47. - pp. 895 - 898. DOI: 10.1099/00207713-47-3-895.
137. Jiang H., Wong W. H. SeqMap: mapping massive amount of oligonucleotides to the genome. // *Bioinformatics*. - 2008. - Vol. 24, - № 20. - pp. 2395 - 2396. DOI:10.1093/bioinformatics/btn429.
138. Jiao Y.S., Yan H., Ji Z.J., Liu Y.H., Sui X.H. et al. *Phyllobacterium sophorae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of *Sophora flavescens*. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* - 2015. - 65. pp. 399 - 406. DOI: 10.1099/ijs.0.067017-0.
139. Kaneko T., Maita H., Hirakawa H., Uchiike N., Minamisawa K., Watanabe A., Sato S. Complete genome sequence of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA6T. // *Genes*. - 2011. - 2(4). - pp. 763 - 787.
140. Kang C.H., Jung Y.T., Yoon J.H. *Mucilaginibacter sabulilitoris* sp. nov., isolated from marine sand in a firth // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* - 2013 - 63 (Pt 8). - pp. 2865-2871. DOI:10.1099/ijs.0.045989-0.
141. Kapp D., Niehaus K., Quandt J., Muller P., Puhler A. Cooperative action of *Rhizobium meliloti* nodulation and infection mutants during the process of forming mixed infected *Alfalfa* nodules. // *The Plant Cell*. - 1990. - Vol. 2. - pp. 139-151.
142. Katoh K., Kuma K., Toh H., Miyata T. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. // *Nucleic Acids Res.* - 2005. - Vol. 33, - № 2. - pp. 511 - 518. DOI:10.1093/nar/gki198.
143. Kim M. K., Park M.J., Im W.T., Yang D.C. *Aeromicrobium ginsengisoli* sp. nov., isolated from a ginseng field. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* - 2008.- 58 (9). - pp. 2025-2030. DOI:10.1099/ijs.0.64871-0. PMID 18768598.

144. Kurtz S., Phillippy A., Delcher A.L. et al. Versatile and open software for comparing large genomes. // *Genome Biology*. - 2004. - V.5. - I.2. - Article R12. - P. 9. DOI:10.1186/gb-2004-5-2-r12.
145. Laguerre G., van Berkum P., Amarger N., Prevost D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1997. - 63(12). - pp. 4748 - 4758.
146. Lamrabet Y., Bellogín R.A., Cubo T., Espuny R., Gil A. et al. Mutation in GDP-fucose synthesis genes of *Sinorhizobium fredii* alters *Nod* factors and significantly decreases competitiveness to nodulate soybeans. // *Mol. Plant Microbe Interact.* - 1999. - 12(3). - pp. 207-217.
147. Lei X., Wang E.T., Chen W.F., Sui X.H., Chen W.X. Diverse bacteria isolated from root nodules of wild *Vicia* species grown in temperate region of China. // *Microbiology*. - 2008. - 190(6). - P. 657 - 671. DOI: 10.1007/s00203-008-0418-y.
148. Li R., Li Y., Kristiansen K. et al. SOAP: short oligonucleotide alignment program. // *Bioinformatics*. - 2008. - Vol. 24, № 5. - pp. 713 - 714. DOI: 10.1093/bioinformatics/btn025.
149. Liu C. N., Toriello N.M., Mathies R.A. Multichannel PCR-CE microdevice for genetic analysis // *Anal. Chem.* - 2006. - Vol. 78. - pp. 5474 - 5479.
150. Löffler F.E, Yan J., Ritalahti K.M. et al. *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligate organohalide-respiring anaerobic bacteria, relevant to halogen cycling and ioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidetes* classis nov., within the phylum *Chloroflexi*. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* - 2013. – 63, Pt2. - pp. 625 - 635. DOI:10.1099/ij.s.0.034926-0.
151. Lohrke S.M., Day B., Kolli V.S., Hancock R., Yuen J.P. et al. The *Bradyrhizobium japonicum noeD* gene: a negatively acting, genotype-specific nodulation gene for soybean. // *Mol. Plant Microbe Interact.* -1998. - 11(6). - pp. 476 - 488. DOI:10.1094/MPMI.1998.11.6.476.
152. Lopez-Lara I.M., Geiger O. The nodulation protein *NodG* shows the enzymatic activity of an 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase. // *Mol. Plant. Microb. Interact.* - 2001. - 14(3). - pp.349 - 357. DOI:10.1094/MPMI.2001.14.3.349.
153. Lopez-Lara I.M., Kafetzopoulos D., Spaink H.P., Thomas-Oates J.E. Rhizobial *NodL* O-acetyl transferase and *NodS* N-methyl transferase functionally interfere in production of modified *Nod* Factors. // *J. Bacteriol.* - 2001. - 183. - pp. 3408 -3416.
154. Mantelin S., Saux M.F., Zakhia F., Béna G., Bonneau S., et al. Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp.

- nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2006. - 56, Pt.4. - pp. 827-839. DOI:10.1099/ijs.0.63911-0.
155. Martensson A. M., Brutti L., Ljunggren H. Competition between strains of *Bradyrhizobium japonicum* for nodulation of soybeans at different nitrogen fertilizer levels. // Plant and Soil. - 1989. - Vol.117. - pp. 219-225.
156. Martin W. *Archaeobacteria (Archaea)* and the origin of the eukaryotic nucleus. // Current Opinion in Microbiology. - 2005. - №8. - pp. 630 - 637.
157. Martinez-Hidalgo P., Ramirez-Bahena M. H., Flores-Felix J. D., Igual J. M., Sanjuan, J., et al. ' Reclassification of strains MAFF 303099T and R7A into *Mesorhizobium japonicum* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2016. - 669(12). - pp. 4936-4941. DOI: 10.1099/ijsem.0.001448.
158. Mikalsen J., Olsen A.B., Tengs T., Colquhoun D.J. *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* subsp. nov., isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2007. - 57. - pp. 1960-1965. URL: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64765-0>.
159. Mergaert P., van Montagu M., Holsters M. The nodulation gene *nolK* of *Azorhizobium caulinodans* is involved in the formation of GDP-fucose from GDP-mannose. // FEBS Lett. - 1997. - 409. - pp. 312 - 316.
160. Moawad M., Schmidt E.L. Occurrence and nature of mixed infections in nodules of field-grown soybeans (*Glycine max*). // Biology and Fertility of Soils. - 1987. - Vol. 5. - pp. 112-114.
161. Mornico D., Miché L., Béna G., Nouwen N., Verméglio A. et al. Comparative genomics of aeschynomene symbionts: insights into the ecological lifestyle of nod-independent photosynthetic *Bradyrhizobia*. // Genes. - 2012. - 3(1). - pp. 35 - 61. DOI: 10.3390/genes3010035.
162. Muller P., Hynes M., Kapp D., Niehaus K., Puhler A. Two classes of *Rhizobium meliloti* infection mutants differ in exopolysaccharide production and in coinoculation properties with nodulation mutants. // Molecular Genetics and Genomics. - 1988. - Vol. 211. Iss. 1. - pp. 11-26. DOI:10.1007/bf00338388
163. Naimuddin M., Nishigaki K. Genome analysis technologies: Towards species identification by genotype // Briefings in functional genomics and proteomic. - 2003. - V.1, № 4. - pp. 356-371.
164. Novikova N., Safronova V. Transconjugants of *Agrobacterium radiobacter* harbouring sym genes of *Rhizobium galegae* can form an effective symbiosis with *Medicago sativa*. // FEMS Microbiology Letters. - 1992. - 93. - pp. 261-268. DOI: 10.1016/0378-1097(92)90472-Z.
165. Okon Y., Labandera-González C. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years of worldwide field inoculation. // Soil Biol. Biochem. - 1994. - V. 26, I.12. - pp.1591-1601. URL: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90311-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90311-5).

166. Okubo T., Fukushima S., Itakura M., Oshima K., Longtonglang A. et al. Genome analysis suggests that the soil oligotrophic bacterium *Agromonas oligotrophica* (*Bradyrhizobium oligotrophicum*) is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. // Appl. Environ. Microbiol. - 2013. - 79. - pp. 2542-2551. DOI: 10.1128/aem.00009-13.
167. Perret X., Staehelin C., Broughton W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. // Microbiol. Mol. Biol. -2000. - Rev. 64 (1). - pp. 180-201.
168. Preparation of Genomic DNA from Bacteria CTAB. / Current protocols in molecular biology edited by Frederick M. Ausubel et al. - 2000. - Chapter 2. DOI: 10.1002/0471142727.mb0203s27.
169. Pulido-Suárez L., Flores-Félix J.D., Socas-Pérez N., Igual J.M., Velázquez E. et al. Endophytic *Bosea spartocytisi* sp. nov. Coexists with rhizobia in root nodules of *Spartocytisus supranubius* growing in soils of Teide National Park (Canary Islands). // Syst. Appl. Microbiol. - 2022. - Nov; V.45, Is.6:126374. - 8p. DOI: 10.1016/j.syapm.2022.126374.
170. Qiu F., Huang Y., Sun L., Zhang X., Liu Z., Song W. *Leifsonia ginsengi* sp. nov., isolated from ginseng root. // Int. J Syst. Evol. Microbiol. - 2007. - 57(2). - pp. 405-408. DOI: 10.1099/ijs.0.64487-0.
171. Richter M., Rossello-Mora R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2009. - V. 106. - pp. 19126 - 9131. DOI: 10.1073/pnas.0906412106.
172. Ritalahti K.M., Justicia-Leon S.D., Cusick K.D. *Sphaerochaeta globosa* gen. nov., sp. nov. and *Sphaerochaeta pleomorpha* sp. nov., free-living, spherical spirochaetes. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2012. - 62. - pp. 210 - 216. DOI: 10.1099/ijs.0.023986-0.
173. Roche P. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipooligosaccharide signals. / Roche P., Debelle F., Maillet F., Lerouge P., Faucher C., Truchet G., Denarie J., Prome J.C. // Cell. -1991. - 67. - pp. 1131 - 1143.
174. Safronova V.I., Belimov A.A., Sazanova A.L., Kuznetsova I.G., Popova J.P., Andronov E.E. Does the Miocene-Pliocene relict legume *Oxytropis triphylla* form nitrogen-fixing nodules with a combination of bacterial strains? // International Journal of Environmental Studies. - 2017. - Vol. 74, №5. - pp. 706 - 714. <https://doi.org/10.1080/00207233.2017.1283947>.
175. Safronova V.I., Sazanova A.L., Kuznetsova I.G., Belimov A.A., Andronov E.E., Chirak E.R., Popova J.P., Verkhozina A.V., Willems A., Tikhonovich I.A. *Phyllobacterium zundukense* sp. nov., a novel species of rhizobia isolated from root nodules of the legume species *Oxytropis triphylla* (Pall.) Pers. // Int. J. Syst. Evol.

- Microbiol. - 2018. - May; Vol. 68, Is. 5. - pp. 1644 - 1651. DOI: 10.1099/ijsem.0.002722.
176. Safronova V.I., Belimov A.A., Sazanova A.L., Chirak E.R., Verkhozina A.V., Kuznetsova I.G., Andronov E.E., Puhalsky J.V., Tikhonovich I.A. Taxonomically different co-microsymbionts of a relict legume, *Oxytropis popoviana*, have complementary sets of symbiotic genes and together increase the efficiency of plant nodulation. // Mol. Plant. Microbe. Interact. - 2018. - Aug; Vol. 31, №8. - pp. 833 - 841. DOI: 10.1094/MPMI-01-18-0011-R.
177. Safronova V., Belimov A., Andronov E., Popova J., Tikhomirova N. et al. Method for obtaining root nodules of the Baikal relict legumes in laboratory pot experiments. // International Journal of Environmental Studies. - 2017. - 74, I.5. - pp. 700 - 705. URL: <https://DOI.org/10.1080/00207233.2017.1283948>.
178. Safronova V.I., Kimeklis A.K., Chizhevskaya E.P., Belimov A.A., Andronov E. E. и др. Genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the relic species *Vavilovia formosa* (Stev.) // Fed. Antonie Van Leeuwenhoek. - 2014. - 105. - pp. 389-399. DOI:10.1007/s10482-013-0089-9.
179. Safronova V.I., Kuznetsova I. G., Sazanova A. L., Kimeklis A. K., Belimov A. A. et al. Extra slow-growing *Tardiphaga* strains isolated from nodules of *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. // Arch. Microbiol. - 2015. - 197(7). - pp. 889-898. DOI:10.1007/s00203-015-1122-3.
180. Safronova V.I., Kuznetsova I. G., Sazanova A. L., Kimeklis A. K., Belimov A. A. et al. *Bosea vaviloviae* sp. nov. a new species of slow-growing rhizobia isolated from nodules of the relict species *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. // Antonie Van Leeuwenhoek. - 2015. - 107(4). - pp. 911-920. DOI:10.1007/s10482-015-0383-9.
181. Safronova V., Tikhonovich I. Automated cryobank of microorganisms: Unique possibilities for long-term authorized depositing of commercial microbial strains. // Microbes in applied research. Current Advances and Challenges. Edited by a Mendez-Vilas. - 2012. - pp.331-334. DOI.org/10.1142/9789814405041_0066.
182. Safronova V.I., Guro P.V., Sazanova A.L., Kuznetsova I.G., Belimov A.A., et al. Rhizobial microsymbionts of Kamchatka *Oxytropis* species possess genes of the Type III and VI secretion systems, which can affect the development of symbiosis. // Mol Plant Microbe Interact. - 2020. - Oct; 33(10) - pp. 1232-1241. DOI: 10.1094/MPMI-05-20-0114-R.
183. Safronova V., Belimov A., Sazanova A., Chirak E., Kuznetsova I. et al. Two broad host range rhizobial strains isolated from relict legumes have various complementary effects on symbiotic parameters of co-inoculated plants. // Front. Microbiol. - 2019. - V. 10. - № MAR. - P. 00514. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00514>.

184. Salmela L., Schröder J. Correcting errors in short reads by multiple alignment. // *Bioinformatics*. - 2011. - Vol. 27, №11. - pp. 1455 - 1461. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr170.
185. Sánchez M., Ramírez-Bahena M.H., Peix A., Lorite M.J., Sanjuán J. et al. *Phyllobacterium loti* sp. nov. isolated from nodules of *Lotus corniculatus*. // *Int J Syst Evol Microbiol*. - 2014. - 64. - pp. 781 - 786. DOI: 10.1099/ijss.0.052993-0.
186. Sazanova A.L., Safronova V.I., Kuznetsova I.G., Karlov D.S., Belimov A.A., et al. *Bosea caraganae* nov. a new species of slow-growing bacteria isolated from root nodules of the relict species *Caragana jubata* (Pall.) Poir. originating from Mongolia. // *Int J Syst Evol Microbiol*. - 2019. - 69(9). - pp. 2687-2695. DOI: 10.1099/ijsem.0.003509.
187. Sentausa E., Fournier P.E. Advantages and limitations of genomics in prokaryotic taxonomy. // *Clin. Microbiol. Infect.* - 2013. - 19(9). - pp. 790-795. DOI: 10.1111/1469-0691.12181.
188. Snoeck C., Verreth C., Hernandez-Lucas I., Martínez-Romero E., Vanderleyden, J. Identification of a third sulfate activation system in *Sinorhizobium* sp. strain BR816: the *CysDN* sulfate activation complex. // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2003. - 69(4). - P.2006 - 2014. DOI: 10.1128/AEM.69.4.2006-2014.2003.
189. Squartini A., Struffi P., Doring H., Selenska-Pobell S., Tola E. et al. *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly *Rhizobium hedysari*), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* - 2002. - 52. - pp. 1267 - 1276. DOI: 10.1099/00207713-52-4-1267.
190. Sui X., Han L., Wang E., Jiang .F, Liu Y., Chen W. Novel associations between rhizobial populations and legume species within the genera *Lathyrus* and *Oxytropis* grown in the temperate region of China. // *Sci. China C. Life. Sci.* - 2009. - 52(2). - pp.182-92. DOI: 10.1007/s11427-008-0132-7.
191. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, evolutionary distance, and Maximum Parsimony methods. // *Molecular Biology and Evolution* - 2011 – Vol.28, Is. 10. - pp. 2731 - 2739. DOI: 10.1093/molbev/msr121.
192. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P. et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. // *Nucleic Acids Res.* - 2016. - 44(14). - pp. 6614 - 6624. DOI: 10.1093/nar/gkw569.
193. Teeling H., Meyerdierks A., Bauer M., Amann R., Glöckner F.O. Application of tetranucleotide frequencies for the assignment of genomic fragments. // *Environ. Microbiol.* - 2004. - 6(9). - pp. 938 - 947. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00624.x>.

194. Turuta O., Ryabtsev V., Novitskaya N., Vakarenko L. Protected microhabitats as a part of Baikal Regional Ecological Network. // Plant microreserves the site-based plant conservation and monitoring network, 2015. - [Электронный ресурс]. - Режим доступа: URL: <http://cretaplant.biol.uoa.gr/docs/Turuta2001.pdf> (дата обращения 22.09.2018).
195. Urwin R., Maiden M. C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology // Trends Microbiol. - 2003. - Vol. 11, № 10. - pp. 479-487. DOI: 10.1016/j.tim.2003.08.006.
196. Valverde A., Velázquez E., Fernández-Santos F., Vizcaíno N., Rivas R. et al. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 2005. – Vol. 55, Is.5 - pp. 1985 - 1989. DOI: 10.1099/ijs.0.63551-0.
197. Van Cauwenberghe J., Verstraete B., Lemaire B., Lievens B., Michiels J., Honnay O. Population structure of root nodulating *Rhizobium leguminosarum* in *Vicia cracca* populations at local to regional geographic scales. // Syst. Appl. Microbiol. - 2014. - 37(8). - pp.613 - 621. DOI: 10.1016/j.syapm.2014.08.002.
198. Vanlaere E., Baldwin A., Gevers D. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2009. – Vol. 59, Is.1. - pp. 102 - 111. DOI: 10.1099/ijs.0.001123-0.
199. Vincent J.M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. // IBP Handbook (Oxford and Edinburgh: Blackwell Scientific Publications). - 1970. - pp. 73 - 97.
200. Vos P., Hogers R., Bleeker M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. // Nucleic Acids Research. - 1995. - 23 (21). - pp. 4407 - 4414. DOI:10.1093/nar/23.21.4407.
201. Wais R.J., Keating D.H., Long S.R. Structure-function analysis of Nod factor-induced root hair calcium spiking in *Rhizobium*-legume symbiosis. // Plant Physiol. - 2002. - 129(1). - pp. 211 - 224. DOI:10.1104/pp.010690.
202. Wdowiak S., Malek W. Numerical analysis of *Astragalus cicer* microsymbionts. // Curr. Microbiol. - 2000. - 41. - pp. 142 - 148. DOI: 10.1007/s002840010108.
203. Wei G.H., Zhang Z.X., Chen C., Chen W.M., Ju W.T. Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the legume genera *Astragalus*, *Lespedeza* and *Hedysarum* in northwestern China. // Microbiological Research. - 2008. - 163(6). - pp. 651 - 662. DOI: 10.1016/j.micres.2006.09.005.
204. Xu L., Zhang Y., Wang L., Chen W., Wei G. Diversity of endophytic bacteria associated with nodules of two indigenous legumes at different altitudes of the Qilian Mountains in China. // Systematic and Applied Microbiology. - 2014. - 37(6). - pp.

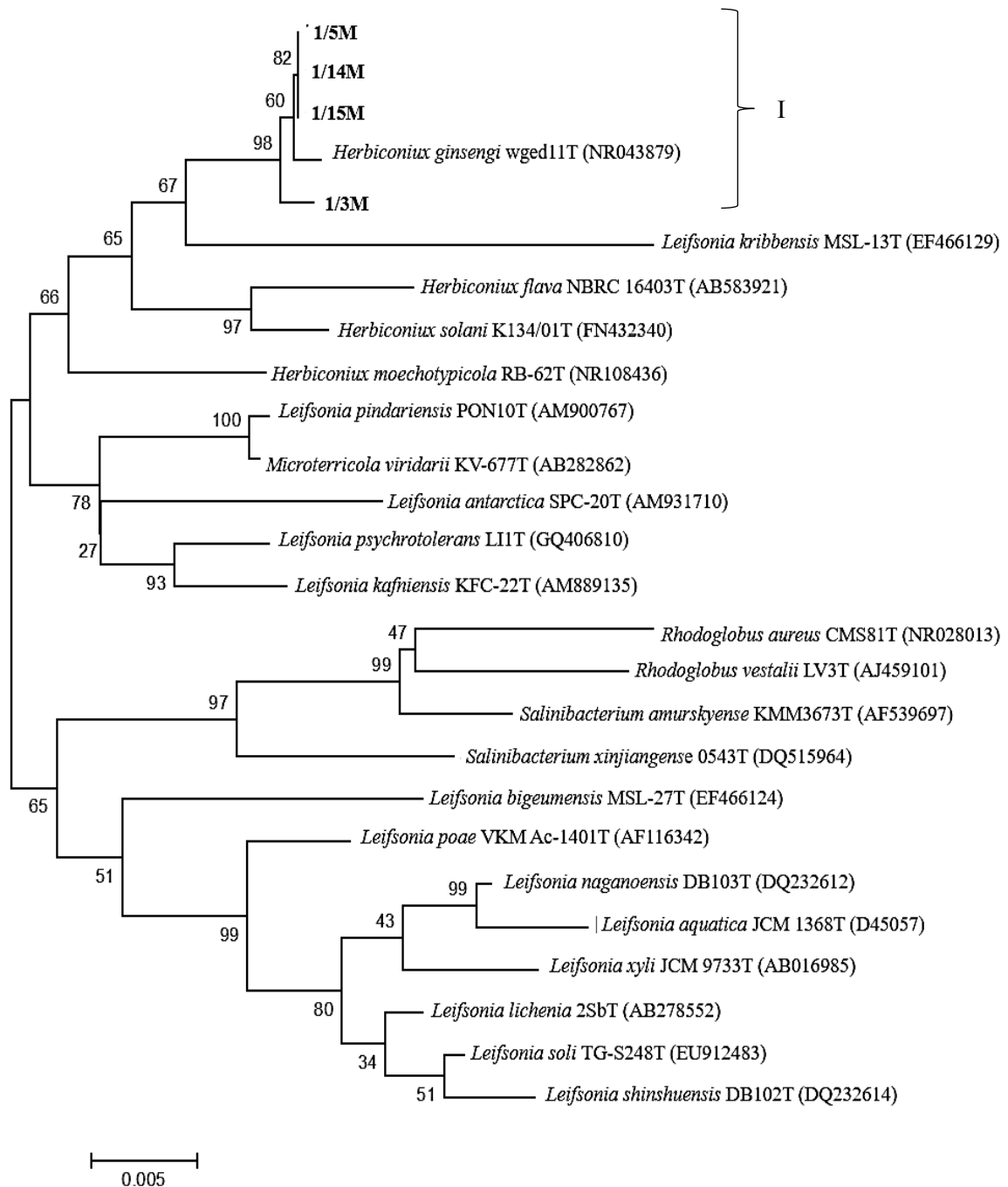
- 457- 465. DOI: 10.1016/j.syapm.2014.05.009.
205. Yoon S.H., Ha S.M., Kwon S., Chun J.A. Large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. // *Antonie Van Leeuwenhoek*. - 2017. - 110(10). - pp. 1281-1286. DOI: 10.1007/s10482-017-0844-4.
206. Zhang R.J, Hou B.C., Wang E.T., Li Y. Jr.et al. *Rhizobium tubonense* sp. nov., isolated from root nodules of *Oxytropis glabra*. // *Int. J Syst. Evol. Microbiol.* - 2011. - 61(3). - pp. 512-517. DOI: 10.1099/ijs.0.020156-0.
207. Zhao L., Deng Z., Yang W., Cao Y., Wang E., Wei G. Diverse rhizobia associated with *Sophora alopecuroides* grown in different regions of Loess Plateau in China. // *Systematic and Applied Microbiology*. - 2010. - 33(8). - pp. 468-477. DOI: 10.1016/j.syapm.2010.08.004.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1 (Справочная информация)

Приложение 1. Таблица 1. Праймеры и условия ПЦР, используемые при идентификации штаммов, относящихся к роду *Phyllobacterium*.

Локус	Праймер	Последовательность (5'-3')	Длина фрагмента	Условия ПЦР	Рекомендация
ITS	FGPS149 0-72	TGCGGCTGGATCCCCTCCTT	1280	3 min. 30 sec.95°C, 35x (1 min. 10 sec.94°C, 1 min. 50°C, 2 min. 72°C) 7 min. 72°C	Normand et al. 1996
	FGPL132' -38	CGGGTTTCCCCATTCGG			
<i>atpD</i>	atpD-273F	CTGGGSCGYATCMTGAACGT	498	3 min 30 sec.95°C, 35x (40 sec.94°C, 40 sec.50°C, 1 min. 30 sec.72°C) 5 min 10 sec. 72°C	Weir et al., 2004
	atpD-771R	GCCGACACTTCCGAACCNGCCTG			
<i>glnII</i>	GSII-1	ACGCAGATCAAGGAATTCG	617	3 min 30 sec.95°C, 35x (40 sec.94°C, 40 sec.55°C, 1 min. 30 sec.72°C) 5 min. 72°C	Weir et al., 2004
	GSII-2	TGCCCGAGCCGTTCCAGTC			
	GSII-3	GRTYTTTCGGCAAGGGYTC	438	3 min 30 sec.95°C, 35x (40 sec.94°C, 40 sec.49°C, 1 min. 30 sec.72°C) 5 min. 72°C	Weir et al., 2004
	GSII-4	CGAACGATCTGGTAGGGGT			
<i>recA</i>	recA-6F	CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGG TGGA	549	3 min 30 sec.95°C, 35x (40 sec.94°C, 40 sec.50°C, 1 min. 30 sec.72°C) 5 min. 72°C	Weir et al., 2004
	recA-555R	CGRATCTGGTTGATGAAGATCAC CAT			

Приложение 1. Рисунок 1. *Rrs*-филограмма, отражающая таксономическое положение исследуемых изолятов рода *Herbiconiux*, выделенных из клубеньков чины низкой. Литерой «Т» отмечены типовые штаммы. Номера изолятов выделены жирным шрифтом. I - статистически-достоверно отличающийся кластер. Масштаб соответствует 0.005 заменам на 100 п.н. (эволюционным расстояниям). Цифрами указана статистическая значимость кластеризации (в %), определенная с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных деревьев.



Приложение 1. Таблица 2. Сходство (%) генов *rrs* у быстрорастущих изолятов, выделенных из клубеньков копеечника щетинистого в Прибайкальском регионе, и у типовых штаммов родов *Phyllobacterium* и *Rhizobium*. Обозначения. Типовые штаммы: 1 - *P. myrsinacearum* STM 948T, 2 - *P. trifolii* ПЕТР02Т, 3 - *P. ifriqiyense* STM 370T, 4 - *P. catacumbae* CSC19T, 5 - *P. endophyticum* PEPV15T, 6 - *P. brassicacearum* STM 196T, 7 - *P. loti* S658T, 8 - *Rhizobium giardinii* NBRC 107135T, 9 - *Rhizobium alarii* GBV016T.

Тип овые шта ммы	Изоляты										
	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Phyllobacterium loti</i>			<i>Phyllobacterium endophyticum</i>		<i>Phyllobacterium</i> sp.				
	Hse-26	Hse-9	Hse-19	Hse-30	Hse-10	Hse-24	Hse-13	Hse-14	Hse-17	Hse-20	Hse-29
1	95.7	98.3	98.3	98.2	97.4	97.1	99.9	96.9	98.6	98.3	98.7
2	94.5	99.6	99.6	99.5	97.9	97.7	99.6	97.4	98.9	99.7	98.9
3	94.9	99.1	99.1	99.0	97.1	96.8	99.9	96.6	98.1	99.2	98.1
4	94.6	98.6	98.6	98.6	96.6	97.1	99.2	96.1	97.7	98.6	97.7
5	94.3	98.6	98.1	98.6	99.9	99.6	99.4	99.3	98.8	98.6	98.9
6	95.1	98.5	98.6	98.4	98.5	98.2	99.6	98.0	99.3	98.6	99.3
7	95.1	99.8	99.8	99.8	98.5	98.3	99.6	98.0	99.0	99.8	99.1
8	98.9	94.4	94.4	94.3	93.5	93.3	95.0	93.1	94.8	94.4	94.8
9	96.4	93.5	93.5	93.5	92.5	92.3	93.4	92.2	93.8	93.6	93.8

Приложение 1. Таблица 3. Сходство (%) генов *rrs* у медленнорастущих изолятов, выделенных из клубеньков копеечника щетинистого в Прибайкальском регионе, и ближайших типовых штаммов рода *Bosea*.

Типовые штаммы	Изоляты <i>Bosea</i> sp.		
	Hse-21	Hse-22	Hse-32
<i>Bosea vaviloviae</i> Vaf-18T	98.5	98.0	98.5
<i>Bosea massiliensis</i> 63287T	98.4	97.5	98.4
<i>Bosea eneaе</i> 34614T	98.6	97.7	98.6
<i>Bosea vestrisii</i> 34635T	98.6	97.7	98.6

Приложение 1. Таблица 4. Состав жирных кислот штаммов рода *Phyllobacterium*, выделенных из клубеньков остролодочника трехлисточкового и типовых штаммов близкородственных видов. Все значения даны в процентах от общего состава. Штаммы: 1 - Tri-36; 2 - Tri-38; 3 - Tri-48T; 4 -Tri-53; 5 - *P. endophyticum* LMG 26470T; 6 - *P. brassicacearum* LMG 22836T; 7 - *P. sophorae* LMG 27899T.

Жирная кислота	Изоляты из остролодочника трехлисточкового				Референтные штаммы		
	1	2	3	4	5	6	7
11- метил-18:1 ω7c	5.4	1.6	5.5	8.2	1.8	2.2	3.5
12:00	9.7	13.1	9.7	14.9	12.8	12.6	11.3
15:0 ANTEISO	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0
16:00	9.4	6.8	7.2	9.5	4.7	8.6	7.9
16:0 3OH	3.8	2.0	2.5	3.4	0.0	3.5	2.7
16:0 ANTEISO	0.0	0.0	1.1	0.0	1.3	0.0	0.0
17:0 ANTEISO	6.0	3.3	8.7	2.4	9.9	0.0	0.0
18:00	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9
18:1 2OH	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
18:1 ω7c	20.5	46.4	18.6	23.2	23.0	44.0	53.1
19:0 cyclo ω8c	6.6	0.0	3.6	7.8	0.0	0.0	0.0
20:00	14.4	9.3	8.7	15.7	3.3	20.5	13.4
Summed Feature 2 ^a	4.2	5.3	3.5	6.2	1.7	6.1	4.6
Summed Feature 3 ^b	2.0	2.1	1.3	2.0	0.0	2.4	2.6
Summed Feature 5 ^c	2.7	1.3	3.8	1.2	5.0	0.0	0.0
unidentified 16.582 ^d	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	0.0	0.0
unidentified 18.814 ^e	14.4	8.9	22.6	5.6	28.1	0.0	0.0

a- Summed Feature 2 состоит из жирных кислот 14: 0 3OH и / или 16: 1 ISO I и / или неизвестной жирной кислоты с эквивалентной длиной цепи 10,928, которые не могут быть разделены.

b- Summed Feature 3 состоит из жирных кислот 16: 1 ω7c и / или 15: 0 ISO 2OH, которые не могут быть разделены.

c- Summed Feature 5 состоит из жирных кислот 18: 2 ω6,9c и / или 18: 0 ANTE, которые не могут быть разделены.

d- Unknown 16.582 представляет собой жирную кислоту эквивалентную длине цепи 16,582, которая не может быть идентифицирована.

e- Unknown 18.814 представляет собой жирную кислоту эквивалентную длине цепи 18.814, которая не может быть идентифицирована.

Приложение 1. Таблица 5. Фенотипические свойства штаммов рода *Phyllobacterium*, выделенных из клубеньков остролодочника трехлисточкового и типовых штаммов близкородственных видов. Штаммы: 1 - Tri-36; 2 - Tri-38; 3 - Tri-48T; 4 - Tri-53; 5 - *P. sophorae* LMG 27899T; 6 - *P. brassicacearum* LMG 22836T; 7 - *P. endophyticum* LM26470T. Примечание: - отрицательная реакция; +, положительная реакция; ±, неопределенная реакция.

Свойство	Изоляты из <i>O. triphylla</i>				Референтные типовые штаммы		
	1	2	3	4	5	6	7
Источник выделения	Корневые клубеньки				Корневые клубеньки	Ризоплана	Корневые клубеньки
Редукция нитратов	-	-	-	-	+	+	-
Уреазная активность	+	+	+	+	+	+	-
Рост при:							
pH 6	-	-	-	-	+	±	+
pH 5	-	-	-	-	-	-	+
1% NaCl	+	+	-	-	-	-	+
Утилизация соединений:							
Декстрин	-	-	-	-	±	-	-
D-мальтоза	+	+	+	+	+	+	-
D-трегалоза	+	+	+	+	+	+	-
Сахароза	+	+	+	+	+	+	-
D-гураноза	+	+	+	+	+	+	-
D-раффиноза	-	-	-	-	±	-	-
D-мелибиоза	-	-	-	-	+	-	+
β-метил-D-глюкозид	-	-	-	-	-	±	±
N-ацетил-β-D-маннозамин	+	+	+	+	-	-	+
N-ацетил-D-галактозамин	-	-	-	-	±	+	-
N-ацетилнейрамин овая к-та	+	+	+	+	-	-	+
α-D-глюкоза	+	+	+	+	+	+	-
1% лактат натрия	-	-	-	-	-	+	+
D-фруктоза-6-PO ₄	+	+	+	+	+	±	±
Глицил-L-пролин	±	±	±	±	+	+	-
L-аланин	-	-	-	-	+	+	+
L-аргинин	+	±	+	±	-	-	-
L-гистидин	-	±	-	-	+	+	+
L-серин	-	-	-	-	-	±	+
Пектин	+	±	+	-	±	±	-
D-галактуроновая к-та	-	±	-	±	+	±	+

лактон L-галактоновой к-ты	-	-	-	-	+	±	±
D-глюконовая к-та	±	-	±	-	-	+	+
D-глюкуроновая к-та	+	+	+	+	+	±	+
Муциновая к-та	-	-	-	-	±	-	-
Хинная к-та	±	±	±	-	±	+	-
D-глюкоаровая к-та	-	-	-	-	+	-	-
Метилпируват	±	±	-	±	+	+	+
Метиловый эфир D-молочной к-ты	-	±	-	±	-	-	-
α-кето-глутаровая к-та	±	-	±	-	+	+	+
D-яблочная к-та	+	±	+	±	+	+	+
Бром-янтарная к-та	-	-	-	-	+	+	+
Tween 40	+	+	±	+	-	-	-
γ-аминомасляная к-та	±	-	±	±	-	±	+
α-гидроксимасляная к-та	+	+	+	+	+	±	-
α-кетомасляная к-та	+	+	±	±	+	+	+
Пропионовая к-та	±	+	±	±	-	±	-
Уксусная к-та	+	+	+	+	-	+	+
Муравьиная к-та	+	+	+	+	-	+	-
Устойчивость к:							
Тролеандомицин	-	-	-	-	-	±	±
Рифампицин	-	-	-	-	+	+	+
Линкомицин	-	-	-	-	+	+	+
Ванкомицин	-	-	-	-	-	-	+
Налидиксовая к-та	-	-	-	-	+	-	+

Приложение 1. Таблица 6. Сходство последовательностей гена *rrs* между изолятами из клубеньков остролодочника Попова относящихся к роду *Mesorhizobium* и типовыми штаммами наиболее близких видов: 1 – *M. japonicum* MAFF 303099T, 2 – *M. erdmanii* USDA 3471T, 3 - *M. opportunistum* WSM2075T, 4 - *M. kowharii* ICMP 19512T.

Изолят	Сходство последовательностей гена <i>rrs</i> (%)			
	1	2	3	4
Оро-224	99.89	99.89	99.66	97.12
Оро-225	99.86	99.85	99.64	97.85
Оро-228	100	100	99.79	98.00
Оро-229	99.92	99.93	99.71	97.92
Оро-235	100	100	99.78	98.00
Оро-239	99.61	99.68	99.38	97.59
Оро-240	99.85	99.85	99.64	97.91
Оро-242	100	100	99.80	98.00
Оро-245	99.71	99.71	99.50	97.77
Оро-248	99.85	99.86	99.64	97.85
Оро-249	100	100	99.77	97.91
Оро-324	98.11	98.06	98.18	100

ПРИЛОЖЕНИЕ 2 (Секвенированные последовательности)

Приложение 2.1. Последовательности частичного гена 16s RNA изолятов, выделенных из клубеньков чины низкой.

Изолят 1/3М (*Herbiconiux sp.*)

CATGCAAGTCGAAACCGGTGAAGAGGAGCTTGCTCCTCTGGATCAGTGGCGAACCGGGTGAAGTAAACACGTGAGTAACTGCCCTTGACTCTGGGATAAGCGTTGGAACACGCTCTAATACCGGATACGACAACCGATGGCATCATCTGTTGTGAAAGAAATTTCCGGTCAAGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGTAATGGCCCAACGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTGCAACAATGGCGCAAGCCTGATGACGCAACCGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCCGGTTGTAAACCTCTTTAGTAGGGAAGAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCACCGGTAACCTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGAACCGTTGTCGGGAATTTATGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTGTCCGCTCTGCTGTGAAAACTGGAGGCTCAACCTCCAGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACCAATGGCGAAGGCAGATCTCTGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGTTGGGAAGTACGATGGGGACCATCCACGGTCTCCGTGTCGACGTAACGCATTAAGTTCGCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACGAGAACCGGGCTAGAAATAGTCAACTCTTGGACACTCTAAACAGGTTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTAATGTTGGGAACCTATAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAAATCATATGCCCTTATGCTTGGGCTTACGATGCTCAATGGCCGTAACAAGGGTGAATACCGTAAGGTGGAGCGAATCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGAGGCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGTGGATCAGCAACGCCGTTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCGCTCAAGTATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCAAAC

Изолят 1/5М (*Herbiconiux sp.*)

CATGCAAGTCGAAACCGGTGAAGAGGAGCTTGCTCCTCTGGATCAGTGGCGAACCGGGTGAAGTAAACACGTGAGTAACTGCCCTTGACTCTGGGATAAGCGTTGGAACACGCTCTAATACCGGATACGACAACCGATGGCATCATCTGTTGTGAAAGAAATTTCCGGTCAAGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGTAATGGCCCAACGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTGCAACAATGGCGCAAGCCTGATGACGCAACCGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCCGGTTGTAAACCTCTTTAGTAGGGAAGAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCACCGGTAACCTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGAACCGTTGTCGGGAATTTATGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTGTCCGCTCTGCTGTGAAAACTGGAGGCTCAACCTCCAGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACCAATGGCGAAGGCAGATCTCTGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGTTGGGAAGTACGATGGGGACCATCCACGGTCTCCGTGTCGACGTAACGCATTAAGTTCGCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACGAGAACCGGGCTAGAAATAGTCAACTCTTGGACACTCTAAACAGGTTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTAATGTTGGGAACCTATAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAAATCATATGCCCTTATGCTTGGGCTTACGATGCTCAATGGCCGTAACAAGGGTGAATACCGTAAGGTGGAGCGAATCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGAGGCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGTGGATCAGCAACGCCGTTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCGCTCAAGTATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCAAACCTTGTGGAGGGAGCCGTCGAAGTGGGATCGGTGATTAGGACTAAGTC

Изолят 1/9М (*Mucilaginibacter sp.*)

CATGCAAGTCGAAACCGGTGAAGAGGAGCTTGCTCCTCTGGATCAGTGGCGAACCGGGTGAAGTAAACACGTGAGTAACTGCCCTTGACTCTGGGATAAGCGTTGGAACACGCTCTAATACCGGATACGACAACCGATGGCATCATCTGTTGTGAAAGAAATTTCCGGTCAAGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGTAATGGCCCAACGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTGCAACAATGGCGCAAGCCTGATGACGCAACCGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCCGGTTGTAAACCTCTTTATACCGGAATAAACCCCTTACGAGTAGAGGGTTGAATGTACGGTAAGAATAAGGATCGGCTAACCCTCGTCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGATCCAAAGCCTTATCCGGATTTATTTGGGTTAAAGGGTGCATAGGTGGCTTTTAAAGTCAAGGGTGAAGAGCGGTAGCTTAACTATCGCAGTGCCTTGACTGAAGAGCTTGAATACACTAGAGGTAGGGGAAATGTGCAAGTAGCGGTGAATGCATAGATATGTCACAGAACAACCAATTCGGAAGGCAGCTTACTATGTTGTCATTGACACTGAGGCAGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGAATACTCGATGTTGGCGATATACGGTACGCTAAGCGAAAGCGTAAAGTATCCACTGGGAGTACGCCGCAAGGGTGAATCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGAGGAGCATGTGGTTAATTCGATGATACGCGAAGAACCTTACCGGGCTTGAAGTTAGTGAATAAAGCAGAGACGCTTTAGTCTTCCGGACACGAAACTAGGTGCTGATGGCTGTCGTCAGCTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGTGGATCAGCAACGCCGTTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCGCTCAAGCCTGGAAGCTGGAAGTGCCTGAAGTGCCTGCAACCCGAAGGAGCGTCTAGGGTAAAGTCGGTAACCTGGGCTAAGTC

Изолят 1/10К (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*)

CATGCAAGTCGAAACCGGTGAAGAGGAGCTTGCTCCTCTGGATCAGTGGCGAACCGGGTGAAGTAAACACGTGAGTAACTGCCCTTGACTCTGGGATAAGCGTTGGAACACGCTCTAATACCGGATACGACAACCGATGGCATCATCTGTTGTGAAAGAAATTTCCGGTCAAGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGTAATGGCCCAACGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTGCAACAATGGCGCAAGCCTGATGACGCAACCGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCCGGTTGTAAAGCCTTCCACGGGAGAAAGATAATGACGGTATCCCGGAGAAAGCCCGGTAACCTCGTGCAGCAGCCGCTAATACGAAAGGGGCTAGCGTGTTCGGAAATTAAGTGGCGTAAGAGCGCACGTAGGGCGGATGAAATTCGATAGATTTCCGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGC GGCTCACTGGTCCATTAAGTGCAGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGGATGAATGTTAGCCGCTGGGGAGTAACTGTTCCGTTGGCGCAGSTAAACGCAATTAACATTCGCTGGGAGTACGGTGCAGATTAAGTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCGCCTTGACATGCGCGCTACTGACAGATGCAAGGTTCCCTTCCGGGACCGGGACACAGGTGCTGATGGCTGCTGTCAGCTGCTGTCGATGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGCCCTAAGTTCCAGCAATTAAGTTGGGCACTTAAAGGGACTGCGGTGATAAAGCCGAGAGGAAGTGGGGATGACGCTCAAAGTCTCATGGCCCTACCGGGTGGGCTACACAGCTGCTACAATGGTGTGACAGTGGGAGCGAGCAGCGAGTGTGAGCTAATTCAAAAGCCTCAGTTCGGATTGCACTTGCACACTGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCGCTCAAGCCTGGAAGCTGGAAGTGCCTGAAGTGCCTGCAACCCGAAGGAGCGCTAGGGTAAAGTCGGTAACCTGGGCTAAGTC

Изолят 1/11М (*Tardiphaga robiniae*)

CATGCAAGTCGAAACCGGTGAAGAGGAGCTTGCTCCTCTGGATCAGTGGCGAACCGGGTGAAGTAAACACGTGAGTAACTGCCCTTGACTCTGGGATAAGCGTTGGAACACGCTCTAATACCGGATACGACAACCGATGGCATCATCTGTTGTGAAAGAAATTTCCGGTCAAGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGTAATGGCCCAACGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTGCAACAATGGCGCAAGCCTGATGACGCAACCGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCCGGTTGTAAAGCCTTCCACGGGAGAAAGATAATGACGGTACCGGTAAGAATAAGCCCGCTAACTCTGTCAGCAGCCCGGTAATACGAAAGGGGCTAGCGTGTCTCGGAATCACTGGGCTAAAGGGTGCATAGGGGTTTTAAGTCAGAGGTGAATCCTGGAGCTCAACTCCAGAACTGCCCTTGTACTGAAAGTCTGAGTATGGGAGAGGTGAGTGGGAACCTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGATAGATTTCCGAAAGAACACCAAGTGGCGGAA GCGCGTCACTGGCCATAACTGACGCTGAGGTCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGGATGAATGTTAGCCGCTGGGGAGTAACTGTTCCGTTGGCGCAGSTAAACGCAATTAACATTCGCTGGGAGTACGGTGCAGATTAAGTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGTGGAGCATGTGGTTAATTCGACGCAACGCGCAGAACCTTACCGCCTTGACATGCTATGACCGGTACCAAGATGGAACCTTCCCTTCCGGGATAGAGCACAAGGTGCTGATGGCTGCTGTCAGCTGCTGTCGATGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCGTCTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTTAAAGGACTGCCGTTGATAAAGCCGAGAGGAAGTGGGGATGACGCTCAAAGTCTCATGGCCCTACCGGGTGGGCTACACACGCTGCTACAATGGCGGTGCAATGGGATGCAAAAGGGCAACCTCGCAAAATGGCCCTCAGTTCGGATTGGGCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCGCTCAAGCCTGGAAGCTGGAAGTGCCTGAAGTGCCTGCAACCCGAAGGAGCGCTAGGGTAAAGTCGGTAACCTGGGCTAAGTC

GGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTCTACTGAAAGGCAGTGCCTAACCCGAAGGGGGCAGCTGACACCGGTAGGGTCA
GCGACTGGGGTGAAGTC

Изолят 1/14M (*Herbiconiux sp.*)

CATGCAAGTCGAAACGGTGAAGAGGAGCTTCTCCTCTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTACTCTGGGATAAGCGTTGGAAACGACGTCTAA TACCGGATAC
GACAACCGATGGCATCATCTGGTTGTGGAAAGAAATTTCCGTCGAAGGATGGACTCGCGGCTATCAGCTAGTTGGTGGAGTAAATGGCCCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGT
ACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGACAATGGCGCAAGCCTGATGACAGCAACCGCGTGGGGATGACGGCTTCGGTTGT
AAACSTCTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTGTCCGGAATTTGGGGCTAA
AGAGCTCGTAGGCGGTTTGTCCGCTCTGTGAAAACTGGAGGCTCAACCTCAGCTCAGTGGGTACGGCAGACTAGAGTGCAGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAAT
GCGCAGATATCAGAGGAACCCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGCCGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTT
GGGAATAGATGTGGGGACATTCACCGTCTCCGTGTCCGACTAACGCTTAAGTTCCCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTCAGCGGGGCCGCAAGCGG
CGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACGAGAAGCGGCCAGAAATGGTCAACTTTTGACACTCGTAAACAGGTGTGTGATGTTGTCTG
CTCGTGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGTCTATGTTGCCAGCAGTAATGGTGGGAATCATAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGATGAC
GTCAAATCATATGCCCTTATGCTTGGCTTACGCTATGCTACAATGGCCGTAACAAGGGCTGCAATACCGTAAGGTGGAGCGAAATCCCAAAAGCGCGTCAAGTTCCGATTGAGGTTGCA
ACTGCACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGTGGATCAGAACGCCAGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCAGTCAAGAGTCGGTAACACCCGAAGCGGGTGG
CCAAACCTTGTGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGTGATTAGGACTAAGTC

Изолят 1/15M (*Herbiconiux sp.*)

CATGCAAGTCGAAACGGTGAAGAGGAGCTTCTCCTCTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTACTCTGGGATAAGCGTTGGAAACGACGTCTAA TACCGGATAC
GACAACCGATGGCATCATCTGGTTGTGGAAAGAAATTTCCGTCGAAGGATGGACTCGCGGCTATCAGCTAGTTGGTGGAGTAAATGGCCCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGT
ACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGACAATGGCGCAAGCCTGATGACAGCAACCGCGTGGGGATGACGGCTTCGGTTGT
AACTCTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTAGGGTGAAGCGTTGTCCGGAATTTGGGGCTAA
GAGCTCGTAGGGCGGTTTGTCCGCTCTGTGAAAACTGGAGGCTCAACCTCAGCTCAGTGGGTACGGGCAAGCTAGAGTGCAGTGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGGAAATG
GC

Изолят 2/5-1 (*Rhizobium sp.*)

CATGCAAGTCGAAACGGTGAAGAGGAGCTTCTCCTCTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTACTCTGGGATAAGCGTTGGAAACGACGTCTAA TACCGGATAC
GACAACCGATGGCATCATCTGGTTGTGGAAAGAAATTTCCGTCGAAGGATGGACTCGCGGCTATCAGCTAGTTGGTGGAGTAAATGGCCCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGT
ACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGACAATGGCGCAAGCCTGATGACAGCAACCGCGTGGGGATGACGGCTTCGGTTGT
AACTCTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTAGGGTGAAGCGTTGTCCGGAATTTGGGGCTAA
GAGCTCGTAGGGCGGTTTGTCCGCTCTGTGAAAACTGGAGGCTCAACCTCAGCTCAGTGGGTACGGGCAAGCTAGAGTGCAGTGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGGAAATG
GC

Изолят 2/5(3) (*Aeromicrobium sp.*)

CATGCAAGTCGAAACGGTGAAGAGGAGCTTCTCCTCTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTACTCTGGGATAAGCGTTGGAAACGACGTCTAA TACCGGATAC
GACAACCGATGGCATCATCTGGTTGTGGAAAGAAATTTCCGTCGAAGGATGGACTCGCGGCTATCAGCTAGTTGGTGGAGTAAATGGCCCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGT
ACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGACAATGGCGCAAGCCTGATGACAGCAACCGCGTGGGGATGACGGCTTCGGTTGT
AACTCTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTAGGGTGAAGCGTTGTCCGGAATTTGGGGCTAA
GAGCTCGTAGGGCGGTTTGTCCGCTCTGTGAAAACTGGAGGCTCAACCTCAGCTCAGTGGGTACGGGCAAGCTAGAGTGCAGTGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGGAAATG
GC

Изолят 2/5(4) (*Aeromicrobium sp.*)

TGCAAGTCGAAACGGTGAAGAGGAGCTTCTCCTCTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTACTCTGGGATAAGCGTTGGAAACGACGTCTAA TACCGGATAC
GACAACCGATGGCATCATCTGGTTGTGGAAAGAAATTTCCGTCGAAGGATGGACTCGCGGCTATCAGCTAGTTGGTGGAGTAAATGGCCCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGT
ACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGACAATGGCGCAAGCCTGATGACAGCAACCGCGTGGGGATGACGGCTTCGGTTGT
AACTCTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTAGGGTGAAGCGTTGTCCGGAATTTGGGGCTAA
GAGCTCGTAGGGCGGTTTGTCCGCTCTGTGAAAACTGGAGGCTCAACCTCAGCTCAGTGGGTACGGGCAAGCTAGAGTGCAGTGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGGAAATG
GC

Изолят 2/10K (*Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*)

ATGCAAGTCGAAACGGTGAAGAGGAGCTTCTCCTCTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTACTCTGGGATAAGCGTTGGAAACGACGTCTAA TACCGGATAC
GACAACCGATGGCATCATCTGGTTGTGGAAAGAAATTTCCGTCGAAGGATGGACTCGCGGCTATCAGCTAGTTGGTGGAGTAAATGGCCCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGT
ACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGACAATGGCGCAAGCCTGATGACAGCAACCGCGTGGGGATGACGGCTTCGGTTGT
AACTCTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTAGGGTGAAGCGTTGTCCGGAATTTGGGGCTAA
GAGCTCGTAGGGCGGTTTGTCCGCTCTGTGAAAACTGGAGGCTCAACCTCAGCTCAGTGGGTACGGGCAAGCTAGAGTGCAGTGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGGAAATG
GC

GCTTAAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGGTAGCTTGTACTGGATTACGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCGC
 ATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTTGGCCCTTGCCTAATAGATAGCCTAAGTCGGAATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGG
 ATGATCCGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGT
 TGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACCTAGATTAATACTTTAGGATAAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCAGCTAACTCTGTGCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAGCG
 TTAATCGGATTTACTGGCGTAAAGCGTGCAGTGGCGGCAATTAAGTCAATGTGAATCCCCGAGCTTAACCTGGGAATTGCATTGATAGTGGTGGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGA
 ATTCAGGTTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCGACCTCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAAACAGGATTAGATAACCTG
 GTAGTCCATGCCGTAACGATGCTACTAGCCGTTGGGCGCTTGGGCTTGTAGTGGCGCAGTAAACGCGATAAGTAGACGCGCTGGGAGTACGCTGCAAGACTAAAATCAAAATGAATTTGAC
 GGGGGCCCGCAAGCGGTGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACCGAAGAACCTTACCTGGCTTGACATACAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGGCTTCGGGAACTCTGATACAGGT
 GCTGCATGGCTGTGTCAGCTGTGTCGATGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCCTATTGTCAGCAGCTCGGGTGGAACTTAAGGATACTGCCAGTGAACAACTGGA
 GGAAGGCGGGGACGAGCTCAAGTCATGATGTCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTCAATGGTTCGTTACAAAGGGTGTACACAGCGATGTGATCTAAATAAGCCGATCGTAGT
 CCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCAAGTCCGAAATCGTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCAGCCGCTCACACCTGGGAGTTTGTTC
 ACCAGAAGTAGGTACTAACCGCAAGGAGGACGTTACCAGGTGTGGCCGATGACTGGGTGAAGTCGTAACAAG

Приложение 2.3. Последовательности частичного гена 16s RNA изолятов, выделенных из клубеньков остролодочника трехлисточкового.

Изолят Tri-34 (*Phyllobacterium sp.*)

GCTACACATGCAAGTCGAGCGCCCGAGGGGAGCGGCGAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCCTTTTACGGAACAACACTGAGGAAACTCAGCTAATACCGTATACGGCCTTTGGGC
 GAAAGATTTATCGGAGAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGTGTGGTGGGTAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGTGTGTGAGAGGATGATACGCCACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCACTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGTGAAGGTCTTAGGATTGTAAGACTTTTACCCTGGAGATAATG
 ACGGTAACCGGAGAAAGCCCGGCTAAGCTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAAGGGGCTAGCTTGTTCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTTAAAGTCAAGGGT
 GAAATCCCGGGGCTAACCCCGAACTGCCTTTGATACTGGTGTAGTCTTGTAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGCGAGGAACACCACTGGCGAA
 GGCGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATAACCTGTGTAGTCCACGCGTAAACTATGAGAGCTAGCCCTGGGCGAGTACTGTTCCGT
 GGCGCAGTAAACGATTAAGCTCTCCGCTGGGAGTACGGTTCGAAAGATTAACCTCAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAA
 CCTTACCAGCCCTGACATCCCGATCGCGGTTACCAGAGATGGTATCCTTCAGTTAGGCTGGTTCGGTGCAGAGTGTGCTGATGGCTGTGCTGAGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
 AACGAGCGCAACCCCTGCGCTTGTGTCATATTAGTTGGCACTTAAGGGGACTGCGGTGATAAGCGGAGAGGAGTGGGGATGACGTCGAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTA
 CACACGTGCTACAATGGTGGTACAGTGGGAGCGAGACCCGCGAGGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATC
 GTGGATCAGAATGCCAGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCAGCCGCTCACACCATGGGAGTGTGGTTTACCAGAGGTGCTGTGTAACCCGCAAGGAGGCGAGCAACCCAGGTAGGGT
 CAGCGACTGGGTGAAGTCGTA

Изолят Tri-35 (*Phyllobacterium ifriqiense*)

GCTTACACATGCAAGTCGAGCGCCCGCAAGGGAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCAATCTTCGGAACAACATGGAACCGTGTGCTAATACCGAATGAGCCCTTCGGGG
 GAAAGATTTATCGGAATTGATGAGCCCGCTTGGATTAGTGTGGTGGGTAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGTGTGTGAGAGGATGATACGCCACTGGGACTGAGACACG
 GCCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCACTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGTGAAGGTCTTAGGATTGTAAGACTTTTACCCTGGAGATAATG
 ACGGTAACCGGAGAAAGCCCGGCTAAGCTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAAGGGGCTAGCTTGTTCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTTAAAGTCAAGGGT
 GAAATCCCGGGGCTAACCCCGAACTGCCTTTGATACTGGAAGTCTTGTAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGCGAGGAACACCACTGGCGAA
 GGCGCTCACTGGCTCGATACTGAGTTCGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATAACCTGTGTAGTCCACGCGTAAACTATGAGAGCTAGCCCTGGGCGAGTACTGTTCCGT
 GGCGCAGCAACCGATTAAGCTCTCCGCTGGGAGTACGGTTCGAAAGATTAACCTCAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAA
 CCTTACCAGCCCTGACATCCCGATCGCGGTTACCAGAGATGGTTCCTTCAGTTAGGCTGGTTCGGTGCAGAGTGTGCTGATGGCTGTGCTGAGCTGTGCTGAGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
 ACGAGCGCAACCCCTGCGCTTGTGTCATATTAGTTGGCACTTAAGGGGACTGCGGTGATAAGCGGAGAGGAGTGGGGATGACGTCGAGTCTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTAC
 ACACGTGCTACAATGGTGGTACAGTGGGAGCGAGACCCGCGAGGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATC
 GTGGATCAGAATGCCAGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCAGCCGCTCACACCATGGGAGTGTGGTTTACCAGAGGTGCTGTGTAACCCGCAAGGAGGCGAGCAACCCAGGTAGGGT
 CAGCGACTGGGTGAAGTCGTA

Изолят Tri-40 (*Phyllobacterium ifriqiense*)

GCTTAAACACATGCAAGTCGAGCGCCCGCAAGGGAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCAATCTTCGGAACAACATGGAACCGTGTGCTAATACCGAATGTCCTTCG
 GGGAAAGATTTATCGGAATTGATGAGCCCGCTTGGATTAGTGTGGTGGGTAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGTGTGTGAGAGGATGATACGCCACTGGGACTGAGAC
 ACGGCGGAGACTCCTACGGGAGGCGAGCACTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGTGAAGGTCTTAGGATTGTAAGACTTTTACCCTGGAGAAAGT
 AATGACGGTAACCGGAGAAAGCCCGGCTAAGCTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAAGGGGCTAGCGTGTTCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTTTAAAGTCAAG
 GGGTGAATCCCGGGGCTAACCCCGAACTGCCTTTGATACTGGAAGTCTTGTAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGCGAGGAACACCACTGG
 CGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATAACCTGTGTAGTCCACGCGTAAACTATGAGAGCTAGCCCTGGGCGAGTACTGTTCC
 GGTGGCAGCAACCGATTAAGCTCTCCGCTGGGAGTACGGTTCGAAAGATTAACCTCAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCA
 GAACTTACCAGCCCTGACATCCCGATCGCGGTTACCAGAGATGGTTCCTTCAGTTAGGCTGGATCGGTGACAGGCGTGCATGAGGATCGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
 GCAACGAGCGCAACCCCTGCC

Изолят Tri-41 (*Sphingomonas sp.*)

CTCCTTTAAGGATCTCGGCGAAAGCGCTCGAGCCTCGGCTCGGGGAGAGCTTCTCCATTCCAAAGAACAATTCGCCCGCTCTCATGTCCCTCATCTGGATACTGCCTCGGGGCTGGA
 TCGAAAGATCTGGCCTTTTCGGGCGATAGCTGAGCTGCTCGCCGCTCGCGCCCTTTGGGGTACGCGGGTATGGCGATGGGCGGTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACGCTGATAAGCGT
 GAGGTGATAGTTCACTCTACTCGGCCACCATCGACTTCTTATGCGCAACAAGCGGATGTTGAGAAAGTTTGGAAAGTTGGTTGGGGCTTACTGCTGAGTGGGAGCGGTTGCTTTGC
 AAGCATAGTTCATCGGTTCCGATCCGATAGGCTCCCAATCCGAGTTCGAGAGCAATAGCGAAGCAATTCGACGCAAAACAAGGACGCGCAAGCGGCAAGCGCCACAAGCGC
 CAGTTTTGCTGCGACTGACGCGCGGCTGCGCAACCAACTAGCCAATATCAGATGTAAGGACCGAGATCTGTTGCTAACGCAAGTATTTGGGCTCGCAAGAGCTGCTTTTTGACATT
 GTGAATGGTTTTTCAAATCGATGCGCTGACGGCTTCGGTTTCGGCGCAACGCTGAAGCAGGAGCGGGAACATGGGTGCTGCAACAAGTTGACCGCTCTGGTGGCGCGCCGAAATACAGCTG
 AGATTTAAATCATCGCATCAAGAGGGTTTTACCCGGCATTGCTGAGTGGAAAGCCTGGTAAAACACGATCAGTCTGCTGCGAGTTTTGCTGTGGTCTTTGGACCCATCCAGTGTGCTGTT
 GGTGGTGGACTCTCAAGCGTGAAGGCAATTCGTGGATGCTTGGCATGTACAGGCGATGAAGGACGTGGCAGCTGCGATAAGCGTGGGGGAGCCGTGAGCAGGACTGATCCGA
 CGATTTCCGATG

Изолят Tri-42 (*Bradyrhizobium sp.*)

CTTAAACACATGCAAGTCGAGCGCGTAGCAATACGAGCGGCGAGACGGGTGAGTAACAGCTGGGAACGTAACCTTTGGTTCCGGAACAACAGGAAACTTGTGCTAATACCGGATAAGCCCTTA
 CGGGGAAAGATTTATCGCGAAAGATCGGCCCGCTGATTAGTGTGGTGGGTAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGTGTGTGAGAGGATGATACGCCACTGGGACTGAGAC
 CAGGCGGAGACTCCTACGGGAGGCGAGCACTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGTGAAGGTCTTAGGATTGTAAGACTTTTACCCTGGAGAAAG
 TAATGACTGTACCGCAAGAATAAGCCCGGCTAAGCTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAAGGGGCTAGCGTGTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTTAAAGTCCG
 TGGTGAATCCTGGAGCTCAACTCCAGAACTGCCTTGCATCTGGGAGTCTCGAGTTCGGGAGAGGTGAGTGGAACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGCAAGAAACACAGTGGC
 GAAGGCGGCTCACTGCCCCGATACTGAGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATAACCTGTGTAGTCCAGCCGTAACAGTGAATGTAGCCGTTGGTGGGTTTACCCTTCA
 GTGGCGCAGTAAACGTTCACTTCCGCTGGGGAGTACGGTGGCAAGTAAACTCAAGAGTTAAACTCAAGGCGGCGCCGCAAGCGGTGGAGCATGAGGATTTAAATTCGACGCAACGCGC
 AGAACCTTACCAGCCCTGACATGTCAGGACCGGTCGAGAGATGTGACCTTCTNNTCCGAGCCTGGAACACAGGTGCTGATGCTG

CACACGCTGACAAATGGCGGTGACAATGGCGAGCGAAAGGGCGACCTCGAGCTAATCCAAAAAGCCGTCTCAGTTTCAGATTGTACTCTGCAACTCGAGTACATGAAGGTGGAATCGCTAGTAA
CGTGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTACCCGAAGGCGTGCCTCAACGCAAGGAGGACGGCCACCGGTAGCG
TCAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG

Изолят Tri-55 (*Rhizobium sp.*)

TTGTTACGACTTACCCSCAGTCGCTGACCTACCGTGGTTAGCTGCCTCTTGGGTTAGCGCACTACCTTCGGGTAAACCAACTCCCATGGTGTGACGGGGGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT
ATTCACCCGCGCATGCTGATCCCGGATTACTAGCGATTCCAACCTCATGCACTCGAGTTGCAAGAGTGCACATCCGAAGCTGAGATGGCTTTGGAGATTAGCTCACACTCGCGTCTCCTGCCCCAC
CGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAAGCAGTGGGGAAATTTGGACAATGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGATGAAGGTCTTAGGATTGAAAGCTCTTCCACCGTGAAGATAA
TGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCGCTAACTCTGCGCAGCAGCCGGTAATACGAAGGGGGTAGCGTGTTCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGCGGACTATTAAGTCAAGG
GTGAAATCCCGGGCTCAACCCCGAACTGCTTTGATACTGGTAGTCTGAGTTGCGAGAGAGTGTGGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGATAGATTCCGAGGAAACACCAAGTGGCGA
AGGCGGCTCACTGGTTCGATCTGCGCTTGCATGCAATGAAACCACTGCTCCACCGTTCGGGGCAACAGAGTATGATACCCCTGGTCAACCGCTAACTATGAGAGTAGCCGTCGGGCAAGTACTGTTCGG
TGCGCAGCTAACGATTAAGCTCTCCGCTGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAACCAAGAAAGTACGCGGGGCGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGCAGAG
ACCTTACCCAGCCTTGACATCCCGATCGCGTTACAGAGATGGTATCTTCAGTTAGGCTGGATCGGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTAGCTGCTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCTCGCCCTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTTAAGGGGACTGCCGGTATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCT
ACACAGTGTACAATGGTGGTGACAGTGGCAAGCAGCGAGCTCGAGCTAATCCAAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTTCGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAA
TCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTACCCGAAGGTGCTGTCTAACCGAAGGAGGACAGCAACCGGTAGG
GCTTACGCTGCGCCACCAAGTATACTGCCCCGCGCTAACATTCATCGTTTACGG

Изолят Tri-56 (*Phyllobacterium sp.*)

GCTTACACATGCAAGTCGAGCGCCCGCAAGGGGAGCGGAGACGCGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCCTTTCTACGGAACAACCTGAGGGAACCTAGCTAATACCGTATACGGCCTTTGG
GCGAAAGATTATCGGAGAAGGATGAGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGCGCAGCATCATTAGCTGGTGTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACA
CGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAAGCAGTGGGGAAATTTGGACAATGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGATGAAGGTCTTAGGATTGAAAGCTCTTCCACCGTGAAGATAA
TGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCGCTAACTCTGCGCAGCAGCCGGTAATACGAAGGGGGTAGCGTGTTCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGCGGACTATTAAGTCAAGG
GTGAAATCCCGGGCTCAACCCCGAACTGCTTTGATACTGGTAGTCTGAGTTGCGAGAGAGTGTGGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGATAGATTCCGAGGAAACACCAAGTGGCGA
AGGCGGCTCACTGGTTCGATCTGCGCTTGCATGCAATGAAACCACTGCTCCACCGTTCGGGGCAACAGAGTATGATACCCCTGGTCAACCGCTAACTATGAGAGTAGCCGTCGGGCAAGTACTGTTCGG
TGCGCAGCTAACGATTAAGCTCTCCGCTGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAACCAAGAAAGTACGCGGGGCGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGCAGAG
ACCTTACCCAGCCTTGACATCCCGATCGCGTTACAGAGATGGTATCTTCAGTTAGGCTGGATCGGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTAGCTGCTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCTCGCCCTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTTAAGGGGACTGCCGGTATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCT
ACACAGTGTACAATGGTGGTGACAGTGGCAAGCAGCGAGCTCGAGCTAATCCAAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTTCGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAA
TCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTACCCGAAGGTGCTGTCTAACCGAAGGAGGACAGCAACCGGTAGG
GTCAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAAG

Изолят Tri-57 (*Acinetobacter radioresistens*)

CTTGTACGACTTACCCSAGTCATCGGCCACACCGTGGTAAGCGTCTCTTGGGTTAGACTACCTACTTCTGGTGCAACAACCTCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAAACG
TATTACCCGCGCATTCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTATCGAGTGCAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGATCGGCTTTTGGATTAGCATCACATCGCTGTGTAGCAACCC TTT
GTACCCGACATTTAGCAGCTGTGTAGCCCTGGCCGTAAAGGGCCATGATGACTGACGTCGTCGCCGCTTCTCAGTTTGTCACTGGCAGTATCCTTAAAGTTCCACCCCGAAAGTGTGGCAAA
AAGAAAAAGGTTGCGCTGTTGCGGACTTAACCAACATCTCACACACGACTGACGACGCCATGCAGCACTGATCAGAGTTCGCAAGGCAACCAATCCATCTCTGGAAGTTCCTGTGA
TGTCAAGGCGAGTAAGTTTGCATGCAATTAACCACTGCTCCACCGTTCGGGGCCCGCTCAATTCATTGAGTTTTAGTCTTTCGAGCTACTCCCGAGCGTACTCCCGAGCGGCTACTATTC
GCGTTAGCTGCGCCATAAAGCCTCAAGGGCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCATGGACTACCAAGGTATATAATCTGTTTGTCCCAATGCTTGTACCTCAGCGTCACTATTAGGC
CAGATGGTGTGCTTCCGATCGGTTATCTCCAGATCTACGCAATTCACCGTACACCTGGAATTTACCATCTCTCCCACTACTAGCCAACCGATGCAATGCAATTCCTCAAGTTAAGTCCGG
GGATTTCACATTTGACTTAATTTGGCGCCTACGCAAGGCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTCGCACCTCTG

Изолят Tri-58 (*Acinetobacter sp.*)

CATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGTAGCTGCTACTGATTAGCGCGGCGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGACACAGTTCCGAAAGGRCGCTAATACCGCATACGT
CTTACCGGAGAAAGCAGGGGACCTTTGGGCTTGCCTAATAGATGAGCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTGTGAGAGGATGATC
CGCACACTGGGACTGAGACACGGCCGACTCCTACGGGAGGCGACGATGGGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCTGATCCAGCCATGCCCGGTGTGTAAGAAAGGCTTTTGGTTGTA
GCACTTTAAG

Изолят Tri-143 (*Neorhizobium sp.*)

CATTGCAAGTCGAGCGCCCGCAAGGGGAGCGGAGACGCGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCATCCCTACGGAACAACCTCCGGGAACTG GAGCTAATACCGTATACGCCCTTTCGGGGGAA
AGATTTATCGGGATGGATGAGCCCGCTTGGATTAGTGTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCCTAGCTGGTGTGAGAGGATGATCAGCCACTTGGGACTGAGACACGGCC
CAAACCTTACGGGAGGCAAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGAAGGTCTTAGGATTGAAAGCTCTTCCACCGGAGAAAGATAATGAC
GGTATTCGGAAGAAAGCCCGCTAATCTGTCGACGAGCGCGGTAATACGAAGGGGGTAGCGTGTTCGGAACTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGCGGATATTAAGTCAGGGGTGA
AATCCSAGAGCTAACTCTGAACTGCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAAGTGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGCAGGAA CACCAAGTGGCGAAGGC
GGCTTACTGGTCCATTAAGTACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCAGCCGTAACAGATGAATGTTAGCCGTGCGCAAGTTACTTGTCTGGTGGCG
CAGSTAACGCAATTAACATTCGCTGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAACCAAGGAAATTGACGGGGGCGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGC GAGAACCTTA
CCAGCCCTTGCATCTCCCGCTAGCTACAGAGATGATGTTCCCTTCCGGGACCGGGACACAGTGTGCTGATGGCTGTCGTAGCTGCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCTTCCCGCTTGTGTTCCAGACTTTCAGTTGGGCACTTAAGGGGACTGCGGTGATACGCGGAGAGAGGTGGGATGACGTCAGTCAAGTCTCATGGCCTTACCGGCTCAGCAACG CAGT
CTAATGTTGGTGTGACAGTGGCAGCGAAGGAGCGATCCCGAGCTAATCCAAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGGACTTGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAAATCG
AGCAGCGCGGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTACCCGAAGGTAGTGCCTAACCGCAAGGAGGACGCTAACCCAGGTAGGGTACGCGAC
TGGGGTGAAGTCGTAACAAG

Изолят Tri-146 (*Neorhizobium sp.*)

GSTACASATGCAAGTCGAGCGCTCGCAAGAGGAGCGGCAAGCGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCATCCCTACGGAACAACCTCCGGGAACTGGAGCTAATACCGTATACGCCCTTCGG
GGGAAAGATTATCGGGATGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCCTAGCTGGTGTGAGAGGATGATCAGCCACTTGGGACTGAGACA
CGGCCCAAACCTTACCGGAGGCGACGATGGGGAAATTTGGACAATGGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGAAGGTCTTAGGATTGAAAGCTCTTCCACCGGAGAAAGATA
ATGACGCTTCCGGAGAAAGAACCCCGCTAATCTGTCGACGAGCGCGGTAATACGAAGGGGGTAGCGTGTTCGGAACTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGCGGATATTAAGTCAGG
GGTGAATCCSAGAGCTAACTCTGAACTGCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAAGTGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGCAGGAAACACCAAGTGGCG
AAGCGGCTTACTGGTCCATTAAGTACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGATGTTCCAGCCGTAAACGATGAATGTTAGCCGTGCGCAAGTTACTTGTCTGG
TGCGCAGCTAACGCAATTAACATTCGCTGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAACCAAGGAAATTGACGGGGGCGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGCAGAG
ACCTTACGCCCCTTGCATGACATGCCCGCTACTACAGAGATGATGTTGCTTCCCTTGGGGACCGGGACACAGTGTGCTGATGGCTGTCGTAGCTGCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC
GAGCGCAACCCCTGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAAGGGGACTGCCGGTATAAGCCGAGAGGAAGTGGGGATGACGTCAGTCAAGTCTCATGGCCTTACGGGCTGGGCTACAC
ACGTTGCTASAATGGTGGTGAAGTGGGAGCGAAGGAGCGATCCCGAGCTAATCCAAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTTCGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAAATCGC
GGATCAGCAGCGCGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTACCCGAAGGTAGTGCCTAACCGCAAGGAGGACGCTAACCCAGGTAGGGTACGCGAC
GCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG

Изолят Tri-147 (*Agromyces sp.*)

CATGCAAGTCGAGCGATGATCGGTTGCTTACCAGGGGATAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTCGAGTAACCTGCCCTGGACTCTGGGATAACCCCGAGAAATCGGAGCTAATACCGGATAG
GACCTTGGAAACCGCATGTTTTGGTGGAAAGTTTTTCGGTCTGGGATGACTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGAAGTAAAGTCCACCAAGCGCTGACGGGTAGCCGCTGAGAGGGTAC
CGGCCACACTGGGACTGAGACCGCCGCAAGCTCCTACGGGAGGCGAGCACTGGGGAAATTTGGACAATGGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGAAGGTCTTAGGATTGAAAGCTCTTCCACCGGAGAAAGATA
AACCTTTTAGTAGGAAAGAAAGGCTTTCGGCTTACGCTGACGAGTACCTGCAGAAAAAGCAGCCGCTAATACGTTGCCAGCAGCCGCGTAATACGATAGGGTGCAGGCTGTCGGGAAATTTAGGGCGT
AAAGAGCTGTAGGGGTTTGTACGCTGCTGTGAAATCCCGAGGCTCAACCTCGGGCTGCAAGTGGGTACGGGCGAGACTGGAGTGCAGTGGGAGAGAAAGTGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGA
ATGCGCAGATATCAGGAGAACACCGATGGCGAAGCGATTCTTGGCCGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCGTGGTGTCCAGCCGTAACCTG

TGGGCGCTAGATGTGGGGACCTTCCACGGTTCCGTGTCGTAGTAAACGCATTAAGCGCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGG
GCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCA

Изолят Tri-149 (*Neorhizobium sp.*)

TCGAGCGCCCGCAAGGGGAGCGGAGCGGGTGAAGTAAACGCGTGGGAATCTACCCATCCCTACGGAAACAACCTCGGGAACCTGGAGCTAATACCGTATACGCCCTTCGGGGGAAAGATTATC
GGGGATGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGCCCTACCAAGCGCACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCT
ACGGGAGGCGAGTGGGGAATTTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAAGTGAAGGCTTAAAGCTCTTCCCGGAGAGAATAATGACGGTATCCGG
AGAAAGCCCGCTAACTCTGTCGACGACGCCGGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGTTCCGAATTAAGCTGGCGTAAAGCGCACGTAGGGC

Изолят Tri-152 (*Rhizobium sp.*)

GCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCGCAAGGGGAGCGGAGCGGGTGAAGTAAACGCGTGGGAACGTACCCCTTACTACGGAATAACGAGGAACTGTGCTAATACCGTATGTCCTTCG
GGGAAAGATTATCGGTAAGGGATCGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGCCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGAC
ACGGCCAACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAAGTGAAGGCTTAAAGCTCTTCCCGGAGAGAAT
AATGACGGTATCCGGAGAGAAGCCCGCTAACTCTGTCGACGACGCCGGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGTTCCGAATTAAGCTGGCGTAAAGCGCACGTAGGGGACATTAAGTCA
GGGTAAATCCAGAGCTCAACTCGGAATCGCTTTGATACTGGGTGTCGGAGTATGGAAGAGGTGAGTGAATCCCGA

Изолят Tri-155 (*Rhizobium leguminosarum bv. viciae*)

TCGAGCGCCCGCAAGGGGAGCGGAGCGGGTGAAGTAAACGCGTGGGAATCTACCCCTGACTACGGAAATAACGAGGAACTGTGCTAATACCGTATGTCCTTCGGGAGAAAGATTATCG
GTCAAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGCCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAAACACGGCCAACTCCTAC
GGGAGGCGAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCCCAAGCCTGATCCAAACCATGCCCGTGAAGTGAAGGCTTAAAGCTCTTCCCGGAGAGAATAATGACGGTATCCGG
GAAGAAGCCCGCTAACTCTGTCGACGACGCCGGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGTTCCGAATTAAGCTGGCGTAAAGCGCACGTAGGGGATGATCAGTCAAGGGTGAATCCAGGG
CTAACCTTGGAACTGCTTTGATACTGTCGATCTGGAGTATGGAAGAGGTGAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGCTTAAAGCTGGAGGAAACACCAAGTGGCGAAGCGGCTCACTGG
TCCATTAAGCGCTGAGTGGGAGCGTGGGAGCAACAGGATAGATAACCTGGTAGTCCAGCCGTAACAGTGAATGTAGCCCGTGGGAGTACTGTTCCGTTGGCGCAGCTAACG
CATTAACATTTCCGCTGGGGAGTACCGTTCGCAAGATTAACACTCAAAGGAAATGACGGGGGCCGCAAGCGGTTGAGGATGATGAGTGAATTCGAAAGCAACCGCGAGAACCTTACCAGCCCT
GACATGCCCGCTACTTGGCAGAGATGCAAGGTTCCCTTCGGGGACCGGACACAGGTTGCTGATGGCTGTCGTCAGCTGTCGTCGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCG
CCCTAGTTGCGACGATCAGTTGGGCACTAAGGGGACTGCCGGTGAAGCGGAGAGGAGGTGGGGATGACGTCAGTCTCATGGCCCTACGGGCTGGGCTACACAGTGTACAATGG
TGGTACAGTGGGCGAGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGATGCAATGCACTGCAACTCGATGAAGTTGGAATCGCTAGTAACTCGCGGATCAGCATGCC
CGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCGTACACCATGGGAGTGGTTTTACCGAAGGTAGTGCCTAACCGCAAGGAGCGACTAACCCGTTAGGGTACGGACTGGGGTAA
GTCTGAACAAGTA

Изолят Tri-154 (*Agromyces ramosus*)

CATGCAAGCGAGTATCGGGTCTTGCACCGGGGATTAGTGGCGAACGGTGAAGTAAACGCGTGAAGTAACTCCCTGGACTTGGGATAACCCCGAGAAATCGGAGCTAATACCGGATAGG
ACCTGGAACCGCATGTTTGGGTGAAAGTTTTCCGCTGGGATGACTCGCGCTATCAGCTTGTGGTGAAGTAAAGGCTACCAAGGCGTACGCGGTAGCCGCTGAGAGGGTAC
GGCCSACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATTTGCACAATGGCGCAAGCTGATGCAAGCCCGCTGAGGGATGACGGCTTCGGTTGTAA
ACCTTTTAGTAGGGAAGAAGGGCTTCGGCTTACGGTACCTGCGAAGAAAGCAGCCGGTAACTACGTGCGCAGCCCGGTAATACGTAAGGGTGGGAGCTTTCGGAAATTTGGGGCTA
AAGAGCTGTAAGCGGTTTTGCAAGTCTGTGAAATCCGAGGCTCAACTCGGGCTGAGTGGGTACGGGCGAGACTGGAAGTGGGAGGGAATAAGGAAATTCCTGGTGAAGCGGTGAA
TGCGCAGATATCAGGAGGAACCCGATGGCGAAGGCAAGTCTCTGGCCGTAACCTGACGCTGANGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGCAACAGGATTAGATACCTGGTATCCAGCCGTAACCGTT
GGGCGTAGATGTGGGGACCTTCCACGGTTCCGTGTCGTAGTAAACGCATTAAGCGCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCAAGCG
GCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTACATAACCGAGAACGCCCTAGAAAAATAGG

Изолят Tri-471 (*Bosea sp.*)

AGTGCAGCGGCACTCGGTGCTAGTGGCAGACGGGTGAAGTAAACGCGTGGGAACGTACCTTTCGGTTCCGAAATAATCCAGGGAACCTTGGACTAATACCGGATAAGCCCTTCGGGGAAAGATT
ATCCCGGATAGATCGCCCGCTGCTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC
CTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCCAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAAGTGAAGGCTTAAAGCTCTTTCGGGGAAAGATAATGACTGTACCG
GAAGAATAAGCCCGCTAACTCTGTCGACGACGCCGGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGCTAGGGGACTCTTAAGTCCGGGGTGAAGGCCA
GGGCTAACCCCTGGAATTCCTGATAGTGAAGTCTTGAAGTTCGGAAGAGGTTGGTGAAGTGCAGTGTAGAGGTTAAAGTTCGATAGATTTCCGAAGAACCCAGTGGCGAAAGCGGCCA
AGGCTCCGATGACGCTGAAGCGGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCAGCCGTAACGATGAATGCCAGCCGTTGGGGTGCATGACCTCAGTGGCCGAG
TAA

Изолят Tri-474 (*Sphingomonas sp.*)

CCCTCTCTTCTAAGGATATCGCGGAAAGCGCTTCTGGTTTCGACAGGAGAAGAGCTTCTCCATTCCAAAGAACATAGCCCGCTCCTCATGTCCCTCATCACTGGATACCAACCGCCGAGGT
AAGTGGCCGGTGGTTAGCCTGAGCTGGCTACGCCGCTCGCGCCCTTGGGTGGTCAAGGATGGCATGGGCGCCGGTGGTCAAGGCTGAGTGGGAGGCGCTAGCTTGAAGCTCTTTCGGGGAAAGATAATGACTGTACCG
ACTCTCAACTCTCGGCCCACTCGGCCCACTCGAGCGCGGCTTGCAGCAAGCGCCAGACGGGGCTTACTGATGGGAGAGCGCTAGCTTGAAGCTCTTTCGGGGAAAGATAATGACTGTACCG
ACAGGCTCCACGAGCTCAGCGCGAGGATGGTTGCCGGGCGCCGCCAAGATACCAAGGATGAAGATCATCAGATCCGCTGCTGATAGCGGTAGCGGATCGCTATGCGGCTCGC
TTGCGTCTTGCATTTGGAATGGGTTTTCAAACTGATGCCGTGAGGTGTTGATTTTCAGTGCAGAAAGTGGAAATATCGGCCACGAAATCAAGGCTGAGATAAATCAACCAACCAAAACAA
ACGCTGCTGCTGCTCGCAGTTCGTGTCAGTCTCGGACTGATCCAGAGTTGTCGTTGGTGTGGACTCTCAAGCGTGAAGTAAAGGGCGTTGGTGGATGCTTGGCATGTCAGCGGCA
AGGACGTGGCAGCTGCGATAAGCGTGGTGAAGTGGAGCAAACTTACCCGACGATTTCCGAATGGG

Приложение 2.4.1. Последовательности частичного гена 16s RNA изолятов, выделенных из клубеньков остролодочника Попова.

Оро-5 (*Phyllobacterium ifriqiyense*)

CATGCAAGCGCCCGCAAGGGGAGTGGCAGACGGGTGAAGTAAACGCGTGGGAATCTACCCAACTTTCGGAACAACACATGGAACCTGTGCTAATACCGAATGAGCCCTTCGGGGAAAG
TTTATCGGAATGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGCCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCG
ACTCTACCGGAGGCGAGCATGGGGAATTTGGACAATGGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAAGTGAAGGCTTAAAGCTCTTCCCGGTAAGATAATGACGGTAT
ACCGGAGAAAGAACCCCGCTAACTCTGTCGACGAGCCCGGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGTTCCGATTTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGGGACTTTAAAGTCAAGGGTGAAT
CCCGGGGCTCAACCCCGAAGTGCCTTGTACTGGAAGTCTTGAAGTTCGAGAGAGGTGAGTGAATTCGAGTGTAGAGGTTAAAGTTCGATAGATTTCCGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGG
CTCACTGGCTGATACTGACGCTGAGGTGGGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCAGCCGTAACATGAGAGCTAGCCGTCGGGCAAGTACTGTTCCGTTGGCGCA
GSAACGCAATTAAGTCTCCGCTGGGAGTACGGTGCAGATTAACACTCAAAGGAAATGACGGGGCCCGCACAGCGGTTGGAGCATGTTGTTAATTCGAAGCAACCGCAGAACCTTACC
AGCCCTTGCATCCCTCAGCGGTTACAGAGATGGTTTTCTTCAAGTGGTGGATCGGTGACAGGTTGCTGATGGCTGTCGTCAGCTGTCGTCGATGTTGGGTTAAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCTCCCTTACTGATCCATCAATTCAGTTGGGCACTAAGGGGACTCCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAAGTGGGGATGACGCTCAAGTCCCTATGCCCCCTACGGCTGGGCTACACAG
TGCTACAATGGTGGTGAAGTGGGAGCGAGACCGGAGGTCAGGTAATCTCCAAAGCACTCAGTTGCGATTGCACTGCAACTCGAGTGCATGAAGTGGAAATCGCTAGTAACTGTTGGA

TCGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCGAAGGTGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCAGGCAACACGGTAGGGTCAGGC
ACTGGGGTGAAGTC

Opo-7 (*Neorhizobium galegae*)

CATGCAAGTCGAGCGCCCCGAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCATCCCTACGGAAACACTCCGGGAACTGGAGCTAATACCGTTACGCCCTTCGGG GAAAA
GATTTATCGGGGATGGATGAGCCCCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC
AACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAAGTGAAGGCTTAGGATTGAAAGCTTTCCACGGGAGAAGATAATGACG
GTATCCGGAGAAAGCCCCGGCTAATCTGTCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGTTCCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGGCGGATATTAAGTACGGGGTAA
ATCCAGAGCTCAACTCTGGAACCTGCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGGAAGAGTAAAGTGGGAATTCGAGGTGAGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCGAGTGGCGAAGCG
GCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGTTAGCCGTCCGGCAAGTTTACTGTGCGTGGCGC
AGCTAACGCATTAACATTCCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGATTAACCTCAAGGAATTAAGCGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGGTTTAAATTCGAAGCAACCGCAGAACCTTAC
CAGCCCTTGACATGCCCGCTAGCTACAGAGATGATGTTCCCTTCGGGGACCGGGACACAGGTGCTGATGGCTGTCGTGAGCTGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCTGCCCTTAGTTGCGCAGATTACGTTGGGCACTAAAGGGGACTGCCGGTATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGTACACACGTCG
TACAATGGTGGTACAGTGGCGAGCAAGGAGCGATCCGAGCTAATCTCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAACTCGGGATCA
GCAGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCGAAGGTAGTGCGCTAACCGCAAGGAGGCAGTAAACCGTAGGGTCAGCGACT
GGGTGAAGTC

Opo-8 (*Rhizobium sp.*)

TTGTTACGACTTACCCAGTCGCTGACCTACCGTGGTTAGTGCCTCTTGCGGTACGCGCACTACCTCGGGTAAACCAACTCCCAGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGT
ATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAACCTCATGCACTCGAGTTGACAGGTGCAATCCGAAGTGAAGTGGCTTTGGAGATTAGCTCACACTCGCGTGCCTGCCACTG
TCACCACATTGTAGCAGTGTGTAGCCAGCCGTAAGGGCCATGAGGACTTACGCTCATCCCACTTCTCTCGCTTATCACCGGCAGTCCCTTAGAGTGGCCAACTAAATGCTGGCACTA
AAGCGAGGGTTCGGCTGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCAGACACGAGCTGACGACAGCCATGACAGCACCTGTCTGCGCCACCGAGTGGACCCCATATCTACGGGTAACACAGGAT
GTCAAGGGCTGGTAAGGTTCTGCGGTTGCTTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTGTGCGGGCCCCGCAATCTCTTAGTTTTAATCTTGGACCGTACTCCCCAGCGGAATGTTAAT
GCGTTAGCTGCGCCACCGAAGTATACTGCCCCGACGGCTAACATTATCGTTTACGGCGTGGACTACCA

Opo-70 (*Acetobacter sp.*)

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAGCGAACGCTGCGCGCATGCTTAACACATGCAAGTCGACGCAAGGTTTCGGCCTTAGTGCGGACGAGGGTGAAGTAAACCGTATCCATGGGTGGGGGA
TAACCTGGGAACTGGAGCTAATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAGGGCGCAAGTCGCTGTGGAGGAGCCTGCGTTGATTAGCTGTGTTGGTGGGGTATGGCTACCAAGGCGATGATCGAT
AGCTGGTGTGAGAGGATGATCAGCCACATGGGACTGAGACACGCGCCAGACTCTCAGGGAGGACGAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCCTGATCCAGCAATGCCGCTGTGTG
AAGAAGKTTTCGAGTAAAGCTTTTCGCGGACTTAACCAACATCTCAGACACGAGCTGACGACAGCCATGACAGCACCTGTCTGCGCCACCGAGTGGACCCCATATCTACGGGTAACACAGGAT
GACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGCGGTTTGTACAGTCAAGTGTAAATCCCGGGCTAACCTGGGAGTGCATTGTAGCTGACGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGAATTCACAGT
TAGAGGTGA

Opo-73 (*Sphingomonas sp.*)

CATTGCAAGTCGAACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGGCGCACGGNGCGTAACCGNGGGAATCTGCCCTNNGGTTCCGAATAACAGTGTAGAATGACTGCTAATACCGGATGATGCTGAAGACC
AAAGATTTATCGCCCAAGGATGAGCCCGCTAGGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAAGCTACCAAGGCGACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCTACGGGAGGACAGAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCTGAGTGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAGGCTTTTACCCGGGATGATAATGAC
AGTACCGGGAGAATAAGCTCCGGCTAATCTGTCGACAGCAGCCGCGTAATACGAGGGGAGTACGCTTATTCCGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGGCGGCTTTGTAAGTTAGAGGTGA
AAGCCCGGGCTCAACTCCGGAATAGCCTTTAAGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAAGAACACCGATGGCGAAGG
CGGCTACTGGACTGTTAGCGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACCGCTAAACGATGATAACTAGCTGCTCGGGCACTTGTGCTGGGTG
GCGCAGTAAACGCATTAAGTTATCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACCTCAAGGAATTGACGGGGCTGCACAAGCG

Opo-74 (*Sphingomonas sp.*)

GCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTTGGGTTCCGAATAACAGTGTAGAATTAAGTGTAACTGCTAATACCGGATGATGCTGC
AAGACCAAGATTTATCGCCGAGGATGAGCCCGCTAGGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAAGCTACCAAGGCGACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAG
ACACGGCCGAGACTCTACGGGAGGACAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCTGAGTGAAGGCCCTTAGGGTTGTAAGGCTTTTACCCGGGATG
ATAATGACAGTACCGGGAGAATAAGCCCGGCTAATCCGTCGACAGCAGCCGCGTAATACGAGGGGGTAGCGTATTCCGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGGCGGCTTTGTAAGT
AGAGGTGAAAGCTTGGAGCTCAACTCCAGAAGTGCCTTTGAGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAAGAACACCGATG
GCGAAGGCGGCTACTGGACTGTTAGCGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACCGCTAAACGATGATAACTAGCTGCTCGGGCACTTGTGCTGGGTG
TTAGGTGGCGCAGTAAACGATTAAGTTATCCGCTGGGGTGTAT

Opo-156 (*Stenotrophomonas sp.*)

CTTGTTACGACTTACCCAGTCATCGGCCACACCGTGGCAAGCGCCTCCNAANGTTAAGCTACCTGCTTCTGGTGAACAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAA C
GTATTACCCGACGAATGCTGATGCTGCTGATTACTAGCGATTCCGACTTATGAGTGCAGTTCGAGACTCCTTCCGACTGAGATAGGGTTTCTGGGATTGGCTTACCCTGCGCGGCTTGCAGCC
TCTGCTCCTACCATTTGATAGTACGTGTGTAGCCCTGGCGTAAGGGCCATGATGACTTACGCTATCCCACTTCTCTCGGTTTATCACCGGCGGTCTCCTAGAGTTCCACCAATTACGTCGTG CA
ACTAAGGACAAGGGTTGCGCTGTTGGCGGACTTAACCAACATCTCAGACACGAGCTGACGAGCCATGCAAGCCATGCAAGCCTGTTGAGTTCGAGTTCCGGAAGGCCACCATCTCTGGAAGTTCTCG
ACATGCAAGGGCCAGTAAAGGTTCTTCCGCTGTCATCGAATTAACCAACATCTCAGCCACTGACCGCTTGTGCGGGCCCCGCTCAATTCCTTTGAGTTTTCAGCTTTCGACCGTACTCCCCAGGGCGCAACT
AACGGTTAGCTTCGATACTCGGTGCCAAATGACCCCAACATCCAGTTCGATGCTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTTCTCCACCGTTCGTGCTCATGTAGTTGG
TCCAGGTAGCTGCTTCCGATGATGTTCTCTGATC

Opo-157 (*Rhizobium lusitanum*)

TTGTTACGACTTACCCAGTCGCTGACCTACCGTGGTTAGTGCCTCTTGCGGTTAGCGCACTACCTCGGGTAAACCAACTCCCAGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGT
ATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAACCTCATGCACTCGAGTTGACAGGTGCAATCCGAAGTGAAGTGGCTTTGGAGATTAGCTCACACTCGCGTGCCTGCCACT GT
CACCACCATTTGATGACAGTGTGTAGCCAGCCGTAAGGGCCATGAGGACTTACGCTATCCCACTTCTCTCGGTTTATCACCGGCAGTCCCCTTAGAGTGGCCAACTAAATGCTGGCAACTAA
GGGGAGGGTTGCGGCTGCTTTCGCGGACTTAACCCCAACATCTCAGACACGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTCTCTGCGCCACCGAAGTGGACCCCATATCTACGGGTAACACAGGAT
GTCAAGGGCTGGTAAGGTTCTGCGGTTGCTTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGCAATCTCTTTGAGTTTAAATCTTGGACCGTACTCCCCAGGGCGGAATGTTAATG
CGTTAGCTGCGCCACCGAAGTATACTGCCCCGACGGCTAACATTATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTTCTCCCCAC

Opo-160 (*Phyllobacterium trifolii*)

ACATGCAAGTCGAACGCATCGCAAGATGAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCAATTTCTCGGAACAACTGAGGGAACCTCAGCTAATACCGGATGTCGCCCTTCGGGGGAA
AGATTTATCGGAATTTGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAAGTGAAGGCTTTAGGATTGTAAGGCTTTTACCAGGTGAAGATAATGACG
GTAACCGGAGAAGAAGCCCGGCTAATCTGTCGACAGCCGCGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGTTCCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGGCGGACTAATAGTACGGGGTAA
ATCCCGGGCTCAACCCCGAACTGCTTTGATACTGAGTGTAGTTGAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCGAGTGGCGAAGGC
GGCTACTGGCTGATGACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACATGAGAGCTAGCCGTCGGGCACTACTGTTCCGTTGGC
GCAGCTAACGCATTAAGTCTCCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGATTAACCACTCAAGGAATTTGACGGGGCCCCGCAAGCGGTGGAGCATGTTGTTTAAATTCGAAGCAACCGCGAGAACCTT
ACCAGCCCTTGACATCCGATCGCGGTTACAGAGATGTTATCTTACAGTGGCTGGTGGTACAGGGTGTGCTGCTGAGTGTGGGTTAAGTCCCGCAACG

AGCGCAACCTCGCCCTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCGGGTATAAGCCGAGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCCTATGGCCCTACGCGCTGGGCTACACA
CGTGCTACAATGTGTGTGACAGTGGGCAGCGAGCCGCGAGTGCAGTAACTCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGAGTTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAACTCGTG
GATCAGAATGCCACGTGAATACGTTCCCGGGCCCTGTACACACCCGCGCTCACACCATGGGAGTGGTTTACCAGGAGGTGCTGTGTAACCGCAAGGAGGCGAGCAACCCAGGTAGGGTCAAG
CGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG

Opo-161 (*Rhizobium lusitanum*)

CTTGTTACGACTTACCCAGTCGCTGACCCCTACCGTGGTTAGCTGCTCCTTGGCGTTAGCGCACTACCTTCGGGTAACCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAAC
TATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTAAGCGATTCAACTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCATCCGAAGTGCAGTGGCTTTTGGAGATTAGCTCACAACCTCGCGTGTGCTGCCA
CTGTCACCCATTGTAGCAGTGTGTAGCCACGCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCACTCCCGCTCTCTCGGCTTATCACCGGCGAGTCCCTTAGAGTGGCCAACTAAATGCTGGCACT
AAGGGCGAGGGTGTGCTGTTGGGGACTTAAACCAACTCTCACGACACGAGTGCAGCAGCCATGCAGCACCTGTCTCTCGCCACCGAAGTGGACCCCATCTCTACGGTAAACACAGG
ATGTCAAGGGCTGTGAAGTTCTGCGCGTTCCTCNAATTAACACCATGTCCACCGCTTGTGCGGGCCCGCTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCAGCGTACTCCCGAGCGGGAATGTTAA
TGCGTTAGTGTGCCACCGAACAGTATACTGCCGACGGCTAAATTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCGGGTATCTAATCTGTTTCTCCACCGCTTTCGACCTCAGCGTCAAGTAAAGG
AGTGAAGCCGCTTCCGCACTGCGTGTTCCTCCGAATCTACGAATTTTCACTCTACACTCGGAATTCACCTCACTCTTCATACCTCCAGATCGACAGATCAAAGGCAAGTTCAGGGTTGAGCCCT
GGATTTACCCCTGACTGATCGATCCGCTACGTGCGCTTTACGCCAGTAATCCGAACAACGCT

Opo-164 (*Burkholderia sp.*)

CCTTACACATGCAAGTCGAACGGGACGACCGGGGCAACCTGGTGGCGAGTGGCGAAGGGTGTAGTAATACATCGGAACGTGTCTGTAGTGGGGATAGCCCGGCAAGCCGGATTAATACC
GCATACGATCTACGGAAGAAAGCGGGGATCGCAAGACTCGCGCTATAGGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAG
AGGACGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGAAACCTGATCCAGCAATGCCCGTGTGTGAAGAAGCCCTCG
GGTTGAAGGCACTTTTCCGGAAAGAAAATCTTCCGCTAATACGGCGGGAGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTAGTGCAGCAGCGCGGTAATACGTAGGGTGGCA
CGGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGTGGCAGCGGTTCTTAAGACAGATGTGAATCCCGGGCTAACCTGGGAACTGCATTTGTAGTGGCGAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGG
TAGAATTCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGAAATACCGTGGCGAAGGCAAGCCCTGGGCAATCTGACGCTCATGCAAGG

Opo-166 (*Acinetobacter sp.*)

CATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGTAGCTTGTACTGGAATCAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGTAATACCGCATACG
TCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTTGGGCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCCGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGTGTGAGAGGATGAT
CCGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCTGATCCAGCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGCCCTTTGTTGTAA
AGCACTTAAAGCAGGAGGACTACCTAGATTAATACTTTAGGATAGTGGACTTACTCGAGAATAAGCACCGG

Opo-169 (*Rhizobium sp.*)

CTTGTTACGACTTACCCAGTCGCTGACCCCTACCGTGGTTAGCTGCTCCTTGGCGTTAGCGCACTACCTTCGGGTAACCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAA
TATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTAAGCGATTCAACTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCATCCGAAGTGCAGTGGCTTTTGGAGATTAGCTCACAACCTCGCGTGTGCTGCCA
CTGTCACCCATTGTAGCAGTGTGTAGCCAGCCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGCATCTCCACCTTCTCTCGGCTTACACCGGCGAGTCCCTTAGAGTGGCCAACTAAATGCTGGCACT
AAGGGCGAGGGTGTGCTGTTGGGGACTTAAACCAACTCTCACGACACGAGTGCAGCAGCCATGCAGCACCTGTCTCTCGCCACCGAGTGGACCCCATATCTCTACGGGTAAACACAGGA
GTCAAGGGCTGGTAAAGTTCTGCGCTTTCGAAATTAACACCATGTCCACCGCTTGTGCGGGCCCGCTAACTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCAGCCGTAATCCCGAGCGGGAATGTTAAT
GCGTTAGTGCGCCACCGAAGTACTGCCCCGACGGCTAACATTATCGTTTACGGCGTGGACTACCA

Opo-170 (*Bacillus sp.*)

CTCCGGATGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCTTGAACCCGATGTTCAAGGATGAAA
GACGGTTTCCGGTGTCACTTACAGATGGACCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACTGAGAGGGTGTATGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGACGATAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACCGCGGTGAGTGTGAAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGA
ACAAGTGGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCAGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAAGTGGCAAGCGTGTCCGGAATATTGGCGTAAAGG
GCTCGAGGGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAGCCCGCGCTCAACCGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAACTTGAAGTGCAGAAGANGAGAGTGGAAATCCACGTTGATCGGGTGAATGCG
TAGAGTGTGGAGAAACCAAGTGGCGAAGCGACTCTCTGCTGTAACGTAGCTGANGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACCGCTAAACGATGAG
TGTAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGTGACGTAACGCTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAACTGAAACTCAAAGGAATGACGGGGGGCCCGACAAGC

Opo-224 (*Mesorhizobium sp.*)

GCCTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCGCAAGGGGAGCGGACGAGCGGGTGTAGTAAACGCTGGGAACTACCCATCTACGGAACAACCTCCGGAACTGGAGCTAATACCGTATACGTCCTTT
GGAGAAAGATTTATCGGAGATGATGAGCCCGCTTGGATAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTGTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGACGATGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAAGTGTGAAAGGCCTAGGGTTGAAAGCTCTTCAACGGTGAAGAT
AATACGGTAAACGTAAGAAGCCCGCTAACTTCTGTCAGCAGCGCGGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGTTGGAATTAAGTGGCGTAAGCGGATAGCTAAGTACGAG
GGGTAAATCCCGGGGCTCAACCCCGAAGTGCCTTGTACTGAGTGGGATCTCGAGTCCGGAAGAGTGTGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACAGTGG
CGAAGGGGCTCACTGCTCGCTAGCTGACGCTGAGGTCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGTAAGTCCAGCCGTAACAGTGAAGCTAGCCGTGGCAAAGTTACTTTGT
CGGTGGCGCAGTAAACGCTAAGCTTCCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAAATAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGC
AGAA

Opo-223 (*Mesorhizobium sp.*)

GCCCGAGGGAGCGGACGAGACGGGTGAGTAAACGCGTGGGAATCTACCCATCTCTACGGAACAACCTCCGGAACTGGAGCTAATACCGTATACGTCCTTTTGGAGAAAGATTTATCGGA
GATGAGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTGTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAAGTGTGAAGGCCTAGGGTTGTAAGCTCTTCAACGGTGAAGATAATGACGGTAAACGTAAGAGAA
GCCCGGCTAACTCGTCCAGCAGCGCGGTAATACGAAGGGGGTAGCGCTTGTTCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCACGTAGGGGATACTAAGTCAAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAAC
CCCGAACTGCCTTTGATACGTTGATCTCGAGTCCGGAAGAAGTGGAGTGGAAATCCGAGTGGTAGAG

Opo-227 (*Mesorhizobium sp.*)

GCAGGGAGCGGACGAAACGGGTGAGTAAACGCGTGGGAATCTACCCATCTCTACGGAACAACCTCCGGAACTGGAGCTAATACCGTATACGTCCTTTTGGAGAAAGATTTATCGGAGATGATG
AGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTGTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCG
CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAAGTGTGAAGGCCTAGGGTTGTAAGCTCTTCAACGGTGAAGATAATGACGGTAAACCGTAGAAGAGCC
CGCTAACTCTGTCGGGAGGCAAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAAGTGTGAAGGCCTAGGGTTGTAAGCTCTTCAACGGTGAAGATAATGACGGTAAACCGTGAAGAG
GAACTGCTTTGATACTGGGTATCTCGAGTCCGGAAGAAGTGGAGTGGAAATCCGAGTGGTAGA

Opo-229 (*Mesorhizobium sp.*)

GCCTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCGCAAGGGGAGCGGACGAGCGGGTGTAGTAAACGCTGGGAACTACCCATCTCTACGGAACAACCTCCGGAACTGGAGCTAATACCGTATACGTCCTTT
GGAGAAAGATTTATCGGAGATGATGAGCCCGCTTGGATAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTGTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCG
ACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGACGATGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAAGTGTGAAGGCCTAGGGTTGTAAGCTCTTCAACGGTGAAGATAATGACGGTAAACCGTGAAGAG
AATGACGGTAAACGTAAGAAGCCCGCTAACTTCTGTCAGCAGCGCGGTAATACGAAGGGGGTAGCGCTTGTTCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCACGTAGGGGATACTAAGTCAAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCG
GAACTGCTTTGATACTGGGTATCTCGAGTCCGGAAGAAGTGGAGTGGAAATCCGAGTGGTAGA

GGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGAACTGCCTTTGATACTGGGTATCTCGAGTCCGGAAGAGGTGAGTGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGG
CGAAGGCGGCTACTGTCGGCTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACTGGTAGTCCACGCCGTAAACAGATGGAAGCTAGCCGTTGGCAAGTTACTTGTCT
GGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTCTCCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAAATAAAACCTAAAGGAATGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATCGAAGCAACCGCGCA
GAACCTTACCGACTTGCATCCCGTTCGCGGTTTCCAGAGATGGATACCTTCAGTTCGGCTGGACAGGTGACAGGTTGCTGCATGGCTGTCTGACGCTCGTGTCTGAGATGTTGGTTAAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCCTGCCTTGTGCCAGCATTCAAGTGGGCTCTAAGGGGACTGCCGGTATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTACGGGCTGG
GCTACACAGTGTACAATGTTGGTGCAGTGGGCGAGCAGCGAGGTTCAGTAACTTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAG
TAATCGCGATCAGCATCCCGCGTGAATACGTTCCCGGCGCTGTACACCCCGCTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGCGCTGTGTAACCCGAAGGAGCGAGCGACCCAGT
AGGGTCAGCGACTGGGTGAAGTGC

Opo-234 (*Rhizobium lusitanum*)

GCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCGCAAGGGGAGCGGACAGCGGTGAGTAACCGTGGGAATCTACCCTTTCTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGTAATACCGTATGTGCTCTCG
GGAGAAAGATTTATCGGAAAGGATGAGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCTCAACAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGAC
ACGGCCAAACTCCTACGGGAGCGAGCATGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCCGCGTAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGAT
AATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCGCTAAGTTCGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTCGGAATTAAGCGCACGTAGGCGGATGCATCAGTCAG
GGGTGAAATCCAGGGCTCAACCTTGAAGTGCCTTTGATACTGTGCATCTGGAGTATGGAAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGGCTACTGGTCAATTACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGAATGTAGCCGTCGGGCGAGTACTGTTCG
GTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCGCCCTGGGGAGTACGGTGCAGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATG

Opo-227 (*Mesorhizobium sp.*)

GCGCCCGCAGGGGAGCGGAGAACGGGTGAGTAACCGTGGGAATCTACCCTCTACGGAACAACCTCCGGGAACTGGAGCTAATACCGTATACGCTCTTTGGAGAAAGATTATCGGAGAT
GGATGAGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACCGCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCCGCGTAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGTAAGATAAGCGGTAACCGTGAAGA
AGCCCGGCTAAGTTCGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCTAAGTCAAGGGTGAATCCCGGGCTCAA
CCCCGAACTCGCTTTGATACTGGGTATCTCGAGTCCGGAAGAAGTGGAGTGGAAATCCGAGTGGTAGAGGTGA

Opo-230 (*Bosea vaviloviae*)

TGCAAGTCGAACGGGTATCTCGGATACTAGTGGCAGACGGGTGAGTAACAGTGGGAACCTACCTTCGGTTGGAATAATTACGGGAACTTGGACTAATACCGGATACGCCCTTCGGGGAA
AGATTTATCGCGATAGATCGGCCGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC
AACTCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCCGCGTAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAAAGATAATGACT
GTACCGGAAGAATAAGCCCGCTAAGTTCGTGCCAGCAGCGCGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGGTAGGCGGACTTTAAGTCCGGGGGTG
AAAGCCAGGGCTCAACCTTGAATTCGATACTGAGAGTCTGAGTTCGGAAGAGGTTGGTGAAGTGCAGTGTAGAGGTGAATTCGTAGATATTCGAAGAACACCAGTGGCGAAG
GCGGCCAACTGGTCCGATACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTGTAGTCCAGCCGTAACAGATGAATCCAGCCGTTGGGGTGCATGCACCTCAGTG
GCGCAGCTAACGCTTTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAAATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGCGAGAA
CTTACCAGCTTTGACATGTCGGGTTGAGGAACAGAGATGTAACCTCTTCAGTTCGGCTGGCCGGAAACAGAGTGTGCATGGCTGCTGCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCTCGCCCTAGTGGCATCATTAGTTGGAACTCTAGGGGACTGCCGGTATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACAGGCTGGGCTAC
ACAGTGTCTACAATGGCGGTGACAATGGGCGCAAGGAGCGATCCGGTGTAAATCCAAAAGCCGCTCAAGTTGATGATCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATC
GTGGATCAGATGCCAGGTGAATACGTTCCCGGCTGTACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTTACCCGAAGCGCTCGCGTAAACCGAAGGAGCGAGCGACCCAGCTAGCG
TTCAGCGACTGGG

Opo-238 (*Mesorhizobium sp.*)

ACGGAACAATCCGGGAACTGGAGTAAATACCGTATACGCTCTTTGGAGAAGATTATCGGAGATGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATC
CATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCCGCTGAG
TGATGAGGCCCTAGGTTGGAAAGCTTTCAACCGGTGAAGATAATACCCGTAACCCGTTAGAGGTTGATGAGGCCAGCCGCTAAATACCGGTAAGATAAGCGGTAACCGTGAAGA
GAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATACTAAGTCAAGGGTGAATCCCGGGCTCAACCCGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTCGAGTCCGGAAGAAGGTGAGTGGAAATC
CGAGTGT

Opo-246 (*Mesorhizobium sp.*)

GACTTACCCAGTGCCTGAACTACCGTGGGCTCGCTCCTTGGGTTAGCAGACGCGCTTCGGGTAACCAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACCTATTCA
CGGGCATGCTGATCCGGATTAAGCTACTAGCATTCACTCATCGAGTTCAGAGTGAATCCGAAGTGAAGTGGCTTTGGAGATTAGCTGACCTCGCGTCTCGCTGCCACTGTCACCA
CATTTGATGACAGTGTGATGCCAGCCGTAAGGGCATGAGGACTGACGCTATCCCACTTCTCTCGGTTATACCCGCGAGTCCCTTAGAGTGCACCACTGAATGCTGGCAACTAAGGGCG
AGGGTTGCGCTGTTGGGAACTAACCAACATCTCACGACACGAGTGCAGCAGCCATGACAGCACTGTACCCGCTCCGCGGTAACCGGTAAGGTTGATGAGTTCGGAACCGGAGATGTTGG
CAAGGGTGGGTAAGGTTCTGCGGTTGCTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCGCTCAATTCCTTTGAGTTTAAATCNTGCGACCGTACTCCCGAGCGGGAAGCTTAA
GTTAGTGCACCCAGCAAGTAAACTTCCAAAGGCTAGCTTTCATGCTTTACGGCTGGACTACCAAGGATATTAATCTGTTGCTCCCGACGCTTTCGACCTCAGCTCAGTA

Opo-247 (*Rhizobium sp.*)

ACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGTAATACCGTATGTGCTCTCGGAGAAAGATTATCGGAAAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCTACCAAGGCGAGC
ATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCCGCT
GAGTGTAAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCGGCTAAGTTCGTGCCAGCAGCCGCTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGT
TCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATGCATGTCAGGGGTGAAATCCAGGGGCTCAACCCCTGGAAGTGCCTTTGATACTGTGCATCTGGAGATGGAAGAGGTGAGTGGAAAT
CCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACTGTTCCTACTGACGCTGAGTGGCAAGCCGTTGGGGAGCAAAACAGGATTAAGTACCCGCTGAG
TCCAGCCGTAACAGTGAATGTTAGCCGTCGGGCGATACTGTTCCGGTGGCGAGCTAACGCATTAACACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGG
CCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGCGAAGACTTACCGGCTTACACCCCTGACACCCCTGTATACCCGTAAGATATGGGCTCACTTGGGCGAGAGCATGTGCTGC
ATGGCTGTGTCAGCTGTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGCCCTAGTTGCGCAGATTTAGTTGGGACTCTAAGGGGACTGCCGTTGATAAGCCGAGAGGA
AGTGGGATACGCTCAAGTCTTACGGCTTCCGCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTCAACTAAGTGGTGGTGCAGTGGGACAGCGAGTGCATGGCTGAGTGTGAGTAAATTCGAAAGCCATCTGTTGG
ATTGACTGTCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGCGCTGTACACCCCGCTCACACCATGGGAGTGGTTTTACCC
GAAGG

Opo-248 (*Mesorhizobium sp.*)

GCTTACACATGCAAGTCGAGCGCCCGCAAGGGGAGCGGAGCAGCGGTGAGTAACCGTGGGAATCTACCCTCTCTACGGAACAACCTCCGGGAACTGGAGCTAATACCGTATACGCTCTTTGG
AGAAAGATTTATCGGAGATGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACAC
GGGCGCAGACTCTACGGGAGGAGCAGCTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCCGCTGAGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGTGAAGATA
ATGACGTTAAGCGTAAAGGAAAGCCCGCTAAGTTCGTGCCAGCAGCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTCGGAATTAAGCGCACGTAGGCGGATACTTAAGTCA
AGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGAACTGCCTTTGATACTGGGTATCTCGAGTCCGGAAGAAGGTGGAGTGGAAATCCGAGTGGTAAAGGTGAAATTCGTAGATATTCGAAGGAACCC
AGTGGGCGAAGGCGGCTCACTGTCCGCTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGGAAACAGGATTAAGTACTGTTAGTCCAGCCGTAACAGATGGAAGCTAGCCGTTGGCAAGTTT
ACTGTCCGTTGGCGAGCTAACGCATTAAGCTTCCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGTAAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAA
CGCGCAACCTTACCAAGCCCTACCGGCTTCCGCGGTTCCAGAGATGATACCTTCAGTTCGGCTGGACCGGTGACAGGTTGCTGCATGGCTGAGTGTGAGTAAATTCGAAAGCCATCTGTTGG
AAGTCCCGAAGGAGCGCAACCCCTGCCTTGTGCCAGCATTAGTTGGGACTCTAAGGGGACTGCCGGTATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTACGG

GCTGGGCTACACAGTGTACAATGGTGGTGACAGTGGGCGAGCAGCCGCGAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATC
GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGCGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCGAGCGACC
ACGGTAGGGTCAGCGACTGGGGTGAAGT

Opo-251 (*Mesorhizobium sp.*)

GGAGCGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCATCTACGGAACAACTCCGGGAAACTGGAGCTAATACCGTATACGTCCTTCCGGAGAAAAGATTATCGGAGATGGATGAGCCCC
CGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGCCAACTCTACGGGAGGCGAGCTGG
GGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCGTATCCAGCCATGCCCGTGAAGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTTCAACCGTGNAGATAATGACGGTAAACCGTAGAAGAACCCCGGCTA
ACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGTTCCGGAATTAAGTGGGCTAAAGCGCACGTAGGCGGATTGTTAAGTTAGGGGTGAAATCCCGGGGCTAACCCCGAACTG
CCTTTAATACTGGCAATCTCGAGTCCGAGAGAGGTGAGTGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATCGTAGATATTCCGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTACTGGCTCGGTACTGACGCTG
AGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAACATATGAGAGCTAGCCGTCCGCAAGTTTACTTGTGGTGGCGAGCTAACGCATTAAGCTCCCGCT
GGGGAGTACGGTCCGAAGTAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTTGAGCATGTGGTTAATTCAAGCAACCGCGAGAACCCTACCAGCCCTTGACATCCCGTCCGCG
TTCCAGAGATGGTAACCTTCAAGTTCGGCTGACCGGTGACAGGTGCTGATGCCCTGCTCAGCTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTGCCCTTAGTTGCCA
GCATTAAGTTGGGCACTAAGGGGACTGCCGTTGATAAGCCGAGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTACAATGGTGGTACAGTGG
GCAGCGAGACCGGAGGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTT
CCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCGAGCCGACCAGGTTAGTTCAGCGACTGG

Opo-252 (*Mesorhizobium sp.*)

AGCGCCTCGAAGAGGAGCGGAGAGCGGGTGAAGTAAACGCGTGGGAATCTACCCATCTACGGAACAACTCCGGGAAACTGGAGCTAATACCGTATACGTCCTTCCGGAGAAAAGATTATCGGA
GATGGATGAGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGCCAACTCTACG
GGAGGCGAGCTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAAGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTTCAACCGTGNAGATAATGACGGTAAACCGTAGA
AGAAGCCCGGCTAATCTCGTCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGTTCCGGAATTAAGTGGGCTAAAGCGCACGTAGGCGGATTGTTAAGTTAGGGGTGAAATCCCGGGGCT
CAACCCCGAACTGCCTTAATACTGGCAATCTCGAGTCCGAGAGAGGTGAGTGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATCGTAGATATTCCGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTACTGGCT
CGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAACATATGAGAGCTAGCCGTCCGCAAGTTTACTTGTGGTGGCGAGCTAACGCAT
TAAGCTCCCGCTGGGAGTGAAGGATTAATAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCAAGCAACGCGCAGAACCCTACCAGCCCTTGAC
ATCCCGTCCGCGTTCCAGAGATGGTAACCTTCAAGTTCGGCTGGACCGGTGACAGGTGCTGATGGCTGCTGCTGAGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCG
CCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTAAGGGGACTGCCGTTGATAAGCCGAGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTACAATGG
TGGTGACAGTGGGCGAGACCGGAGGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCG
CGGTGAATACGTTCCCGGGCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCGAGCCAGGTTAGTTCAGCGACTGG

Opo-254 (*Mesorhizobium sp.*)

TCGAGCGCCTCGCAGAGGAGCGGAGAGCGGGTGAAGTAAACGCGTGGGAATCTACCCATCTACGGAACAACTCCGGGAAACTGGAGCTAATACCGTATACGTCCTTCCGGAGAAAAGATTATCGG
GATGGATGAGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGCCAACTCTACG
GGAGGCGAGCTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAAGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTTCAACCGTGNAGATAATGACGGTAAACCGTAGA
AGAAGCCCGGCTAATCTCGTCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGTTCCGGAATTAAGTGGGCTAAAGCGCACGTAGGCGGATTGTTAAGTTAGGGGTGAAATCCCGGGGCT
CAACCCCGAACTGCCTTAATACTGGCAATCTCGAGTCCGAGAGAGGTGAGTGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATCGTAGATATTCCGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTACTGGCT
CGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAACATATGAGAGCTAGCCGTCCGCAAGTTTACTTGTGGTGGCGAGCTAACGCAT
TAAGCTCCCGCTGGGAGTGAAGGATTAATAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCAAGCAACGCGCAGAACCCTACCAGCCCTTGAC
ATCCCGTCCGCGTTCCAGAGATGGTAACCTTCAAGTTCGGCTGGACCGGTGACAGGTGCTGATGGCTGCTGCTGAGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCG
CCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTAAGGGGACTGCCGTTGATAAGCCGAGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTACAATGG
TGGTGACAGTGGGCGAGACCGGAGGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCG
CGGTGAATACGTTCCCGGGCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCGAGCCAGGTTAGTTCAGCGACTGG

Opo-325 (*Mesorhizobium sp.*)

GCCAGCCCGCGTAAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTCGGAATTAAGTGGGCTAAAGCGCAGTAGGCGGATTGTTAAGTTAGGGGTGAAATCCCGGGGCTAACCCCGAACTGCCTTTAATA
CTGCGCAATCTCGAGTCCGAGAGAGGTGAGTGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTSGTAGATATTCCGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTACTGGCTCGGTACTGACGCTGAGGTGCGA
AAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCANGCCGTAACATATGAGAGCTAGCCGTCCGCAAGTTTACTTGTGGTGGCGAGCTAACGCATTAAGCTCTCCGCTGGGAGTA
CGGTGCAAGATTAATACTCAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCAAGCAACCGCGCAGAACCCTACCAGCCCTTGACATCCCGTCCGCGTTCCAGAG
ATGGTAACTTCAGTTCCGCTGGACCGGTGACAGGTGCTGATGGCTGCTGCTGAGCTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTAGTTGCCAGCATTAAAGT
TGGGCACTAAGGGGACTGCCGTTGATAAGCCGAGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTACAATGGTGGTACAGTGGGCGAGCGAG
ACCGCGAGGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTAATACGTTCCCGGGC
TTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCGAGCGCAACCGTAGGGTTCAGCGACTGGGTTAAGTTCGTAACAA

Opo-326 (*Mesorhizobium sp.*)

CATGCAAGTGCAGCGCCTCGCAGAGGAGCGGACGAGCGGGTGAAGTAAACGCGTGGGAATCTACCCATCTACGGAACAACTCCGGGAAACTGGAGCTAATACCGTATACGTCCTTCCGGAGAAAAG
ATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGCCAACT
ACTCTACGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGAAGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTTCAACCGTGNAGATAATGACGGT
AACCCTAGAAAGCAAGCCCGCTAATCTGTCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGTTCCGGAATTAAGTGGGCTAAAGCGCACGTAGGCGGATTGTTAAGTTAGGGGTGAAAT
CCCGGGGCTAACCCCGAACTGCCTTAATACTGGCAATCTCGAGTCCGAGAGAGGTGAGTGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATCGTAGATATTCCGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGG
CTACTGGCTCGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAACTATGAGAGCTAGCCGTCCGCAAGTTTACTTGTGGTGGCGCA
GCTAACGCATTAAAGTTCAGCTCCGCTGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAATAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCAAGCAACCGCGCAGAACCCTTACC
AGCCCTTGACATCCCGTCCGCGTTCCAGAGATGGTAACCTTCAAGTTCGGCTGGACCGGTGACAGGTGCTGATGGCTGCTGCTGAGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCTCGCCCTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTTAAGGGGACTGCCGTTGATAAGCCGAGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGCT
GCTACAATGGTGGTACAGTGGGCGAGACCGGAGGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCGGAT
CAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCGAGCCAGGTTAGTTCAGCGACTGG
TGGTGAAGT

Opo-327 (*Bacillus sp.*)

AGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGACTGAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGNTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGA
ACCTTACCAGGCTTAGACCTCTGACACTAGAGATAGAGCGTCCCTCCGCGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGCTGACGCTCGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCTTATCTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAAGTGTACTGCCGTTGACAAACCAGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAACTCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACAC
ACGTTGCTACAATGGATGGTACAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCAATCCCAATAAACCATTCTCAGTTCCGATTGAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTGGAAATCGTAGTAATCGC
GGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCGAGCCAGGTTAGTTCAGCGACTGG

Opo-340 (*Sphingomonas sp.*)

CCCACCGTGGTCCGGCCCTCTCTGCGAGTTAGCGCAACGCTTCCGGTGAATCCAACCTCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCTGGGAACGATTACCAGCGGATGCTGATCCG
GATTACTAGCGATTCCGCTTCTGCACTCGAGTTGACAGAGTGAATCCGAACTGAGACGACTTTGGAGATTAGCTCACCTCGCAGATTGCTGCCACTGTAGTCCGATTTGATGACGCTGTG

AGCCACGCGCTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCACCTTCTCCGGCTTATACCCGGCGGTTCTTTAGAGTACCCAACTGAATGATGGTAACTAAAGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCG
GGACTTAACCAACATCTCAGCAGCAGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTGTCCAGTCCCGAAGGGAAGATGATCATCTGGAATCTGCGGACATGTCAAACGCTGGTAAGGTTCTC
GCGCGTTGCTTGAATTAACCAACATGCTCCACCGCTGTGCGAGGCCCGCTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGCCGCTACTCCCAAGGCGGATAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACCAAG
ACTAAGTCCCGGACAGCTAGTTATCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGATATCTAATCTGTTTGCCTCCACGCTTTCGACCTCAGCGTCATA

Приложение 2.4.2. Последовательности частичного ITS региона изолятов, выделенных из клубеньков остролодочника Попова.

Оро-69 частичный итс регион (*Microbacterium sp.*)

TTTGGCGGCTGGATCCCTCTTTCTAAGGAGCATCTGGCGCTTTCGGGGTGTCCAGGCGCGTGTGCGAGCAATGTCCTGTCGGTGTCTATGGTGGAACTTTGACGAGGTGCGAGG
ATGGGGTTCTCACTTAGTACGCTGCTTGCAGTTGGAACGGTGGGGTTTTCTGGTCTTGCACGTGACGCTGTTGGGTCTGAGGACCGGGGACGAGGATTTGTTTTCCGTTCTTCTGGGCT
CATCTTCGTTTGTGCTGCTGTTGCTGGTGGTGGGGTGGTACCGCCCTACTTTGAGAACTACACAGTGGACGCGAGCATCTTTGAACCGACCTTCGGTGTGTTGCGAAAGATGATCTTAA
GATCATTAGTCAATTTGACGACATGCCCTTTCGGGGTGTGTTTTGATTCGATTTTGGACTCATGTTTCAAGCTTTAAGAGCAACCGTGGATGCTTGGCATCTGGAGCCGAAGAAGGA CG
TAGCAATCTGCGATAAGCTCGGGAACTGATAAGCAAGTTTTGATCGAGGGTGTCCGAATGGGAAACCCGGA

Оро-72 частичный итс регион (*Sphingobacterium sp.*)

CCCTCTTTTCTAGAGGACGGGTGATCGGGCTGTTACGCCATGAAGATTTCTAATGAAAGAAAAGAAAGAAAAAAGAAAGATAGTACCCGCACACCTACAGGGGGTACCGGAGCAGAAAGAGA
GAGAGTGCAGTCCCGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCACTACTGATAAATGAGGGTCAGCACTCAAAATCTGCTCGGACTCCGTAAGGGGGATAGCTCAGCTGGCTAGAGCACCTGCTT
GCACGAGGGGTTCAACGGTTTCAATCCGTTTATCTCCACGCTCATCCCTGGATGGAACCCGAAGCCTGAAAGCAAAGGGGATTTATATGATTGAAAAAGTTCTTTGACATATTGGAAGAA
AAAAACAAAGAGAAGACAACAGTAGAGACGTTTTCTTCTACGGGGAAGGGAACAATACAAAAAGCATCCCTGTACAGCAAAAGGGTACAGGGAGAAAGTAAAGAAAGGACACCGGGG
ATGCTAGGCTCTCAGAGGCGAAGAAGGACGTGATAAGTCTGCGATAAGCACCAGGGATGTCGAAATGAGACTCGATCCGGTATTCCGAATGGGGAACCCGGA

Приложение 2.5. Последовательности частичного гена 16s RNA изолятов, выделенных из клубеньков астрагала хоринского.

Ach-280 (*Mesorhizobium sp.*)

CATGCAAGTCGAGCGCTCGCAGAGGAGCGGACAGCGGGTGAAGTAAACCGTGGGAATCTACCCATCTCTACGGAACAACCTCCGGAAACTGGAGCTAATACCGTATACGCTCTCCGGGAGAAAG
TTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGCCCCAA
ACTCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAAGTGAAGGCGCTAGGTTGTAAGGCTCTTCAACGGTG RAGATAATGACGGT
AACCGTAGAAGAACCCCGCTAATCTGTCGACAGCCGCGTAAATCGAAGGGGGTACGCTTGTTCGAAATTAAGTGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATTGTTAAGTTAGGGGTGAAT
CCCGGGCTCAACCCGGAACCTTAACTACTGGCAATCTCGAGTCCGAGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGTGAATTCGTAGATATTCCGAGGAAACCCAGTGGCGAAGCGG
CTCACTGGCTCGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCGTTAGTCCATGCGCTAAACTAGAGACTAGCCGTCGGCAAGTTTACTTGTGCGTGGCGCA
GCTAACGCATTAAGCTCTCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAACAACTCAAAGGAATTTAGCGGGGGCCCGCAACGCGTGGAGCATGTTGTTAATTCGAAGCAACCGCGAGAACCTTACC
AGCCCTTGACATCCCGTCCGGTTCAGAGATGGTAACTTCACTTCCGGTGGACCGGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGACGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG C
ACACCCCTCGCCCTTAGTTGCGACGATTAAGTTGGGCACTTAAGGGGACTAAGGGGATGATAAGCCGAGAGGAAAGGTGGGATGACGCTCAAGTCTCATGGCCCTACGGGCTGGGCTACACAGT
GCTACAATGGTGGTACAGTGGGCGAGGACCGGAGTTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAAGTTGGAATCGTAGTAAATCGCGGAT
CAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCCGCTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGTGTAACCCGAAGGAGGCGAGGCGACCCAGTGGTACGCGAG
TGGTGAAGT

Ach-301 (*Rhizobium lusitanum*)

TCGAGCGCCCGCAAGGGAGCGGACAGCGGGTGAAGTAAACCGTGGGAATCTACCTTTTTCTACGGAATAACGCAAGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTGCTTCCGGGAGAAAGATTTATCG
GGAAAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGCCCCAACTCTA
CGGGAGGACGAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCTGAGTGAAGGCGCTAGGTTGTAAGGCTTTTCAACCGGAGAAAGATAATGACGGTATCCGGA
GAAGAAGCCCGGCTAATCTGTCGACAGCCGCGTAAATCGAAGGGGGTACGCTTGTTCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGTCAAGGGTGAATCCAGGG
CTAACCCCTGGAACTCTTGTACTGCTGATCTGAGATGATGGAAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAAACCCAGTGGCGAAGCGGCTCACTGG
TCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCGTTAGTCCAGCCGTAACGATGAATGTTAGCCGTCGGGCGAGTACTGTTGCTGGCGAGCTAACGC
ATTAACATTTCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAACAACTCAAAGGAATTTAGCGGGGGCCCGCAACGCGTGGAGCATGTTGTTTAAACGAAGCAACCGCGAGAACCTAACCGCCCT
GACATC

Ach-307 (*Bosea vaviloviae*)

TGCAAGTCGAACGGGATCTTCGGATACTAGTGGCAGACGGGTGAGTAAACCGTGGGAACGTAACCTTTCCGGTTCGGAATAATTCAGGAAACTTGGACTAATACCGGATACGCCCTTCCGGGGAA
AGATTTATCGCGGATAGTACGGCCCGCTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGCCCC
AACTCTACGGAGGACGAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCTGAGTGAAGGCGCTAGGTTGTAAGGCTTTTCCCGGAGAAATAATGACT
GTACCCGGAAGAAATAAGCCCGGCTAATCTGTCGACAGCCGCGTAAATCGAAGGGGGTACGCTTGTTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGACTTAAAGTCCGGGGGTG
AAAGCCAGGGCTCAACCTTGAATTCGCTTCTGACTGAGAGTCTGAGTTTCGGAAGAGGTTGGTGGAACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAAGAACACCGTGGCGAAG
GCGGCCAACTGGTCCGATACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCGTTAGTCCAGCCGCTAAACGATGAATGCCAGCCGTTGGGGTGCATGCACCTCAGTG
GCGCAGCTAACGCTTGAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAACAACTCAAAGGAATTGAGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGCGAGAAC
CTTACCAGCTTTTACATGTCGGTTTGGAGAACAGAGATGTAACCTTTCAGTTCCGCTGGCCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGCTGACGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCTCGCCCTAGTTGCCATCATTAGTTGGGAACCTAGGGGGACTGCCGTTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCCATTCGCTTACAGGCTGGGCTAC
ACAGTGTACAATGGCGGTGACAATGGGCGAGGAGCATCCGGTGTCTAATCCAAAAGCCGTTCAAGTTCAGATTCGCAACTCGAAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAAATC
GTGGATCAGCATGCCAGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCCGCTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGTGCAGTAAACCGCAAGGAGGCGAGGCGACCCAGTGGTAGG
TTCAGGACTGGTGAAGT

Ach-309 (*Mesorhizobium sp.*)

CCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACAGTGGCGAAGCGGCTACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTA
GTCCACGCGTAAACGATGGAAGCTAGCCGTTGGCAAGTTTACTTGTGCGTGGCGAGCTAACGCATTAAGCTTCCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAACAACTCAAAGGAATTCAGCGG
GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTGACATCCCGTTCGCGGTTTCCAGAGATGGATACCTCAGTTCCGCTGGACCGGTGACAGG
TGCTGCATGGCTGCTGCTGAGTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGCCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTTAAAGGGGACTGCCGGTGTAAAGCCGA
GAGGAAGGTGGGATGACGTCGAAGTCTCATGCCCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGCTGCTACAATGGTGGTGCAGTGGGCGAGAGCCGAGGTGAGCTAATCCAAAAGCCATCTCA

GTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTT
TACCCGAAGGCGCTGTGCTACCGCAAGGAGGACAGCGACCCACGGTAGGTTACGCG

Ach-314 (*Mesorhizobium sp.*)

ACGTTCTTCGGGAGAAGATTATCGGAGATGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGG
GACTGAGACACGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAAGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTCAAC
GGTGAAGATAATGACGGTAACCGTAGAAGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGTTCCGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATAC
TTAAGTCAGGGGTGAAAATCCCGGGCTCAACCCGGAAGTGCCTTGTACTGGGTATCTCGAGTCCGGAAGANGTGAAGTGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAA
CACCAGTGCGCAAGGCGGCTCACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGTAGTCCACGCCGTAACGATGGAAGTAGCCGTTGGCAAG
TTTACTTGTCCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGCTTCCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAA
GCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGGTCCGGTTCAGAGATGGATACCTTCAGTTCCGGTGGACCGGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAAGGGGACTGCCGGTATAAGCCGAGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCCATGGCCCTT
ACGGGCTGGGCTACACACGTGTACAATGGTGGTACAGTGGGCAGCGAGACCGCAGGTCGAGCTAATCTCAAAGCCATCTCAGTTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGG
AATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTACCCGAAGGCGCTGTGCTACCGCAAGGAGGACAGCGCA
CCCACGGTAGGTTACGCG

Ach-315 (*Mesorhizobium sp.*)

CAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCTATGAGAGTACCGCTCGGCAAGTTT
ACTTGTCCGGTGGCGAGCTAACGCATTAAGCTCTCCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGATTAAGTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT AATTGCAAGCA
CGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGGTCCGGTTCAGAGATGGTAACCTTCAGTTCCGGTGGACCGGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTTAAGGGGACTGCCGGTATAAGCCGAGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCCATGGCCCTTACCG
GCTGGGCTACACACGTGTACAATGGTGGTACAGTGGGCAGCGAGACCGCAGGTCGAGCTAATCTCAAAGCCATCTCAGTTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATC
GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTACCCGAAGGCGCTGTGCTAACCAGCAAGGAGGACAGCGCAC
ACGGTAGGTCAGCGACTGGGGTGAAGT

Ach-330 (*Mesorhizobium sp.*)

CCGTGGGTCCCTCCTTCCGGTAGCACAGCCCTTCGGGTAACCAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTAATCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTA
GGGATTCCAACCTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGAATCCGAAGTGAAGTGGCTTTTGGAGATTAGCTCGACCTCGCGTCTCGCTGCCACTGTACCACCATTGTAGCACGTGTAGCCCA GC
CCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCTCGGCTTATCACCGGCAAGTCCCTTAGAGTCCCAACTGAATGTGGCAACTAAGGGCGAGGGTTGCGCTCGTTCCGGGACTTA
ACCCAACATCTCACGACAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTACCGGTCAGCCGAAGTGAAGTATCCATCTCTGAAACCCGACCCGGGATGTCAAGGGCTGGTAAGGTTCTGCGCG
TTGCTTCAATTAACCATGCTCCACCCTTGTGCGGGCCCCGCTCAATCTTGTAGTTTAACTTTCGACCGTACTCCACAGCGGGAAGCTAATGCGTTAGTGCACCACGACAAGTAAAC
TTGCCAACGGTAGTCTCCATCGTT

All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology

as a manuscript

Kuznetcova Irina Gennadievna

**NODULE BACTERIA OF RELIC LEGUMINOUS PLANTS OF THE BAIKAL
REGION, THEIR IDENTIFICATION AND COMPLEMENTARY
INTERACTION DURING SYMBIOSIS FORMATION**

Scientific specialty 1.5.11. Microbiology

Dissertation

for the degree of candidate of biological sciences

Translation from Russian

Scientific superadviser:
candidate of of biological sciences
Safronova Vera Igorevna

Saint Petersburg – 2023

CONTENTS

INTRODUCTION.....	165
REVIEW AND ANALYSIS OF SCIENTIFIC AND TECHNICAL AND PATENT INFORMATION.....	169
CHAPTER 1. THE ROLE OF SYMBIOTIC MICROORGANISMS IN PLANT LIFE.....	169
1.1 The role of symbiosis in the evolution of living organisms	169
1.2 Diversity of mutualistic plant-microbe symbioses	170
1.3 Legume-rhizobial symbiosis	172
1.3.1 Evolution of legume-rhizobial symbiosis	172
1.3.2 Microorganisms involved in the formation of symbiosis with legumes	173
1.3.3 The development of legume-rhizobial symbiosis	175
1.3.4 Specificity of legume-rhizobial symbiosis	177
1.3.5 The importance of legume-rhizobium symbiosis in agriculture.....	178
CHAPTER 2. APPROACHES AND METHODS TO DETERMINE TAXONOMIC RELATIONSHIPS AND PHYLOGENETIC RELATEDNESS OF MICROORGANISMS	180
2.1 Approaches to defining taxonomic relationships.....	180
2.2 Determination of phylogenetic relationship of microorganisms	183
2.2.1 Determination of genetic similarity by gene sequencing	183
2.2.2 Multilocus sequence analysis (MLSA).....	184
2.2.3 Analysis of DNA profiles obtained by restriction of total DNA	185
2.2.4 Whole-genome sequencing.....	186
2.2.5 Determination of genome similarity by DNA reassociation	188
2.2.6 Average Nucleotide Identity (ANI) method	188
CHAPTER 3. RELICT LEGUMES AND THEIR MICROSymbionTS.....	191
3.1. The Baikal region as a centre of plant genetic diversity	191
3.2. Genetic research on microsymbionts of relic leguminous plants	195
SECTION CONCLUSIONS.....	198
SCIENTIFIC AND EXPERIMENTAL PART.....	199
CHAPTER 1. MATERIALS AND RESEARCH METHODS	199
1.1 Plant and soil material	199
1.2 Isolation and cultivation of microorganisms.....	200
1.3 Identification of microorganisms	201
1.4 Vegetation experiments.....	205
1.4.1 Vegetation method for the detection of symbiotic rhizobia in the soil	205
1.4.2 Plant experiments to study the symbiotic phenotype	206
1.5 Obtaining fluorescently labeled strains using the electroporation method.....	207

1.6 Confocal microscopy	208
CHAPTER 2. RESEARCH RESULTS	209
2.1 Genetic diversity of microsymbionts of relict leguminous plants	209
2.1.1 Species diversity of microsymbionts of the <i>Lathyrus humilis</i> (Ser.) Spreng	209
2.1.2 Species diversity of microsymbionts of the <i>Hedysarum gmelinii</i> Ledeb. subsp. <i>setigerum</i> (Turcz. ex Fischer et Meyer) Kurbatsky	216
2.1.3 Species diversity of microsymbionts of the <i>Oxytropis triphylla</i> (Pall.) Pers.	223
2.1.4 Species diversity of microsymbionts of the <i>Oxytropis popoviana</i> Peschkova.....	233
2.1.5 Species diversity of microsymbionts of the <i>Astragalus chorinensis</i> Bunge	243
2.2 Symbiotic genes of isolates.....	247
2.3 Symbiotic gene complementations, efficiency, and host specificity of isolates	249
SECTION CONCLUSIONS.....	263
CONCLUSION	265
REFERENCE LIST.....	268
SUPPLEMENT 1 (Additional information)	287
SUPPLEMENT 2 (Sequences).....	295

INTRODUCTION

The problems of relationships between higher plants and soil microorganisms are among the most interesting and, at the same time, difficult to study. It is known that legumes are able to symbiosis with nitrogen-fixing nodule bacteria (rhizobia). The formation of such mutually beneficial symbiosis leads to the acquisition of new adaptive properties by the plant-microbe system, which increase its productivity, stress tolerance, and help it to compete successfully in the struggle for ecological space. From the host plant, photosynthesis products enter the nodules, which are a source of carbon for bacteria (an essential nutrient). And from the nodules to the aerial part of the plant, the products of nitrogen fixation come, which are necessary for the plant to increase its biomass.

The mobilisation of natural resources in agrophytocenoses through plant-microbe interactions is one of the main areas for the development of ecologically sustainable farming. Legumes are most suited to the modern requirements of ecological equilibrium formation. They enter into a multicomponent symbiosis with different groups of useful soil microflora, which allows not only to improve soil properties, increase the yield and its quality, but also makes them a valuable precursor in crop rotations. In this regard, the search and practical application of new microorganisms with properties that will increase the economic efficiency of legume crop cultivation is promising [80]. It is known that symbiosis efficiency on the part of nodule bacteria depends on a number of symbiotic properties, which are determined by the presence or absence of symbiotic genes (Sym genes). Therefore, when carrying out scientifically sound selection and creation of highly effective plant-microbial agrosystems, it is also worth paying attention to the "quality" of the Sym - microsymbiont gene set and the possibilities of its modification or complementation.

We decided to focus our attention on symbiotic systems involving relic legumes. They are remnants of ancestral groups widespread in past geological epochs and are of great scientific value, as they are a model of evolutionarily earlier plant-microbe relationships. They are characterized by low specificity in the choice of symbiotic

partners, in contrast to evolutionarily younger legumes, which exhibit high selectivity up to absolutely strict specificity. Probably, the microsymbionts of relic plants themselves have a wide range of host plants and differ in symbiotic gene sets from the forms with narrow host specificity.

The Baikal region was chosen as the place of the expeditions, because the varied natural landscapes and heterogeneous climatic conditions made it possible to form here a rich flora, which contains quite a few unique species, endemics and relics. In addition, in the Baikal region the problem of formation, conservation and sustainable use of biological resources is very relevant, since Baikal is a unique area of the Earth, which is included in the list of UNESCO World Heritage Sites [46].

Purpose and objectives of the study. The aim of the work was to study the genetic and taxonomic diversity of relic legume microsymbionts of the Baikal region and their ability to complementary interaction during of a multicomponent symbiosis formation.

Research objectives:

1. to create a collection of microsymbiont strains of relic leguminous plants from different tribes of the subfamily *Papilionoideae* Rudd., growing in the Baikal region;
2. to study the genetic diversity of isolated microbial strains and determine their taxonomic position;
3. full genome sequencing of the studied microsymbiont strains isolated from the same nodule and belonging to different taxa; characterization of gene systems responsible for symbiosis formation and functioning;
4. determination of complementary interaction during joint plant inoculation by microsymbionts possessing complementary gene sets involved in symbiosis formation and functioning.

Scientific novelty of the study. For the first time, bacteria colonizing nodules of relic legumes of *Lathyrus humilis* (Ser.) Spreng, *Hedysarum gmelinii* Ledeb. subsp. *setigerum* (Turcz. Ex Fischer et Meyer) Kurbatsky, *Oxytropis triphylla* (Pall.) Pers., *Oxytropis popoviana* Peschkova and *Astragalus chorinensis* Bunge from the Baikal region. In the course of the study, unique information about their microsymbionts was

obtained. The effect of taxonomically different strains colonizing the same nodules on the symbiosis efficiency and the rate of nodule formation was determined in the growing experiments. A genome-wide study of microsymbiont strains of relic legumes was carried out. The gene systems responsible for the formation of plant-microbe relationships were analyzed. The conclusions on the ways of nitrogen-fixing symbiosis evolution and complementation possibilities of strains belonging to different rhizobial taxa are presented.

Scientific and practical significance of the work. A study of the unique genetic material of the collection:

- 1) will contribute to the development of ideas about the evolution of plant-microbe symbiosis;
- 2) will improve the systematics of nodule bacteria, which are one of the most important and agronomically valuable groups of soil microorganisms;
- 3) will identify rhizobia genomes that possess complementary sets of genes involved in complementary tasks during symbiosis formation and functioning;
- 4) will enable the selection of rhizobia combinations that can be used as the basis for the production of complex microbial preparations or the targeted genetic construction of strains promising for agriculture.

The statements made for the defence:

1. The taxonomic position of nodule bacteria of five relic legumes from different tribes of the subfamily *Papilionoideae* Rudd: *Lathyrus humilis* (tribe *Fabeae* Rchb.), *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum* (tribe *Hedysareae* DC.), *Oxytropis triphylla*, *Oxytropis popoviana* and *Astragalus chorinensis* (tribe *Galegeae* Dumort) from the Baikal region.

2. A new species of nodule bacteria *Phyllobacterium zundukense* (*Phyllobacteriaceae*, order *Rhizobiales*) isolated from the nodules of *Oxytropis triphylla* (Pall.) Pers.

3. Microsymbionts of relic legumes have a wide range of host plants, including various species and genera of legumes from the tribes *Galegeae* Dumort (*Astragalus* L., *Oxytropis* DC., *Glycyrrhiza* L.) и *Trifolieae* (Bronn) Endl. (*Trifolium* L.).

4. The phenomenon of complementary interaction between taxonomically different strains occupying the same nodules, which leads to a new symbiotic phenotype different from the one formed by each of the strains separately, is described.

Degree of validity and approbation of the work. The degree of reliability of the research results was achieved by sufficient experimental data, statistical processing and identification of the reliability of differences.

The thesis materials were presented at the school-conference for young scientists "Ecological genetics of microbial-plant interactions" as part of the international scientific conference PLAMIC 2018, at the meetings of the Scientific Council of ARRIAM in 2019, 2021. Dissertation materials published in 7 articles. Research was supported by grants from the Russian Science Foundation: grant 16-16-00080 for microbiology, molecular and bioinformatics; grant 17-76-30016 for nodule and plant photography; grant 17-14-01363 for fluorescent-labeled strains; grant 14-26-00094 for vegetative experiments and symbiotic gene research.

Prolonged storage of isolates in the Russian Collection of Agricultural Microorganisms (RCAM) was supported by the Federal Agency of Scientific Organizations (Bioresource Collection Development and Inventory Program).

Author's personal contribution. The postgraduate has independently performed a patent and information search and analysis of scientific literature. Together with the supervisor formulated the goal and objectives of the study, developed the research program and the necessary methods for its implementation. The author directly participated in isolation and identification of strains; cryopreservation; staging, conducting and analyzing the results of vegetation experiments.

The scope and structure of the work. The thesis consists of a table of contents, the text of the thesis, which includes an introduction, two sections: review and analysis of scientific and technical and patent information and the main part; conclusion and 2 supplements. The materials of the dissertation are presented on 146 pages of typewritten text and contain 14 tables and 21 figures. The bibliography includes 207 sources, including 80 domestic and 127 foreign ones.

REVIEW AND ANALYSIS OF SCIENTIFIC AND TECHNICAL AND PATENT INFORMATION

CHAPTER 1. THE ROLE OF SYMBIOTIC MICROORGANISMS IN PLANT LIFE

1.1 The role of symbiosis in the evolution of living organisms

The term "symbiosis" (from the Greek "symbiosis") means cohabitation, living together. It was coined by the German botanist and microbiologist G. A. De Bary in 1879. He defined symbiosis as the phenomenon of cohabitation of dissimilar organisms. Drawing attention to the fact that the relationship between such organisms may differ significantly in the nature of interaction. To be both mutualistic and antagonistic [56, 80]. The degree of dependence on each other may also vary and range from strictly obligate to facultative. Symbionts may be differently situated in space: one may reside inside the cells of the other, on its surface, or have no direct contact at all [52]. In addition, the nature of the relationship between partners in symbiosis may change during life or depend on certain conditions of their existence [22].

At the beginning of the twentieth century, Russian scientist K.S. Merezhkovsky proposed the theory of symbogenesis. On its basis, a new system of the organic world was created, in the development of which symbiosis plays a major role [42, 75]. According to the author of the theory: "only one kingdom, prokaryotes, is not the result of symbiosis, but represents the direct development of originally appeared organisms in the form of primary bacteria. The other two kingdoms, plant and animal, are the result of symbiosis; animal is the result of simple symbiosis and plant is the result of double symbiosis" [42, 61]. The symbiotic origin of mitochondria and plastids has now been proven. Thus, many researchers believe that symbiosis induces great changes and determines the formation of new life forms [105, 130, 144, 156].

Within the framework of the currently developing concept of symbiogenetics, symbiosis refers to biological complexes that arise due to functional and, at times, structural integration of gene systems of unrelated organisms. As a result of a new "supra-organismal" genome, symbiotic partners can implement new developmental programs and manifest adaptations that are inaccessible to free-living organisms [52].

Thus, it can be assumed that symbiosis is a more powerful engine of evolution than competition. And its importance for the life and development of all organisms living on the planet is undeniable.

1.2 Diversity of mutualistic plant-microbe symbioses

Microorganisms, can affect their host in different ways. Some bacteria can inhibit their development, causing disease (antagonism or pathogenesis), others, on the contrary, have a positive effect (mutualism). Mutualism is the cohabitation of two different organisms in which both entrust to each other the task of regulating their relations with the external environment; depending on the nature and depth of these relations, they may or may not take on a metabolic character, but they are always necessary [17]. Mutualistic symbioses are usually subdivided into trophic (microorganisms provide plant nutrition, primarily nitrogen and phosphorus) and protective (bacteria provide plant resistance to phytopathogenic microbes or phytophagous animals). Taxonomically, microsymbionts are very diverse, being representatives of all the major groups of bacteria and fungi [52].

Four basic forms of mutualistic interaction between higher plants and microorganisms are commonly noted in the literature. The first, associative form, is based on the interaction between plants and microorganisms, which are concentrated in rhizosphere (the zone surrounding roots) and cover the root surface. The metabolism of the roots influences the soil environment, because the exosmosis products contain various substances (sugars, amino acids, vitamins etc.). At the same time, the various processes that take place in the rhizosphere with the participation of free-living microorganisms determine the course of plant development. The mechanisms of microbial action on plants

are different. These can be synthesis of various metabolites: phytohormones, plant growth inhibitors, antibiotics, etc. Many free-living bacteria are capable of fixing nitrogen from the atmosphere and can control the supply of mineral elements from the soil to the root. The list of microorganisms that are capable of associative nitrogen fixation is constantly being updated with new species. Currently, it is believed that 80-90% of all known bacteria are capable of nitrogen fixation [2, 31, 72]. The most active and frequent diazotrophs on plant roots include species: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Campylobacter* [2]. The diversity of bacterial communities in the root zone and rhizoplane (the zone of microorganisms developing directly on the plant roots) is determined by the qualitative and quantitative composition of root excretions, which depends on the species, age and growing conditions of plants [25].

The second type of mutualistic interaction is observed between plants and epiphytic microorganisms. Bacteria populate the above-ground parts of plants, utilise their secretions and participate in the decomposition of dead residues. They are an integral part of the plant's cenosis. Sporogenic and pigmented species, the spores of various mould fungi and yeasts are the most common as they are most resistant to drying out and UV-rays.

The third type of relationship is mycorrhiza, a close association of roots with fungi. Mycorrhizae are "a whole group of symbioses, very heterogeneous in taxonomic, genetic and molecular terms" [66]. Arbuscular mycorrhiza is thought to be the oldest. It appeared about 400-450 million years ago, and the symbiosis between legumes and rhizobia was formed only 60-70 million years ago. Fungi provide nutrients to the host, increase plant resistance to phytopathogens and abiotic stresses, and some regulate macrosymbiont development. In addition to nutrition and protection, mycorrhizal fungi unite plants of different species in phytocenoses through a unified hyphal network and participate in the formation of soil structure [66, 73].

The fourth type of relationship is a mutually beneficial symbiosis between legumes and a group of nitrogen-fixing nodule bacteria. By penetrating into the root tissue of the

host plant, they cause an increased division of its cells, which leads to the formation of nodules. The symbiotic partners are connected by the vascular system of the nodule: the plant supplies the bacteria with carbohydrates and mineral salts, while the bacteria give up to 70% of the nitrogen assimilated by them to the plant. The nodules formed on the roots of perennial plants can be active for many years, while in most annual legumes the nodules die during flowering of the host plant. After destruction of the nodule, the bacterial cells enter the soil and become saprophytes like other soil organisms. Bacteroides, which have lost the ability to transform into free-living cells, are an exception [37, 66].

1.3 Legume-rhizobial symbiosis

1.3.1 Evolution of legume-rhizobial symbiosis

Based on the analysis of a wide range of experimental and mathematical models, Provorov N.A. et al. proposed an integral scheme of bean-rhizobial symbiosis (BRS) evolution including four stages: ancestral intercellular symbiosis, primitive extracellular mutualism, intracellular mutualism and altruistic type symbiosis.

In the first stage, endosymbiotic rhizobia populations were mixed and consisted of N₂-fixing and non-fixing strains. They penetrated into the plant root through breaks in the epidermis. The most likely candidates for the role of "primary" rhizobia were bacteria with close relatives among free-living nitrogen fixers (presumably related to genera *Rhodopseudomonas* and *Azospirillum*) [54, 55].

At the second stage, the bacteria acquired the ability to synthesize Nod-factors. A new pathway for rhizobia cell penetration through "twisting" of root hairs emerged. The stage is characterized by the emergence of clonal populations which were in infectious threads [54, 55].

The third stage saw the emergence of the bacteria's ability for intracellular symbiosis. Bacteroides were poorly differentiated and retained reproductive ability. N₂

fixation took place in unspecialised symbiosomes. As a result of the horizontal transfer of symbiotic genes to other, unrelated species, the epiphytic (*Phyllobacterium*) or phytopathogenic (*Agrobacterium*) bacteria, and then the "secondary" rhizobia (*Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*) which already had the gene system, providing symbiosis, assembled in a separate plasmid, appeared [54, 55]. However, the belonging of rhizobia to hundreds of species, limited to a dozen genera of *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria*, suggests infrequent successful transfer between genera, but frequent successful transfer within genera.

The fourth stage is characterized by the formation of irreversibly differentiated bacteroides from "secondary" rhizobia. They are incapable of reproduction, differ in morphology and have high nitrogenase activity. N₂ fixation occurs in specialized symbiosomes [54, 55].

Thus, the evolution of symbiosis went in the direction of symbiotic gene collection in one organism, strain specialization and increasing the ecological efficiency of the relationship.

1.3.2 Microorganisms involved in the formation of symbiosis with legumes

The first scientific explanation for the ability of legumes to improve soil properties was given by one of the most eminent french agrochemists, J. - B. Boussingault. He suggested that legumes could absorb nitrogen from the air. However, only decades later, the german scientist H. Hellriegel found that legumes were helped to assimilate nitrogen by bacteria that developed on their roots [61]. In 1888, M. Beijerinck isolated the cells of nodule bacteria in pure culture. They were originally named *Bacillus radicicola* by M. Beijerinck, but in 1895 B. Frank suggested a new generic name for them, which has been retained in the modern taxonomy - *Rhizobium* [61, 66].

Rhizobia are Gram-negative bacteria characterized by polymorphic forms. They are mainly bacilliform and oval microorganisms, although cocciform, filtering forms and L-forms occur. They can be motile or immobile. Fast-growing nodule bacteria are

characterized by a peritrichal arrangement of the flagella, while slow-growing ones are monotrichal. They reproduce by division, and with age may proceed to budding. Colonies rounded, convex, translucent, raised, slimy (characteristic of fast-growing ones). They grow well on agar with yeast extract, mannitol and mineral salts [71].

The systematics of rhizobia has long been based on host specificity to different legume species. The classification of L. M. Dorosinskii (1965), based on cross-inoculation and a number of morphological and cultural properties of nodule bacteria, is generally accepted. Modern methods of taxonomy are based on determining the phylogenetic relationship between different groups of microorganisms (genosystematics) and may not always coincide with the results of traditional classification [4]. Thanks to the emergence of new methods that improve the genetic and phenotypic characterisation of strains (DNA-DNA hybridisation, RFLP analysis and genomic fingerprinting techniques, "housekeeping" gene sequencing, multi-substrate testing, etc.), a huge diversity of rhizobia has been discovered. Currently, bacteria capable of forming nodules on legumes belong to two classes of proteobacteria, the orders *Rhizobiales* (class *Alpha-proteobacteria*) and *Burkholderiales* (class *Beta-proteobacteria*) and include members of seven families: *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Burkholderiaceae*, *Brucellaceae* and *Hyphomicrobiaceae* [5].

The genus *Rhizobium* (family *Rhizobiaceae*), which previously included all known nodule bacteria, has the greatest number of nodule species. However, some species were subsequently transferred to other taxa based on phylogenetic analysis and now the genus *Rhizobium* contains only 49 species [7]. The family *Phyllobacteriaceae* is represented by two genera containing nodule bacteria: *Phyllobacterium* and *Mesorhizobium* (includes more than 30 species of nodule bacteria). The family *Hyphomicrobiaceae* also contains 2 genera, *Azorhizobium* and *Devosia*, which include nodule bacteria. The family *Bradyrhizobiaceae* contains one genus with nodule-forming bacteria, *Bradyrhizobium* (includes 9 species of nodule bacteria). The family also includes genera such as *Bosea*, *Tardiphaga*, whose species may be present in the nodules of legumes, but do not form them independently. Although in 2020, Hordt et al. proposed the creation of a new

Boseaceae fam. nov. family, where the genus *Bosea* should be included [134]. Two genera containing nodule bacteria, *Methylobacterium* and *Microvirga*, have been described in the family *Methylobacteriaceae*. The *Beta-proteobacteria* in the family *Burkholderiaceae* include two genera, *Burkholderia* and *Cupriavidus* (*Ralstonia/Wautersia*) [5, 88, 106, 107, 108].

A complete list of nodule bacteria can be found on the website of the International Code of Nomenclature for Bacteria LPSN (<http://www.bacterio.cict.fr>), overseen by Dr Euzéby J.P. A New Zealand site of modern rhizobia taxonomy (<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>), created by Dr Weir B.S. The sites are regularly updated and supplemented [5].

1.3.3 The development of legume-rhizobial symbiosis

Many scientists are studying the process of nodulation in legumes. A considerable amount of material has now been accumulated on this subject. The process of symbiosis development includes three main stages - pre-infection; infection and nodulation; and nodulation functioning [16, 66]. At the first stage, the partners recognize each other: the plant produces characteristic flavonoids that activate the virulence genes (Nod genes) of rhizobia. Nod-genes encode the synthesis of lipo-oligosaccharides (Nod-factors), which cause a response in the host plant: curling of root hairs and initiation of cell division in pericycle, inner and outer layers of root cortex [66].

The second stage involves the processes of infection and nodule development. At the site of root hair bending, the cell wall is destroyed by pectolytic enzymes of the plant. The bacteria are trapped inside a special cavity, the infection filament. Its walls are formed by the plant cells and the inner space is filled with a matrix, in the formation of which both partners are involved. Parallel to the development of the infectious filament, the nodule primordium is laid, where the formation of the nodule tissue and the apical meristem begins. After the infectious filament has reached the base of the root hairs and penetrated into the growing nodule, the bacteria will become intracellular symbionts by

endocytosis. The distal parts of the infectious filaments are converted into infectious droplets devoid of a cell wall. These, in turn, are released into the plant cytoplasm in the form of membrane vesicles and become bacteroides. The membrane is then transformed into a peribacteroidal membrane (PBM), synthesised mainly by the plant cell and partly by rhizobia. Bacterial cells surrounded by a common membrane are called symbiosomes and are the main structural and functional unit of symbiosis, which are also called temporary organelles responsible for nitrogen fixation [16, 66].

This process results in the formation of nodules on the surface of the roots. The morphology and number of nodules is strictly determined by the host plant, as it is associated with high energy expenditure. On the plant side, the important traits for selection are "nitrogen-fixing activity (rate of N_2 reduction into NH_4^+) and symbiotic efficiency (ability of plants to develop intensively, using symbiotrophic nitrogen nutrition, which depends on compatibility of partners' metabolic systems and absence of active protective reactions from the plant to rhizobia penetration)" [4].

The efficiency of nitrogen fixation in nodule bacteria depends on a number of symbiotic traits, which include virulence, nitrogen-fixing activity, competitiveness and specificity [16].

At the molecular level, the efficiency of legume-rhizobial symbiosis is determined by the presence of symbiotic genes (*Sym* genes) in microsymbionts. These genes are divided into groups depending on the function performed. For example, *Nod* genes are responsible for the biosynthesis, modification or secretion of Nod-factors. *Nif* genes encode the synthesis of the nitrogenase complex and regulate its activity. *Fix* genes work together with *nif* genes and also play an important role in symbiotic nitrogen fixation [19]. *Sym* genes can be located on chromosome segments bounded on both sides by IS-like elements (symbiosis islands), or as part of large plasmids (symbiotic plasmids). Due to this arrangement, symbiotic genes can easily be involved in horizontal gene transfer processes. Mobile genetic elements (IS elements, transposons, integrons, plasmids) play a central role in this process; gene transfer can take place both between strains within the same species and between different species, genera, families or even higher taxa. This

process results in new strains of nodule bacteria, which may differ in their symbiotic characteristics [19].

1.3.4 Specificity of legume-rhizobial symbiosis

Specificity should be understood as "the ability of unrelated organisms to recognize symbiosis partners capable of providing a trigger for an interaction program that does not function in the absence of an adequate partner" [18]. At the molecular level, the specificity of legume-rhizobia symbiosis represents the exchange of signals between partners. By now, most of the genes involved in the process of nodulation and synthesis of signaling molecules are well studied [18, 62]. There are common genes (homologous) that can be found in all rhizobia capable of nodulation: *nodA*, *nodB*, *nodC*. They control the synthesis of the bark part of the Nod-factor. There are genes that differ in different species or strains (host specificity genes): *nodP*, *nodQ*, *nodH*, *nodF*, *nodE*, *nodL* etc. These genes encode enzymes involved in fatty acid residue synthesis and modifications of the chitooolyl-saccharide base. The *nodD* gene, the only rhizobia virulence gene that works constitutively, is identified separately [41]. It is the only gene with the properties of a plant signal receptor. The other *nod* genes encode the synthesis of enzymes involved in Nod-factor synthesis. The Nod-factor structure determines the specificity and nature of interaction of bacteria with the plant root system [41, 66].

Most of the bacterial genes involved in nodule formation are selective in relation to the host. These genes are responsible for the interaction of a particular rhizobia species or strain with specific plant species or cultivars. Two types of host specificity are distinguished, broad and narrow, which are determined by the structure of the acyl chain and modifications to the oligo-chitin base of the Nod-factor. Species with broad specificity are more ancient in terms of evolution. The emergence of fast-growing species with narrow host specificity was characterised by the appearance of additional genes. Some are responsible for the synthesis and attachment of polyunsaturated fatty acids (for example, *nodEF* genes). Others are associated with modifications of the chito-

oligosaccharide backbone. For example, the presence of *nodP*, *nodQ* and *nodH*, which are responsible for chain sulphation at a specific location, is important for *S. meliloti* interaction with alfalfa. The *nodX* gene (encoding acetylation) is required to form a symbiosis between *R. leguminosarum* bv. *viciae* and 'Afghan' pea lines. However, this gene can be replaced by the *nodZ* gene responsible for another chemical modification (fucosylation). This suggests that plant receptors recognising Nod-factors are polyvariant [62, 66]. The role of such receptors is played by plant gene products. The most likely candidates are Nod-factor-receptor-like kinases containing LysM domain which can participate not only in bacterial signal perception but also in the organization of bacterial penetration into the root. Another receptor-like kinase (receptor-like kinases, RLK) is rich in leucine repeats and its activity is also required for symbiosis with rhizobia [18, 66]. Since symbiotic specificity is determined by the recognition and signalling of both partners, they should be studied together.

Microbial surface compounds, which include exopolysaccharides, lipopolysaccharides, capsular polysaccharides, cyclic β -glucans, etc., play an equally important role in establishing symbiotic relationships. They are responsible for the dialogue between rhizobia and plant defence systems. It is likely that the interaction of rhizobial exopolysaccharides with plant lectins is also related to the specificity of rhizobia with respect to the host plant. It is believed that signals from both groups (Nod-factors and surface signaling compounds) are required for normal symbiosis development [14, 66].

Thus, research on the nature of receptors and genetic control of specificity of micro- and macrosymbiont interaction allows scientifically sound selection of the most effective pairs, selection to increase the specificity of interaction and increase the yield.

1.3.5 The importance of legume-rhizobium symbiosis in agriculture

Today, special attention is paid to ecological rationality, which includes the development and practical application of technologies, methods and means to obtain

environmentally safe food products, including crop and livestock products. Symbiotic nitrogen fixation is one of the most important factors in the development of ecologically balanced agricultural systems [67].

Legumes (Fabaceae), capable of symbiosis with soil nodule bacteria, number more than 1500 species and make up a significant part of forage and food crops grown in the world. They account for more than 25% of global crop production. Their ability to symbiotic nitrogen fixation allows legumes to be grown as green manure to improve nitrogen fertility and the chemical and physical properties of the soil, thereby reducing the pollution of the environment by mineral nitrogen applied as fertilizer. In addition, the use of legumes for forage purposes allows increasing their role in the formation of sustainable agro-ecosystems, and the high oil content in the seeds of some species (*Glycine max* L. Merr., *Pongamia pinnata* L.) consider them as potential sources of biological fuel [15, 67].

Thus, legumes, due to their wide range of applications and their ability to use the resources of symbiotic microorganisms, are most consistent with the concept of adaptive farming. Therefore, the study of plant-microbe symbioses and the creation of highly efficient systems, with maximum plant productivity potential, are important for adaptive agriculture [18, 81].

The accumulated scientific results on the mechanisms of legume-rhizobial symbiosis also allow us to raise the question of the possibility of creating a nitrogen-fixing apparatus based on symbiosis in non-legume plants, especially in cereals [15].

CHAPTER 2. APPROACHES AND METHODS TO DETERMINE TAXONOMIC RELATIONSHIPS AND PHYLOGENETIC RELATEDNESS OF MICROORGANISMS

2.1 Approaches to defining taxonomic relationships

Microbial systematics is the distribution of microorganisms into groups (taxa) according to their origin and biological similarity [16, 36]. The main issues addressed by taxonomy are classification, identification, and nomenclature. Classification deals with the distribution of organisms into taxonomic groups according to their similarities and affinities. Nomenclature defines the names of taxonomic groups according to international rules. Identification is the process of establishing the taxonomic position of a new microorganism [62].

Currently, several basic methods are used in microbiology for classification.

Numerical approach. Numerical taxonomy is based on the principles proposed by the french botanist M. Adanson (1727-1806): the equality of all characters; study of the maximum possible number of characters; and determination of the degree of similarity by the number of matching characters. The degree of similarity is expressed in the form of similarity coefficient and is calculated in pairs as the ratio of the number of similar features to the total number of studied features. The value of the similarity coefficient can vary from 1 (complete identity) to 0 (no match in any of the studied features). The data are arranged in a similarity matrix. A dendrogram is then constructed based on the numerical relationships between them. Numerical taxonomy provides an objective and stable basis for the creation of taxonomic groups, allows a thorough study of phenotypes, but, unlike phylogenetic taxonomy, does not allow additional conclusions concerning the evolution of organisms [36].

There are also several other disadvantages of the numerical approach. Firstly, there is the subjective choice of tests for identifying traits. It is not possible to use the same traits to identify different groups of microorganisms. Secondly, the number of features

tested is only a small fraction of the information contained in the genome. Third, "equal" traits (in terms of this systematics) carry an unequal amount of genetic information. Also, the value of the similarity coefficient may change by increasing (when new similar traits are found) or decreasing (when the number of mismatched traits increases) [36].

Chemotaxonomic approach. The chemotaxonomic taxonomy developed by E. S. Smirnov (1969). The construction of this taxonomy was based on the results of studying physiological and biochemical characteristics, as the most common method for establishing the taxonomic affiliation of microorganisms under study. "Chemotaxonomic" methods involve the use of analytical methods in the collection of information relating to the various chemical constituents of the cell to classify bacteria [36]. Systematics, based on the study of these characteristics, has gained new prospects in recent years with the development and practical implementation of rapid tests for enzymatic activity, allowing to make the procedure of detection and identification of microorganisms faster, more convenient, sensitive, and specific. The basis of such systems is multisubstrate testing technology. A culture grows in the presence of different substrates with the addition of a redox indicator, which changes colour in response to the metabolic activity of the cells. Substrates commonly chosen are sources of basic nutrients (carbon, nitrogen, phosphorus, etc.) and physiologically active substances (antibiotics, vitamins, hormones, etc.). As well as substances affecting medium acidity or osmotic properties, intermediates of major metabolic pathways, etc. Identification of bacteria is performed using computer software by comparing the reactions of the microorganism under study with the reactions of indicator bacteria stored in the database for a given test [20, 63].

BioLog's advanced phenotypic technology identifies the microorganism at the species level and, unlike molecular methods, provides additional information about the properties of strains. BioLog's carbon disposal technology identifies microorganisms by creating a characteristic pattern or 'metabolic fingerprint' of chemical reactions carried out in a 96-well microplate. Culture suspensions of a certain concentration are digested in special plates (there are 7 different substrate arrangements), incubated, read and the

resulting phenotypic profile is compared with the corresponding database. There are three concepts within the ideology: ID MicroPlate™, EcoPlate™ and Phenotype MicroArrays™. About 2900 species of bacteria, yeasts and mycelial fungi can be identified using this technology [20].

Modifications of this method have now been developed, which differ in the sets of organic substrates that, according to the authors, are most likely to be found in natural conditions. For example, the Ecolog system developed by M.V. Gorlenko and P.A. Kozhevnikov helps to determine the spectrum of organic substrates used by microorganisms and makes it possible to calculate the amount of substrates consumed [27]. The method can be used to assess soil quality, type and degree of impact of adverse factors on soil habitats. Use when monitoring soil conditions and developing remediation methods.

The multi-substrate testing method can be used as a high-tech and efficient method of identifying microorganisms, as well as for determining the physiological properties of known species or when describing new ones.

Genetic approach. Genosystematics (or molecular systematics) assesses the relatedness of organisms based on the similarity or difference of their genomes. The application of the molecular biology approach makes it possible to compare distant organisms that may not share phenotypic traits at all [68].

The genetic material of any organism contains information on the entire variety of properties of that organism, including the characteristic species traits that underlie classification and identification systems. Genes encoding these biological characteristics (structural components of cells; components of cell membranes; synthesis of enzymes performing certain biochemical reactions; synthesis of toxins, characteristic products of metabolism; structure and composition of antigens, etc.) have a strictly defined nucleotide sequence unique to each microorganism, which can serve as a diagnostic marker and is used to detect and identify microorganisms. In contrast to biochemical and immunochemical test systems that investigate the products of reading genetic information (gene products), identification of microorganisms using DNA diagnostics is based on the

presence or absence of specific genes and their fragments, and the uniqueness of their structure in each microorganism [13].

PCR and nucleic acid hybridization methods are the basis for the genosystematics of microorganisms [74, 149, 157].

2.2 Determination of phylogenetic relationship of microorganisms

2.2.1 Determination of genetic similarity by gene sequencing

"Sequencing of nucleic acids is the determination of their nucleotide sequence. Sequencing results in a formal description of the primary structure of a linear macromolecule in the form of a sequence of monomers in text form" [74].

The nucleotide sequences of ribosomal RNA (rRNA) are most frequently used to identify bacteria and create a phylogenetic system for their classification. The choice of these genes is primarily due to the specific structure of rRNA molecules and their ubiquitous distribution throughout the living world. The 16S and 23S rRNA molecules contain sites of the highest genetic stability and evolve only by the process of spontaneous mutation, which occurs at a constant rate. The accumulation of mutations is only time-dependent. Thus, information on the nucleotide sequence of these molecules is the most objective for determining the phylogenetic relatedness of organisms from subspecies to kingdom [48]. However, to obtain accurate results, one should not limit oneself to the study of a single genetic locus, even a very informative one. In such cases, the intergenic transcribed region (ITS) and the 23S rRNA gene (which is about 2-fold longer and contains several highly variable regions) can be amplified and sequenced. Thus, profiles of DNA fragments characteristic of a specific taxonomic group of microorganisms can be obtained [48, 62].

The "housekeeping" genes *dnaA*, *recA*, *rpoD*, *gyrB*, *hsp60*, and others are also used as phylogenetic markers for classifying and identifying microorganisms [195]. However, determining the taxonomic position of an isolate by analyzing the sequences of various

genes can give ambiguous results due to the fact that the completeness of the databases of the marker gene sequences of various microorganisms is rather low.

2.2.2 Multilocus sequence analysis (MLSA)

At present, the method of microbial identification based on multilocus (multigenomic) genome analysis is widely used. The method of multilocus sequence analysis MLSA (multilocus sequence analysis), is a development of the method of multilocus sequencing MLST (multilocus sequence typing), proposed by Maiden et al. in 1998 for microbial typing in molecular epidemiology. The method is based on establishing the nucleotide sequence of small fragments (about 500 pairs of nucleotides) of a number of genes and the subsequent comparison of the corresponding sequences in different organisms. In multilocus sequencing, the most common genes analyzed are "housekeeping" genes, which are essential for the course of basic metabolic reactions and are therefore present in all organisms. These genes are important for the viability of the organism and are characterized by a relatively low rate of mutation accumulation, many of which are selectively neutral. In this regard, comparison of the nucleotide sequences of such genes makes it relatively easy to establish the degree of phylogenetic relatedness between populations and systematize them. The number of loci analyzed in each specific study may vary, but most often it is 7-8. Such a number provides sufficient resolution capability of the method and at the same time does not require much labor, time, and money for analysis [195]. The MLSA method can be successfully used to separate closely related microorganisms when the 16S rRNA gene alone is insufficient. For example, it has already been shown that the phylogeny *atpD* and *recA* loci for legume microsymbionts corresponds to that for the 16S rRNA gene [124]. Also, the method of multilocus analysis was successfully applied in the identification and systematics of a new rhizobial genus and species *Tardiphaga robiniae*, where 5 "housekeeping" genes were used [91]. In many studies, MLSA has been recommended as a promising

intermediate method to replace DNA hybridization in species identification. Nevertheless, the method still needs clear recommendations and improvements [127].

2.2.3 Analysis of DNA profiles obtained by restriction of total DNA

There are several approaches for determining genetic distances based on restriction analysis.

For PDRF analysis (restriction fragment length polymorphism analysis), total DNA restrictions obtained using endonuclease enzymes are used. The fragments are separated by molecular weight by gel electrophoresis. When PCR-PDF analysis is used, specific regions of the genome are first amplified in a polymerase chain reaction. The amplification products are then treated with restriction enzymes. The obtained restriction fragments are separated by gel electrophoresis. The band profiles obtained by PDRF and PCR-PDRF methods using different enzymes are used to evaluate the genetic diversity of the samples under study. The results are processed by evaluating sequence divergence in those restriction fragments that are common [89].

Both types of PDRF analysis have certain limitations. First of all, they reflect the divergence of only very small regions of the genome, which may not coincide with the divergence of the whole genome. In addition, gene copy number variation can also affect the determination of genetic distance. The method is now largely obsolete due to the advent of inexpensive DNA sequencing technologies, but RFLP analysis was the first DNA profiling technique inexpensive enough to find widespread use in genome mapping and gene localization.

Genome analysis by amplified fragment length polymorphism (AFLP- Amplified fragment length polymorphism) is a highly sensitive method for detecting polymorphisms in DNA. However, the data obtained are not evaluated as length polymorphisms, but as presence-absence polymorphisms [200]. DNA is processed with two restriction enzymes: a rare-cheap restrictase (e.g., EcoRI) and a frequent-cheap enzyme (e.g., MseI). Adapters - short double-stranded DNA fragments, whose nucleotide sequence includes bark and

enzyme-specific sequences - are attached to the ends of the obtained restrictions. Selection of restriction fragments is achieved by using primers complementary to the adapter sequence, the restriction site sequence, and several nucleotides within the restriction site fragments. It is these restriction fragments of genomic DNA that are amplified during PCR, and the amplification products are separated by gel electrophoresis or by automatic capillary sequencing tools. The use of various restrictases and variation in the selective sequence at the 3'-end of the primers allows different sets of fragments that form genomic profiles to be obtained from genomic DNA by AFLP [163]. Genome analysis by amplified fragment length polymorphism is a highly sensitive method and is successfully used to study the divergence of closely related microorganisms.

2.2.4 Whole-genome sequencing

The first approaches for sequencing were developed by the Swedish biochemist Edman P.V. (protein sequencing method), then Maxam A. and Gilbert W. proposed the method of chemical degradation of DNA. And in 1977, Sanger F. and colleagues presented the "chain breaking" method for deciphering the primary structure of DNA. This method is the most common and is considered the "gold standard" [24].

Further development of technology led to the creation of new promising methods of next generation sequencing (NGS). The technology involves spatially separated polymerase replication of a large number of individual DNA molecules fixed on a solid matrix (flat substrate or microsphere) and then cyclic sequencing. As a result, a large number of relatively short DNA fragments are read simultaneously (in parallel) [24, 30]. There are different NGS platforms (Illumina, Thermo Fisher Scientific (USA), etc.), but most technologies are based on a common algorithm of analysis: creation of a DNA library; clonal amplification of each DNA fragment by PCR; automatic step-by-step reading of each nucleotide type and detection of the result [1].

The third generation of DNA sequencing platforms differs from the second generation in that primary DNA amplification is no longer required. This "single-

molecule" sequencing technology is characterized by the absence of errors that occur during DNA amplification, high throughput, high reading speed, and longer reads [1].

The data obtained from sequencing require further processing. The first step involves culling out low-quality sequences and error correction. Various programs exist for this purpose, such as Coral (CORrection with Alignments), which is easily adapted to different types of errors [1, 184].

At the second step, the search for matching sites is performed; short chains of nucleotides are assembled into one or more long sequences consisting of overlapping DNA fragments (contigs). They are then combined into scaffolds (ordered contigs with a given distance between them). A reference (check) genome or reference nucleotide sequences (if available) can be used for alignment and association. If not, the assembly is de novo (reassembled). Programs such as BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), Clustal (ClustalW, ClustalX and Clustal Omega), MAQ (Mapping and Assembly with Quality), SeqMap, MUSCLE, MAFFT and others are used to align with the reference genome. If the assembly is de novo, such computer programs as SOAP de novo, Velvet, Euler and others are used [1, 115, 137, 142, 148].

The third step involves the identification and analysis of phylogenetic relationships. Comparisons are made with already known nucleotide sequences that can be found in special databases. The programs BLAST (the most popular), MEGAN, RITA, Naïve Bayes, etc. are used for comparison. The most popular database is GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), but others also exist [1]. A comprehensive program QIIME (quantitative insights into microbial ecology) has been developed for metagenomic analysis, which includes many other software packages and is open source [1, 97].

The most popular program MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) is used to estimate evolutionary distances, construct phylogenetic trees, and calculate basic statistical values based on molecular data. It includes various methods and tools for phylogenetic analysis [191].

2.2.5 Determination of genome similarity by DNA reassociation

Analysis of DNA reassociation (reunification of DNA strands separated by denaturation during annealing) allows us to estimate genome complexity, the content of unique and repetitive nucleotide sequences, and the frequency of their repetition in the genome. Comparison of DNA in two organisms makes it possible to determine the percentage of similarity (difference) between them. It is assumed that the homology of DNA in closely related species is 20-60%, within species - 60-100%, and for different subspecies - 60-70%. But there are no clear boundaries for the interpretation of the results, since there is a large variation in homology values for closely related species [13, 24, 128]. Identification of any new species involves determining the similarity of DNA with the closest type strain and describing the properties characteristic of the species. However, one must be able to correctly interpret the values obtained in the context of general phylogenetic information [62].

2.2.6 Average Nucleotide Identity (ANI) method

As a good alternative to the time-consuming DNA-DNA hybridization method, average nucleotide identity (ANI) counting in the genomes of the compared bacteria (only 20% of the full sequence length is sufficient) was proposed. This is a more modern and reliable method. The ANI value of 95-96% correlates well with the level of 70% DNA-DNA hybridization - the threshold value of DNA similarity of strains attributed to the same genome species. However, these values cannot be considered absolute limits unless they are consistent with the entire phenotypic and phylogenetic picture [63, 87, 128, 171].

ANI calculation usually involves genome sequence fragmentation and then nucleotide sequence search, alignment, and identification. The original ANI calculation algorithm uses the BLAST program as its search engine. ANI values are based on pairwise alignment of genome regions. The reliability of their results directly depends on the quantity and quality of the aligned DNA fragment [128, 205].

For data processing, the software JSpecies is used to calculate ANI (Richter and Rosselló-Móra, 2009). Here, one can calculate ANI using BLAST, as suggested by Goris and colleagues. In addition, there is an alternative ANI calculation based on MUMmer [110, 144], which is designed to compare longer genomes, avoids previous sequence manipulation, and gives faster results than BLAST. Both algorithms give almost identical results, especially in the ANI > 90% ranges that must be considered when describing a species. The improved ANI algorithm, called OrthoANI, is designed with the concept of orthology in mind and allows faster processing without loss of accuracy. A web service that can be used to calculate OrthoANIu between a pair of genome sequences is available at <http://www.ezbiocloud.net/tools/ani>. For large-scale calculations, there is an offline JAVA program (<http://www.ezbiocloud.net/tools/orthoaniu>.) [205].

In addition to ANI, the program can calculate correlation indices of tetranucleotide signatures between pairwise genomic comparisons. This parameter is calculated by analysis without alignment and, because of the calculation speed, allows a larger set of genomes to be compared. The tetranucleotide frequency correlation coefficient (TETRA) is based on calculating the frequency of tetranucleotide occurrence and determining a linear regression. Two related genomes (strains of the same species) have a high TETRA coefficient, while less related ones have a lower one [63, 193].

In addition, other parameters have been proposed to estimate the relatedness of microorganisms, such as the maximum unique match index (MUM), determined by the formula: $MUM_i = 1 - L_{mum} / L_{av}$, where L_{mum} represents the sum of the lengths of all non-overlapping MUMs and L_{av} is the average length of the two genomes compared. Values close to 0 are typical for very similar sequences, whereas values close to 1 are typical for distant genomes [111].

All these parameters are intended to help assess the evolutionary and species status of the strain. However, the value of ANI, at present, remains unsurpassed because, more accurately, it reflects what happens when two DNA hybridize during an experiment [187]. The ANI method has already been used, for example, to describe new species of *Burkholderia*, *Geobacter*, and *Vibrio*, as well as to characterize the new subspecies

Francisella, the genus *Sphaerochaeta*, and the new class *Dehalococcoidetes* [133, 150, 158, 172, 198]. Thus, ANI calculations are one of the many aspects and approaches that can be derived from comparative genomic data and used for taxonomic purposes.

CHAPTER 3. RELICT LEGUMES AND THEIR MICROSymbionTS

3.1. The Baikal region as a centre of plant genetic diversity

The lists of rare and endangered plants included in the Red Book of the Russian Federation (<https://redbookrf.ru>) include many relict species [50, 65]. In geobotanical terms, "a relict is a species that used to be numerous on a given territory, but then, due to changes in habitat conditions, became mostly extinct and survived only in a few isolated places" [22]. The belonging of a plant to a relict is determined by botanical and geographical and paleobotanical data. They include information on the time of appearance of the species, on its role in the composition of vegetation of past epochs, and on the nature of its habitat. It can be isolated or discontinuous range, in case of wide distribution of the species in the past. Often relicts are at the stage of extinction and occupy a shrinking range. However, when conditions change to favorable ones, they can recover and be the source of development of new forms. The main reason for relicts lies in the changing natural and climatic conditions associated with glaciations. Geomorphological, edaphic and biotic factors also play an important role [25].

Relict plants should be primarily sought in the centers of genetic diversity of plants. The Baikal region is one such center of biodiversity due to its geographical location, geochemical processes and climatic parameters. Scientists view the Baikal region as a self-organizing rift ecosystem with unique biodiversity and resilience. Multiple ice ages and interglacial periods, global climate fluctuations and changes in landscapes have led to the formation of new ecosystems and the emergence of a large number of new species. At the same time, prolonged geographical isolation, for example, of Olkhon Island from the high mountains of Lake Baikal, has led to the preservation of relicts, endemics and speciation processes. Also, in the inner parts of the Sayan-Khangai mountain range can be observed a peculiar place of rather ancient endemism [46].

There are 5 nature reserves, 4 national parks, 22 preserves, 1 nature park, 128 natural monuments, 1 botanical garden, and health resorts (<http://geol.irk.ru/baikal/>)

within the boundaries of the Baikal Natural Territory. All of them are protected natural areas, the purpose of which is to preserve the unique ecosystems of the region. There are more than 2000 species of vascular plants in the Baikal natural area. Out of them at least 53 species are found only here and don't occur anywhere else in the world. These species are endemics of this natural area. More than 80 species have survived here since the glacial and pre-glacial periods [67]. Many relict species are found among such a large family as *Fabaceae*, especially the genera *Hedysarum*, *Oxytropis* and *Astragalus* are rich in them [32]. Some of them are local endemics. For example, *Oxytropis triphylla* (Pall.) Pers. or *Hedysarum zundukii* Peschkova, a relict of the Miocene desert-steppe flora, are representatives of the glacial-alpine flora. Other representatives of relict flora, on the contrary, are quite common. For example, *Caragana jubata* (Pall.) Poir. (Shag-Spine), a relict legume plant of the ancient Mediterranean flora, can be found on dry gravel slopes from Siberia to Mongolia, China and Tibet. Or *Oxytropis tragacanthoides* Fisch. in the Irkutsk region is found only in the Olkhon district, but is found in other regions of Russia and beyond [11, 32].

In the Baikal region, 121 species and 15 genera of the *Fabaceae* Lindl family have been described. Plants of the genera *Oxytropis* DC. and *Astragalus* L. are most common in this area. [23].

The genus *Astragalus* L. is the largest genus of flowering plants and the largest in the *Fabaceae* family. It has about 3,000 species¹.

It is represented by annual and perennial grasses, semi-shrubs and less often by shrubs. Range of the genus covers arid, subarid and temperate areas of both hemispheres. The genus reaches the greatest diversity in the area of Western and Middle Asia, and beyond its borders the number of species of the genus sharply decreases. Habitats are mainly represented by rocky slopes, screes, meadows, forest edges, thickets of bushes, coastal sands, gravels and steppes. There are 31 species in Transbaikalia; many of them are widespread: *A. tenuis* Turcz., *A. adsurgens* Pall., *A. mongholicus* Bunge, *A. dahuricus* (Pall.) DC. Some species, such as *A. miniatus* Bunge, *A. membranaceus* (Fisch. ex Link)

¹ Species counts are from «The Plant List» website, <http://www.theplantlist.org/>. Дата обращения 12. 06. 2022.

Bunge, *A. frigidus* (L.) A. Gray, *A. schelichovii* Turcz., *A. olchonensis* Gontsch., *A. sericeocanus* Gontsch. are included in the Red Books of regions and/or the Red Book of Russia as rare, endemic or vulnerable species [12, 26, 38].

The genus *Oxytropis* DC. includes about 600 species¹ and is the second genus of perennial plants of the Fabaceae family in the number of species. Semishrubs or shrubs up to 1 m high also occur. The genus has a rather unclear phylogeny. Some taxa may be subspecies or one species. Species of the genus inhabit the cold, temperate and subtropical belts of the Northern Hemisphere, the mountains of Central and Central Asia. They grow in mountain tundras, on stony slopes, mountain steppes and meadows. In Transbaikalia, 35 species occur, some of which are included in the Red Books of the regions and/or the Red Book of the Russian Federation: *O. lasipoda* Bunge, *O. kodarensis* Jurtzev et Malyshev, *O. komarovii* Vassilcz., *O. sylvatica* (Pall.) DC., *O. stukovii* Palib., *O. tompudae* Popov, *O. nigrescens* (Pall.) Fisch. ex DC., *O. lanata* (Pall.) DC., *Oxytropis triphylla* (Pall.) Pers., *O. bargusinensis* Peschkova, *O. interposita* Sipl, *O. varlakovii* Serg. [12, 38, 70].

The genus *Hedysarum* L. of the Fabaceae family includes about 200 species¹. They are mainly perennial herbs, low shrubs or semi-shrubs. They are distributed mainly in temperate and less often in cold zones of the northern hemisphere and in North Africa. On the territory of the former Soviet Union, there are 126 species of this genus. Their overwhelming number is in Central Asia. In Transbaikalia, only 8 species grow, but they occur throughout the region. They mainly grow in humid places (forests, meadows, along river valleys) and also in the highlands. *H. alpinum* is widespread in the Baikal region. The species is part meadows and often forms extensive thickets of up to several hectares. Also, the species *H. gmelinii* Ledeb., a Pleistocene relic of South Siberian origin, is quite common. However, it is quite rare in the European part of Russia, and in some regions and areas is included in the Red Books. There are also local endemics of the Baikal region, such as *H. zundukii*, which can be found only in Russia in the Irkutsk region on the slopes of the Primorsky ridge facing the lake Baikal between Otto-Khushun and Zama capes, as

well as on Zunduk cape. Another endemic *H. cisbaicalense* Malyshev grows only in the Baikal-Lena Nature Reserve and the Baikal National Park [38, 77].

The genus *Lathyrus* L. includes about 200 species¹ of annual and perennial grasses. They grow in temperate areas of the Northern Hemisphere, South America, northwestern Africa, the Mediterranean, the Far East and China. In Russia, 40 species of uncultivated vetch have been described. In Transbaikalia, only 9 species have been found. The most common are *L. pallustris*, subsp. *Pilosus* Cham., which is one of the main components of schmidtosac meadows, as well as *L. humilis* (Ser.) Spreng. and *L. pratensis* L. In the west of the Irkutsk Region there is a relic from the glacial period *L. gmelinii* (Fish.) Fritsch. Another species, *L. vernus* (L.) Bernh. although has a fairly wide habitat, but in the Irkutsk Region and Moscow is included in the Red Books as a rare and endangered plant [11, 38].

In the Baikal region there are also leguminous plants of such genera as: *Vicia* L., *Gueldenstaedtia* Fisch., *Melilotus* Mill., *Caragana* Fabr., *Trifolium* L., *Medicago* L., *Lespedeza* Michx., *Melilotoides* Heist. ex Fabr., *Glycyrrhiza* L., *Thermopsis* R.Br. and *Onobrychis* Mill. [51].

Thus, the legume family is one of the largest in the flora of the Baikal region with a large number of rare endemic and relict species. Most of these species occur as small and isolated populations. Their numbers are decreasing due to anthropogenic impact, low genetic diversity and natural and climatic changes. Therefore, a proper protection strategy and comprehensive study of rare leguminous plant species in the area is necessary [59].

Quite a lot is known about the flora of the Baikal region thanks to the works of such scientists as M.G. Popov, L.I. Malyshev, G.A. Peshkova, G.V. Matyaschenko, and B.B. Namzalov [39, 40, 45, 50]. In addition, the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, under the guidance of A.V. Verkhovina, is currently conducting comprehensive work on the study and conservation of rare plant species of the Baikal region. They are searching for and mapping their locations, studying their condition and monitoring their populations. In 2013, the information and analytical system on phytodiversity of Baikal Siberia

(<http://www.sifibr.irk.ru/institute/departments/depbiores.html>) was created. Therefore, this region is quite attractive and promising for searching for populations of relict leguminous plants in order to study their symbiotic relationships with microorganisms.

3.2. Genetic research on microsymbionts of relict leguminous plants

There are a large number of works on the study of nodule bacteria. However, the world's first information about strains isolated from the nodules of a relict legume *Vavilovia formosa* (Steven) Fed. appeared only in 2014. *V. formosa* is the closest relative of the extinct common ancestor of the tribe *Fabeae*, a group of legumes that also includes *Pisum*, *Vicia*, *Lathaurus*, and *Lens* [178]. The results of multiphase identification of the isolated strains showed that most of them were closely related to the fast-growing groups *Rhizobium leguminosarum* and *Phyllobacterium* spp. but several strains belonged to the slow-growing species *Tardiphaga robiniae* and *Bosea* sp. *T. robiniae* strains were isolated from *Vavilovia* nodules as companions to the fast-growing strains belonging to the genera *Phyllobacterium* and *Rhizobium* [178, 179, 180]. Further studies have shown the possibility that *Tardiphaga* may participate in the formation of the sym-genes pool in the nodule population and contribute to the total symbiotic "pangenome" of this population [33, 101]. And detection of strains of different taxonomic groups in the same nodule, allowed to assume their joint participation in the formation of symbiotic relations with the host plant and the presence of synergistic interactions of such strains (co-microsymbionts). The proposed hypothesis is that co-microsymbionts, when jointly infecting the nodule, can, by positively influencing each other, increase the efficiency of symbiosis formation and functioning. It is likely that such strains can complement each other with symbiotic genes and/or the nature of their expression depending on specific conditions. It is known that the joint use of several strains of rhizosphere microorganisms characterized by different properties and mechanisms of interaction with the plant leads to an increase in the yield (or productivity) of non-legume plants [9, 94, 165]. This technique is based on the summation of the useful properties of strains, positive

interactions between them, expansion of the ecological plasticity of inoculants and implementation of the additivity and synergism principles.

It is also important to note that relic plants can have an unusually wide range of microsymbionts, which was shown not only on the example of *Vavilovia formosa* (a new species - *Bosea vaviloviae*) [178, 179, 180], but also *Caragana jubata* (Pall) Poir. [186] and *L. gmelinii* Fritsch [3]. For example, a new species of the *Boseaceae* family, *Bosea caraganae*, containing several symbiotic genes *nol*, *nod*, *nif*, and *fix*, was isolated from the nodules of *C. jubata* that grows in Mongolia [186].

Bacteria similar in 16S rRNA gene sequence to *Phyllobacterium myrsinacearum* were isolated from the nodules of *L. gmelinii*, also related to relic plants. *L. gmelinii* belongs to the *Vicia* cross-inoculation group, which is characterized by symbiosis formation with the species *R. leguminosarum* *bv. viciae*. However, *L. gmelinii* grows on acidic soils rich in minerals, and this rhizobia species loses its virulence in these conditions [3]. At the same time, symbiotic genes of *Phyllobacterium* strains isolated from nodules of this plant were similar to those of *R. leguminosarum* *bv. viciae*. Thus, it can be assumed that these strains do not have their own symbiotic genes but acquire them through horizontal transfer [6].

The study of microsymbionts of relic legumes increases the known range of symbiotic microorganisms and is useful for understanding the formation of nitrogen-fixing symbiosis. A great contribution to the study of the phylogeny of nodule bacteria of endemic legumes is made by A.H. Baimiev's research group [8]. However, the number of studies on the study of symbionts of relic legume plants is extremely low, whereas it may be an important part in the study of not only the formation and evolution of symbiotic relationships, but may also contribute to the conservation and maintenance of relics in phytocenoses.

Many relic legumes are valuable not only as forage, honeybee and ornamental plants, but also as sources of biologically active substances. For example, *Hedysarum gmelinii* *subsp. setigerum* has components causing antiviral action, on the basis of which it is possible to create means to combat viral infections [47]. *Caragana jubata* contains a

number of medicinal active compounds, including flavonoids, terpenoids, tannins, alkaloids and saponins [186]. Methods of introduction are being developed for such plants and knowledge about their microsymbionts will play no small role in their successful relocation outside the natural habitat.

SECTION CONCLUSIONS

Legumes play an important role in phytocenoses due to their unique ability to form nitrogen-fixing symbiosis with root nodule bacteria of the order *Rhizobiales*. The formation of mutually beneficial symbiosis leads to the acquisition of new adaptive properties that increase the resistance of the plant-microbe system to stress conditions. System signal transduction, which ensures recognition and integration between legume plants and nodule bacteria, appeared during their co-evolution. Understanding the mechanisms based on specific symbiotic interactions is important to create an efficient plant-microbial symbiotic system with great potential to improve plant productivity. Therefore, the Miocene-Pliocene relic legume species belonging to the genera *Hedysarum*, *Oxytropis* and *Astragalus* become such important objects for studying the evolution of symbiosis [32, 177].

The identification and characterization of microorganisms, however, must rely on a "multiphase taxonomy," which aims to use all available data. These data include both phenotypic information, such as chemotaxonomic features (e.g., cell wall compounds, quinones, polar lipids), morphology, staining, growth characteristics (medium, temperature, incubation time, etc.), and genetic properties, such as 16S rRNA gene studies, multilocus analysis, G + C pair content, DNA-DNA hybridization value or ANI index. Obtaining information on the biodiversity of microsymbiont strains of relic legumes using modern methods to determine taxonomic relationships and phylogenetic relatedness of microorganisms allows improving the systematics of nodule bacteria and discovering new species of microorganisms that may have a symbiotic potential.

SCIENTIFIC AND EXPERIMENTAL PART

CHAPTER 1. MATERIALS AND RESEARCH METHODS

1.1 Plant and soil material

To obtain microsymbionts from relic legume-rhizobium systems, 3 expeditions were carried out in 2014-2017 in the Baikal region (Barguzinsky district, the mainland coast of the Baikal Strait Olkhon Gates, the coast of the Chivyrkuisky Bay, the Olkhon region, salt lakes of the Tazheran steppe, Cape Zunduk, Cape Khuzhir, Tutaisky Bay, Buryatia villages Mondy, Moygoty, Krasny Yar, outskirts of Ulan-Ude). The expedition plan was drawn up on the basis of the results of long-term mapping of leguminous plant populations at the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry) of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (SIPPB SB RAS). During the expeditions, such plants as the *Lathyrus humilis*, *Hedysarum gmelinii*, *Oxytropis popoviana*, *Oxytropis triphylla* and *Astragalus chorinensis* were found. To search for the populations of these plants, employees of the Herbarium group of the SIPPB SB RAS were involved. The belonging of plants to relics is confirmed by the work of other authors [77, 194]. The nodules were selected at the places of growth of these plants.

Soil samples and seeds of *O. popoviana*, *O. triphylla*, and *A. chorinensis* plants were collected in order to conduct a vegetation experiment in order to obtain additional nodules in their habitats: Cape Zunduk, Irkutsk Region (53°24'24.98"N, 107°26'19.53"E); the village of Yagodnoye, Buryatia (51°22'37.67"N, 106°28'24.06"E). The soils were dried at room temperature and sieved through a 0.2 mm sieve.

1.2 Isolation and cultivation of microorganisms

Isolation of microorganisms from nodules was carried out according to the standard procedure [164]. The nodules were sterilized for 1 min in 96% ethanol. They were grown on YMA mannitol-yeast agar or its modification with the addition of 0.5% YMSA succinic acid [180], which was developed specifically for the isolation of a wide range of species. Incubation was carried out at 28°C for 7-10 days.

Pure cultures of microsymbionts (after sequential double cloning) were placed for long-term guaranteed storage at the UNU "Station for low-temperature automated storage of biological samples at -80°C" (Liconic Instruments, Liechtenstein) [181]. Information about strains is available in the RCAM Internet database [78]. A total of 195 bacterial strains were isolated (Table 1).

Table 1. Strains isolated from plant nodules *Lathyrus humilis*, *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum*, *Oxytropis triphylla*, *Oxytropis popoviana* and *Astragalus chorinensis*, selected during expeditions to the Baikal region and/or obtained under the conditions of vegetation experiments.

Host plant	Geographical origin	Number of nodules collected		Number of isolated strains	Number of initially identified strains
		in natural conditions	in the conditions of vegetation experience		
<i>Lathyrus humilis</i>	Coast of the Chivyrkuisky bay	30	0	20	13
<i>Hedysarum gmelinii</i> subsp. <i>setigerum</i>	Cape Zunduk	10	0	24	19
<i>Oxytropis triphylla</i>	Cape Zunduk. Buryatia, Yagodnoye village, Krasny Yar	29	13	49	33
<i>Oxytropis popoviana</i>	Buryatia, Lake Baikal region,	40	29	62	43

	Yagodnoe village				
<i>Astragalus chorinensis</i>	Buryatia, Lake Baikal region, Yagodnoe village	0	34	40	28
TOTAL		109	76	195	136
		185			

1.3 Identification of microorganisms

Cell morphology and motility were determined using an Axiostar plus binocular microscope (Zeiss, Germany). To determine the biochemical properties, the GENIII MicroPlate BioLog system (USA) was used, which makes it possible to analyze the ability of bacteria to metabolize the main classes of biochemical substances (71 carbon sources) and resistance to 23 chemicals. The activity of urease, catalase, and β -galactosidase, as well as the nitrate reductive ability of the isolates, were studied using ready-made kits (NICF, Russia). Analyzes were performed as recommended by the manufacturers, except for a longer incubation period due to the slow growth of the isolates (5 days at 28°C). Each test was performed in duplicate.

For DNA isolation, the strains were cultured in YM broth for 1–5 days at 28°C with shaking at 200 rpm (Orbital Shaker-Incubator ES20, BioSan, Latvia). DNA isolation was performed by the CTAB-added lysis method described by Frederick M. Ausubel et al. [168] and visualized by electrophoresis in 0.5% TAE buffer in 1% agarose gel (Invitrogen, USA).

For the primary assessment of the intraspecific diversity of strains, RFLP analysis of the sequence between the 16S and 23S rRNA genes was used (ITS-RFLP method). The primer pair FGPS1490-72 5'-TGCGGCTGGGGATCCCCTCCTT-3' and FGPL132'-38 5'-CCGGGGTTTTCCCATTCGG-3' were used to amplify the ITS region. PCR mode for amplification of the ITS region: initial denaturation at 95°C for 3 min 30 sec; 35 cycles: denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min and chain

completion at 72°C for 2 min; final chain elongation at 72°C for 6 min 10 sec. PCR results were visualized by electrophoresis in 0.5% TAE buffer in agarose gel. Then, the amplified DNA fragment was treated with MspI restrictase (Promega, USA) for 18 hours at 37°C. Further, the amplified DNA fragment was treated with the MspI restriction enzyme (Promega, USA), and then the electrophoresis of the restricted DNA fragments was performed in the standard mode [57].

To determine the species affiliation of the strains, the method of sequencing the 16S rRNA (*rrs*) gene sequences was used. The 16S rRNA gene was amplified using the primer pair fD1 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and rD1 5'-AAGGAGGAGTGATCCAGCC-3' (Weisburg et al. 1991). PCR was performed in 25 µl reaction mixtures containing 150 µM dNTP (Promega), 5 pmol of each primer, 1 U Taq polymerase (Helicon) and 50-100 ng of purified DNA template. PCR conditions for 16S rDNA amplification were following: initial denaturation at 95°C for 3 min 30 sec; 35 cycles: denaturation at 94°C for 1 min 10 sec, annealing at 56°C for 40 sec and extension at 72°C for 2 min 10 sec; final extension at 72°C for 6 min 10 sec. Electrophoresis was carried out with 1% agarose gel (Invitrogen) in 0.5% TAE. A 100-bp GeneRuler™ and Lambda DNA/HindIII markers (Fermentas, Lithuania) were used for sizing and approximate quantification of DNA fragments. The PCR product was isolated from 1% agarose gel (Invitrogen) using Silica sorbent (Sigma-Aldrich, USA) or PureLink™ Quick kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The direct sequencing of PCR products was performed by an ABI PRISM 3500xl genetic analyzer (Life Technologies, USA) in the Core Centrum "Genomic Technologies, Proteomics and Cell Biology", of the All-Russian Research Institute of Microbiology.

The primers and modes for amplification of the ITS region and "housekeeping" genes: *atpD* (ATP synthase F1, beta subunit), *glnII* (glutamine synthetase II), and *recA* (recombinase A), whose sequencing was used to clarify and characterize strains with uncertain taxonomic positions are presented in Supplement 1. Table 1.

The sequences related to the rhizobial strains isolated from the nodules of *Hedysarum setigerum* are deposited in the NCBI GenBank database under the numbers

KY290459 - KY290467, KY290469, KY290470, KY290472 - KY290474. The sequences related to the rhizobial strains isolated from the *Oxytropis triphylla* were deposited in the NCBI GenBank database under the numbers KX426254 – KX426261 for the *rrs* gene sequences; KX447664 – KX447667 for the *atpD* gene; MG675065-MG675068 for partial ITS; MG652914 - MG652917 for the *recA* gene and MG652921 - MG652924 for the *glnII* gene. The sequences of the *rrs* gene for strains isolated from the nodules of *Oxytropis popoviana* and belonging to the species *M. japonicum*, *M. kowhailii*, and *Bradyrhizobium* sp. were entered into the NCBI GenBank database under the numbers MF661781 - MF661790. The *rrs* gene sequences for strains isolated from *Astragalus chorinensis* nodules were deposited in the NCBI GenBank database under the numbers MH626527, MH628053, MH628054, MH628085, MH628088, MH628090 - MH628092.

Sequences of type strains *P. sophorae* LMG 27899T, *P. brassicacearum* LMG 22836T, *P. endophyticum* LMG 26470T and *P. bourgognense* LMG 22837T were deposited under the numbers: MG675069-MG675072 for the ITS region; MG652918 - MG652920 for the *recA* gene and MG652925 - MG652928 for the *glnII* gene.

The sequences of the strains that were not deposited are given in Supplement 2.

The search for homologous sequences was performed in the NCBI GenBank database and the BLAST program [125]. To process the results and build a dendrogram of the similarity between the sequences of the studied and reference strains of nodule bacteria, the MEGA software versions 5.0, 7.0, 10.0. were used. and the Neighbor-Joining algorithm. Evolutionary distances were calculated using the Maximum composite likelihood method. Bootstrap analysis (1000 replicates) was performed to assess cluster support [191].

The genome of the type strain *Phyllobacterium zundukense* Tri-48T (LMG 30371T) was sequenced on the PacBio RS II platform at the Arizona Genomics Institute (AGI), University of Arizona (UA) and assembled *de novo* using the RS_HGAP.3 assembly program. Genomes of *P. zundukense* Tri-38 (LMG 30370), *B. vestrisii* Tri-39, *R. leguminosarum* Tri-43, *B. vestrisii* Tri-44, *B. vestrisii* Tri-49, *R. lusitanum* Opo-234,

M. japonicum Opo-235, *M. japonicum* Opo-242, *Bradyrhizobium* sp. Opo-243, *B. vaviloviae* Ach-307, *M. kowhainii* Ach-343, as well as the type strains *P. brassicacearum*, LMG 22836T, *P. endophyticum* LMG26470T and *P. sophorae* LMG27899T were sequenced at the specialized Center of Genomics SB RAS (ICBFM SB RAS) according to the manufacturer's recommendations. Genomic DNA was fragmented by focused ultrasonicator Covaris S2 (Covaris, USA). Fragment DNA-libraries were prepared with NEBNext DNA Library Kit (NEB, USA), and their quality was estimated with High Sensitivity DNA Kit on Bioanalyzer 2100 (Agilent, USA). DNA amount was estimated with dsDNA High Sensitivity Kit on Qubit 1.0 (Invitrogen, USA). Genome sequencing was performed on a MiSeq genomic sequencer (Illumina, United States) by standard protocol with MiSeq Reagent Kit, 600 Cycles (Illumina, United States) at SB RAS Genomics Core Facility (ICBFM SB RAS). Genomes was assembled using the SPAdes 3.11.1 software [92]. Quality control was performed by QUAST 4.6.0 program [129]. The contigs were assembled using the CLC Genomics Workbench program (USA); the genes contained in the genomic sequence were annotated using the RAST Web server (Aziz et al., 2008) [90]. Search for homologs of the 16S rRNA gene, ITS region, housekeeping genes and symbiotic genes in annotated genomes was performed using CLC Genomics Workbench 7.5.1 software using local BLASTn and tBLASTx.

Whole genome sequences for the *P. zundukense* Tri-38 and Tri-48T strains are deposited in the NCBI GenBank database under the numbers MZMT00000000 and CP017940-CP017945, respectively. Access number in NCBI GenBank for *R. lusitanum* Opo-234 - NZ_JAFEVL010000000, for *M. japonicum* Opo-235 strain - QKOD000000000, for *M. japonicum* Opo-242 strain - MZXX000000000, for *Bradyrhizobium* sp. Opo-243 - MZXW000000000, for strain *M. kowhainii* Ach-343 - MZXV000000000.

Whole genome sequences of the reference strains *P. sophorae* LMG 27899T, *P. brassicacearum* LMG 22836T, and *P. endophyticum* LMG 26470T are deposited in the NCBI GenBank database under numbers PGGM000000000, PGGO000000000 and PGGN000000000, respectively.

The average nucleotide identity (ANI) of the genomes was estimated using the ANI Calculator tool [205]. Genome annotation was carried out using the NCBI prokaryotic genome annotation pipeline (PGAP) by NCBI staff when depositing genomes in the NCBI database [192]. The symbiotic genes of the strains were determined using the CLC Genomics Workbench 7.5.1 program. Contigs were aligned in BLAST and compared with symbiotic genes from various rhizobia presented in the GenBank database.

Analysis of the composition of fatty acids (FAME) was carried out by prof. Anne Willems at BCCM/LMG Bacteria Collection (Ghent University, Belgium). The strains were grown for 24 hours on YMA medium at 28°C. Fatty acid methyl esters were isolated according to the MIDI protocol (http://www.microbialid.com/PDF/TechNote_101.pdf). Profiles created using an Agilent Technologies 6890N gas chromatograph (Santa Clara, CA, USA) were identified and grouped using the Microbial Identification System program and the MIDI TSBA version 5.0 database.

1.4 Vegetation experiments

1.4.1 Vegetation method for the detection of symbiotic rhizobia in the soil

Seeds of *Oxytropis popoviana*, *Oxytropis triphylla*, and *Astragalus chorinensis* were surface sterilized by treatment in 98% H₂SO₄ for 10 min, washed thoroughly with sterile tap water, scarified and germinated on filter paper in Petri dishes at 25°C in the dark for 3-5 days (depending on the type of plants and germination). The seedlings were transferred to three sterile plastic pots (one pot with 5 seeds) containing 250 g of soil collected from the sites of these legume species, respectively. Plants were cultivated for 60 days in a growth chamber with 50% relative humidity and four-level illumination/temperatures mode: night (dark, 18°C, 8 hours), morning (200 μmol m⁻²s⁻¹, 20°C, 2 hours), day (400 μmol m⁻²s⁻¹, 23°C, 12 h), evening (200 μmol m⁻²s⁻¹, 20°C, 2 h). Illumination was performed by L 36W/77 FLUORA lamps (Osram, Germany). Then roots of individual plants were removed from the soil and washed with tap water. Plant

photographs were taken with a Stemi 508 stereomicroscope (Zeiss, Germany) and a color camera with an AxioCam ERc 5c microscope (Zeiss, Germany). Nodule bacteria strains were isolated as described above.

1.4.2 Plant experiments to study the symbiotic phenotype

Vegetation experiments to study complementary interaction and symbiotic efficiency of isolates belonging to different taxa were performed under sterile conditions in mono- and co-inoculation variants. The uniformly germinated seedlings were transferred to polypropylene pots OS140BOX (Duchefa, Netherlands) containing 20 g of vermiculite (3 seeds per pot, 4 pots per each treatment of *A. chorinensis* and *O. popoviana* plants; 3 seeds per pot, 10 pots per each treatment of other plant species). Each pot was supplemented with 40 ml of the nutrient solution (g/l): K_2HPO_4 - 1.0, KH_2PO_4 - 0.25, $MgSO_4$ - 1.0, $Ca_3(PO_4)_2$ - 0.2, $FeSO_4$ - 0.02, H_3BO_3 - 0.005, $(NH_4)_2MoO_4$ - 0.005, $ZnSO_4 \times 7 H_2O$ - 0.005, $MnSO_4$ - 0.002. Seedlings were inoculated with unlabeled strains *M. kowhii* Ach-343 and *M. japonicum* Opo-235 or their fluorescent-labeled variants Ach-343(pHC60) and Opo-235(pMP4655) or their combination in the amount of 10^6 cells per pot. The uninoculated plants were used as negative control. Plants were cultivated for 30 days in the growth chamber at a temperature of 20-21°C and a lighting regime of 16 h day / 8 h night. The appearance of nodules on six plants per treatment was recorded after 2 and 3 weeks of cultivation. At the end of experiment the nodules were counted and the fresh biomass of plants (shoots and roots) was determined (Ohaus Pioneer PX, USA). The nitrogen fixation of nodules was measured by the acetylene-reduction method using gas chromatograph GC-2014 (Shimadzu, Japan). Five nodules from each treatment were used for the confocal microscopy.

When studying in separate experiments the rate of nodulation during the inoculation of *O. popoviana* plants with strains Opo-242 and Opo-243, as well as their combination, 15 containers were used for each treatment option. The number of nodules was counted after 2, 3, 4, 5 and 6 weeks of plant cultivation in the growth chamber.

Nodules were analyzed on the stereo microscope Stemi 508 (Carl Zeiss, Germany) and photos were taken using the microscope color camera AxioCam ERc 5 s (Carl Zeiss, Germany). The rate of nodulation was studied in 2 experiments set under similar conditions. The data were processed by the standard method of variance analysis using the software STATISTICA version 10 (StatSoft Inc., United States). Fisher's LSD test was used to evaluate differences between means.

Part of the nodules was used for bacterial reisolation. The belonging of the reisolates to the introduced strains was verified by sequencing the ITS region using universal primers FGPS1490-72 and FGPL132'-38.

1.5 Obtaining fluorescently labeled strains using the electroporation method

Electroporation of strains was performed in accordance with the previous work Garg et al. [123]. For this purpose, 90 μ l competent cells of strains *M. kowhii* Ach-343 and *M. japonicum* Opo-235 were suspended between two electrodes spaced by 0.1 cm. Electroporation was carried out with an electric pulse of 14 kV/cm and pulse length of \sim 7.3 ms (Gene PulserXcell, Bio-Rad, United States). Number of high voltage pulses ranged 1 for each strain. After the pulse was delivered, the cuvettes were kept on ice for 10 min. Then the electroporated cells were suspended in YM broth [199], incubated for 24 h at 30°C with 200 rpm shaking (Orbital Shaker-Incubator ES20, BioSan, Latvia) and spreaded on the YMA plates. In transformation experiments a derivative of the pHc60 (tetR) plasmid [101], in which the GFP coding sequence was replaced by the mCherry coding sequence (J. Fournier, LIPM, Toulouse, France, unpublished results) and pMP4655 (tetR) plasmid harboring the egfp gene were used for electroporation of strains Ach-343 and Opo-235, respectively. Screening of different transformants was performed on YMA medium containing 10 μ g/ml tetracycline. PCR was carried out using Thermal Cycler T100 (Bio-Rad, United States) to confirm the transformation using total DNA as template and a pair of primers flanking fluorescent protein gene present on the plasmids

pHC60 and pMP4655. The PCR conditions used for the amplification of 1083 and 967 bp fragment (for pHC60 and pMP4655, respectively) included a pre-amplification denaturation at 95°C for 3 min 30 s followed by 35 cycles at 94°C for 1 min 10 s, 54°C for 1 min and 72°C for 2 min 10 s, with a final extension at 72°C for 7 min. The following primers were used: M13F (50 -GTTGTAAAACGACGGCCAGTG-30) and M13R (50 -AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA-30). The PCR products were visualized by electrophoresis on 1.0% agarose gel (Invitrogen, United States) in TAE buffer and purified by using Silica (Helicon, Russia). Sequencing was performed using the ABI PRISM 3500xl (Applied Biosystems, United States) according to the manufacturer's instructions. Positive clones of each strain were tested for fluorescence in the Axio Imager A1 microscope (Carl Zeiss, Germany).

1.6 Confocal microscopy

Nodules were molded in 3% agarose gel blocks and prepared in 1/4 MTSB (50 mM PIPES, 5 mM MgSO₄ · 7H₂O, 5 mM EGTA, pH 6.9). Nodule sections (50 µm) were prepared using a microtome with a vibrating blade HM650V (Microm, Germany). Sections were analyzed using the laser scanning confocal system LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany). EGFP and mCherry were excited at 488 and 543 nm, respectively. Images were acquired with ZEN 2009 software (Carl Zeiss, Germany).

CHAPTER 2. RESEARCH RESULTS

2.1 Genetic diversity of microsymbionts of relict leguminous plants

2.1.1 Species diversity of microsymbionts of the *Lathyrus humilis* (Ser.) Spreng

Lathyrus humilis is a perennial herbaceous plant of the genus *Lathyrus* L., tribe *Fabeae* Rchb. Stems slender, upright, 20-45 cm high. Leaf axis ends in a branched tendril, sometimes simple. Leaflets (2)3-5 pairs, glabrous on both sides, elliptic or ovate, 1.5-4 cm long, 0.7-2 cm wide. Stipules semistellate, ovate or lanceolate, 6-13(18) mm long. Flowers are reddish-purple by (1)2-4 in loose racemes, turning blue when drying. Calyx is 7-9 mm long, with lanceolate-subulate teeth, of which the upper 2 are no longer than half the length of the tube, the lowest almost equal to it. Corollas are (16)17-19 mm long. Ovary, mostly in lower part, densely shortly hairy. Pods 3-4.5 cm long, oblong-linear, pubescent with short curly hairs or glabrous [77]. It belongs to the Late Pleistocene relicts with a disjunctive South Siberian-North Urals range. It is found in Siberia, Altai, the Urals, Central Asia, the Far East, Northern China, the Korean Peninsula and the Himalayas. It grows in sparse birch and larch forests, in pine forests, along their outskirts, in meadows, meadow slopes and fallows [49]. Deserves attention as a valuable pasture plant.

Samples of low rank were brought from the coast of the Chivyrkuisky Bay (Baikal region). For work, 30 nodules from two populations were selected (Table 1). Of these, 20 isolates were obtained, differing in growth rate: in the first group of strains, visible colonies formed on the 3-4th day, in the second group on the 5-6th day of growth on YMA medium. For further work, 13 isolates were selected. Based on the RFLP analysis of the ITS-region of 10 strains, 7 groups distinguished by ITS-RFLP profiles were identified (Figure 1). One representative of each of the identified groups of microorganisms was selected to determine taxonomic affiliation. Three additional isolates (without RFLP analysis) were also selected. 16S rRNA gene (*rrs*) sequencing and

comparative analysis with other similar genes deposited in the GenBank database were performed for them.

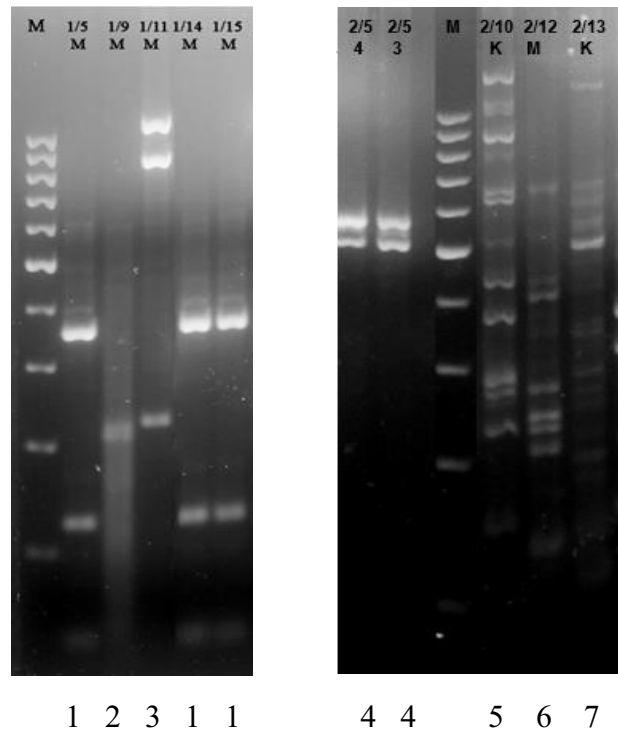


Figure 1. Electropherograms of ITS-RFLP analysis of 10 strains isolated from nodules of *Lathyrus humilis*. MspI restriction enzyme. M - DNA length marker 100-bp GeneRuler™; 1-7 - ITS-RFLP profile types.

Analysis of the *rrs* gene sequence showed that 3 strains isolated from nodules of *Lathyrus humilis* (1/10K, 2/10K, 2/12M), as well as two typical strains of *R. leguminosarum* LMG 14904T¹ and *R. leguminosarum* bv. *viciae* ATCC10004T formed a statistically significantly different cluster I with a support level of 96% (Figure 2). Isolates 1/10K and 2/10K were identified as *Rhizobium leguminosarum* (the level of similarity with the type strain LMG 14904T is 99.9%, whereas with USDA 2370T it was 99.6%), the 2/12M isolate was identified as *Rhizobium* sp. (the level of similarity with strain LMG 14904T was 99.4%).

The cluster II was formed by strain 2/5(1) and the type strain *R. giardinii* H152T (Figure 2). However, since the similarity between these strains in the *rrs* gene was only

¹ All type strains in the text are denoted by the letter "T".

99.0%, strain 2/5(1) was identified as *Rhizobium* sp. The third cluster, with a support level of 96%, along with strain 2/13K included *Mesorhizobium ciceri* NBRC 100389T, *Mesorhizobium australicum* WSM2073T, and *Mesorhizobium loti* ATCC 33669T. Isolate 2/13K was assigned to the genus *Mesorhizobium* and identified as *M. ciceri* (99.6% similarity with the type strain NBRC100389T in the *rrs* gene).

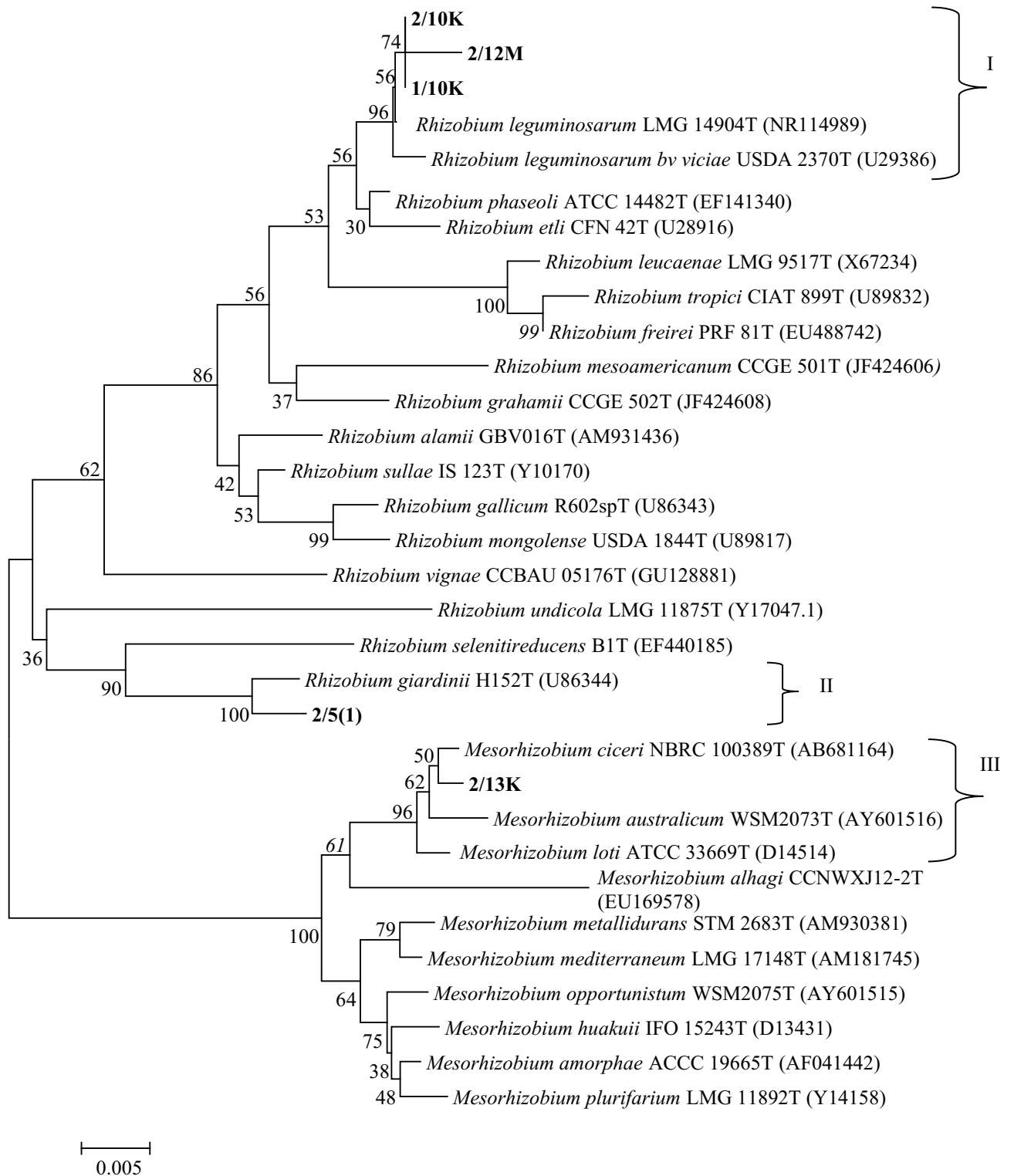


Figure 2. *Rrs*-phylogram reflecting the taxonomic position of the studied isolates of the genera *Rhizobium* and *Mesorhizobium* isolated from nodules of *Lathyrus humilis*. Type strains are marked with the letter "T". Isolate numbers are in bold. I - III - statistically significantly different clusters. Scale corresponds to 0.005 substitutions per 100 bp. (evolutionary distances). The numbers indicate the statistical significance of clustering (in %), determined using bootstrap analysis of 1000 alternative trees.

The only slow growing rhizobial isolate 1/11M, isolated from the nodule of *L. humilis*, formed a cluster I with the type strain *Tardiphaga robiniae* LMG26467T and was assigned to this species (99.9% similarity in the *rrs* gene) (Figure 3).

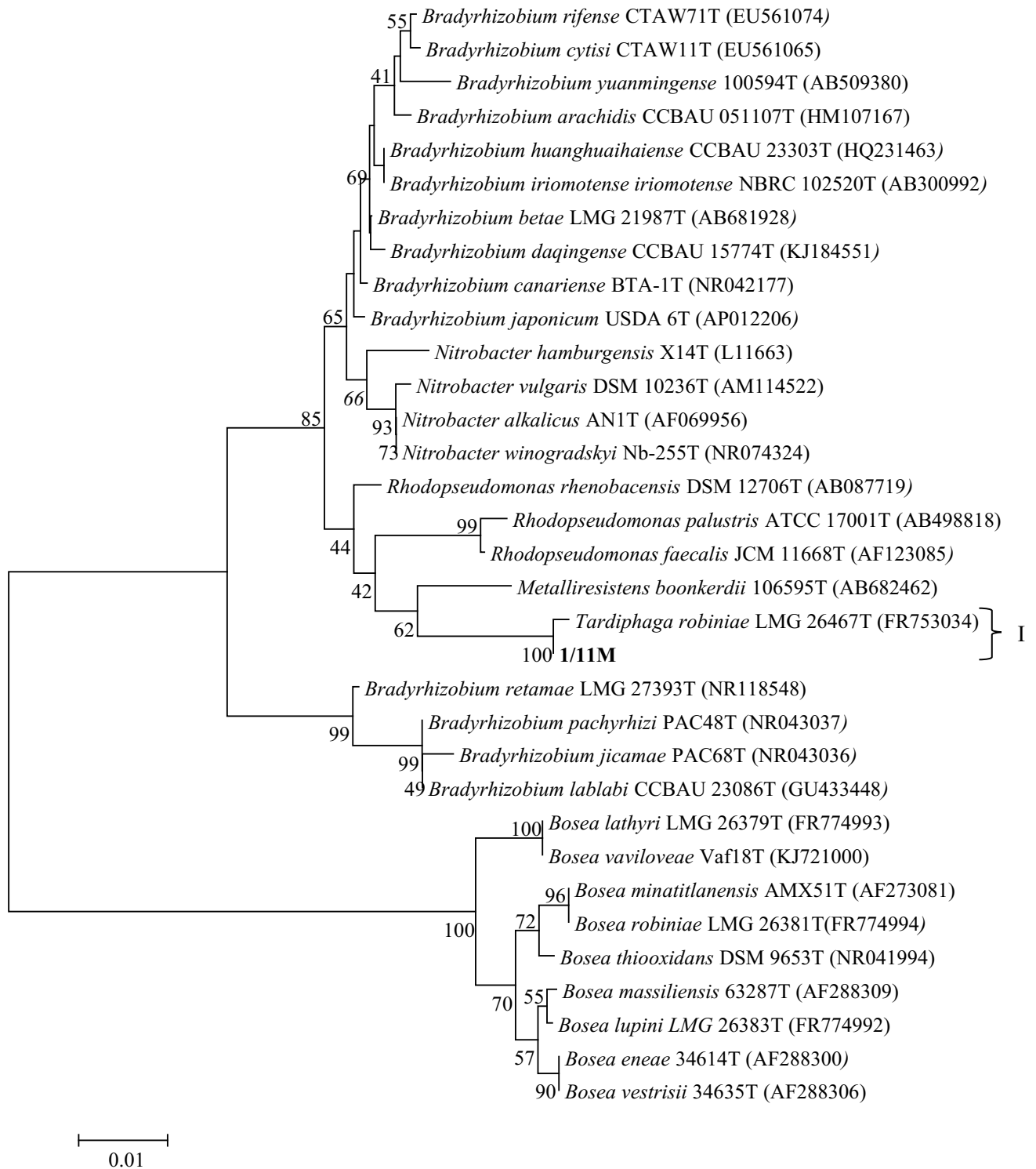


Figure 3. *Rrs*- phylogram reflecting the taxonomic position of an isolate belonging to the *Bradyrhizobiaceae* family, isolated from a nodule of *Lathyrus humilis*. The letter

“T” marks the type strains. The isolate number is in bold. I - statistically significantly different cluster. The scale corresponds to 0.01 substitutions per 100 bp. (evolutionary distances). The numbers indicate the statistical significance of clustering (in %), determined using bootstrap analysis of 1000 alternative trees.

Analysis of the *rrs* gene sequences in 4 other slow growing isolates (1/3M, 1/5M, 1/14M, 1/15M) showed that they belonged to the genus *Herbiconiux* (family *Microbacteriaceae*) (99.2% similarity with the type strain *H. ginsengi* wged11T). The strains were combined into one cluster with *H. ginsengi* wged11T with a support level of 98% (Supplement 1. Figure 1). According to the literature, representatives of this genus can be present in nodules of leguminous plants [98, 147] and also inhabit the rhizosphere and phyllosphere of various plants [95, 170]. In addition, 3 strains belonging to the genera *Aeromicrobium* (2/5(3), 2/5(4) strains) and *Mucilaginibacter* (1/9M strain) were identified (Supplement 2.1). Representatives of these genera are typical soil inhabitants and belong to the families *Nocardioidaceae* and *Sphingobacteriaceae*, respectively [140, 143].

Thus, it was shown in the work that representatives of the species *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium* sp., (семейство *Rhizobiaceae*), *Mesorhizobium ciceri* (семейство *Phyllobacteriaceae*), *Tardiphaga robiniae* (семейство *Bradyrhizobiaceae*) (Table 2), representatives of the families *Microbacteriaceae*, *Nocardioidaceae* and *Sphingobacteriaceae* were also found. The composition of the studied microsymbionts taken for analysis turned out to be quite diverse. However, most strains belong to the genus *Rhizobium*.

Table 2. Species of microorganisms of the order *Rhizobiales* isolated from nodules of *Lathyrus humilis*.

Family/Species	Strains	Total
<i>Family Rhizobiaceae:</i>		4
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	1/10K, 2/10K	2
<i>Rhizobium</i> sp.	2/5(1), 2/12M	2
<i>Family Phyllobacteriaceae:</i>		1
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	2/13K	1

Family Bradyrhizobiaceae:		1
<i>Tardiphaga robiniae</i>	1/11M	1

It is known that the genus *Lathyrus* L. is united into one cross-inoculation group with the genera *Pisum* L., *Vicia* L. and *Lens* Mill., which is characterized by symbiotic relationships with various strains of the species *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* [113, 114, 197]. However, other types of microorganisms have recently been described as microsymbionts of plants of the genus *Lathyrus* L. For example, bacteria close to *R. fabae*, *R. tropici*, and *Sinorhizobium morelense* were isolated from nodules of *Lathyrus* plants growing in China [190]. And in the nodules of the *L. numidicus* Batt., a strain belonging to the species *Phyllobacterium ifriqiyense* was found [154]. In nodules of *L. vernus* (L.) Bernh. and *L. sylvestris* L., rhizobia similar to *R. tropici* were found. In nodules of *L. palustris* L., species *Agrobacterium* sp. was found. In the plant *L. gmelinii* Fritsch, strains related to the species *Phyllobacterium myrsinacearum* were found in nodules [3]. The results of this work also support a wider range of chin microsymbionts than previously thought [28].

The species *T. robiniae*, found in the nodules of *Lathyrus humilis*, was first isolated from the nodules of *Robinia pseudoacacia* L. It was also found in the nodules of the relic species *Vavilovia formosa* (Steven) Fed. and narrow-local endemics: *O. pumilio* (Pall.) Ledeb., *O. erecta* Kom., *O. anadyrensis* Vass., *O. kamtschatica* Hultén [178, 179, 180, 182]. The *T. robiniae* species is considered to be associated with fast-growing strains and may participate in the formation of the sym-genes pool in the nodule population [33, 102].

Therefore, plants of the genus *Lathyrus* can enter into symbiotic relationships not only with *R. leguminosarum* *bv. viciae*, but also with other rhizobia species. This goes beyond the limits of the existing theory of cross-inoculation groups. One of the possible reasons for this phenomenon may be the low host specificity of plants belonging to the ancestral forms, which is expressed in the increased promiscuity of the evolutionarily less advanced species [178]. Another most probable reason is related to the horizontal transfer of symbiotic genes, as a result of which rhizobia may have changed their specificity with

respect to the host plant. Such a possibility has already been shown in the works of other authors [83, 84, 93].

2.1.2 Species diversity of microsymbionts of the *Hedysarum gmelinii* Ledeb. subsp. *setigerum* (Turcz. ex Fischer et Meyer) Kurbatsky

Hedysarum gmelinii subsp. *setigerum* is a perennial herbaceous plant of the genus *Hedysarum* L., tribe *Hedysareae* DC. Stemless or with a shortened stem, together with pedicels up to 33 cm long. Leaflets numbering 4-6(8) pairs, oblong or elliptic, 0.5-2 cm long, 0.2-0.7 cm wide. Flowers 14-19 mm, pink, pink-purple, pink-purple, in a goose brush. Corolla 14-20 mm long. Fruits are up to 9 cm long. Bean segments number 3-6, hairy, covered with long or central short spines [77]. It grows in the mountain-steppe, high-mountain and steppe zones, on stony, gravelly, steep slopes and in steppes. One of the habitats is the Baikal region, which is included in the Red Books of several republics and regions of the Russian Federation [21, 79]. Botanical and geographical analysis showed that this species belongs to the Pleistocene petrophytic-steppe relicts of South Siberian origin [35, 43].

In the course of this work, 24 isolates were obtained isolated from 10 nodules of the *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum* growing on Cape Zunduk (Table 1). The isolates were divided into two groups according to the growth rate on YMSA medium: in three strains, visible colonies formed on days 4–5 (Hse-21, Hse-22 and Hse-32), in others - on the 3rd day. Preliminary phylogenetic analysis of 18 strains by ITS-RFLP revealed that 16 of them have a unique ITS-RFLP profile, and only two strains Hse-19 and Hse-23 have similar profiles (Figure 4).

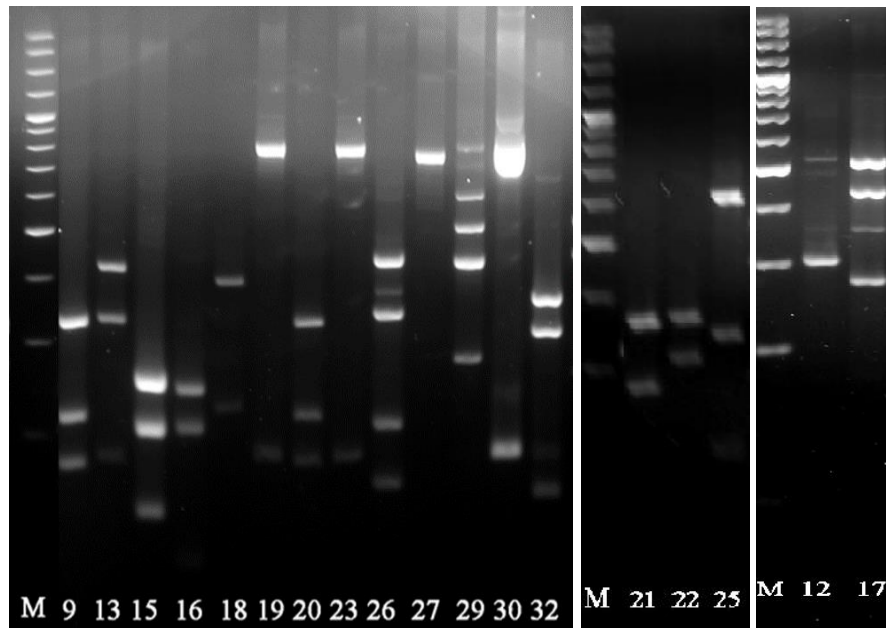


Figure 4. Electropherograms of ITS-RFLP analysis of 18 strains isolated from nodules of *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum*. MspI restriction enzyme. M - DNA length marker 100-bp GeneRuler™. The numbers indicate the numbers of Hse-isolates.

All strains with differences in the ITS-RFLP profile, as well as 2 additional isolates of Hse-10 and Hse-14, for which ITS-RFLP analysis was not performed, were selected for sequencing of the *rrs* gene. In total, 19 strains became objects for identification by sequencing this gene.

Phylogenetic analysis showed that fourteen rhizobial isolates belong to three genera: *Rhizobium* (family *Rhizobiaceae*), *Phyllobacterium* (family *Phyllobacteriaceae*), and *Bosea* (family *Bradyrhizobiaceae*).

Eleven fast-growing strains belong to the genera *Phyllobacterium* and *Rhizobium* and form 3 statistically significantly different clusters with a support level of 100% (Figure 5).



Figure 5. *Rrs*-phylogram of fast-growing strains isolated from nodules of *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum* in the Baikal region, as well as representatives of related species *Phyllobacterium* and *Rhizobium*. Type strains are marked with the letter "T". Isolate numbers are in bold. I - III - statistically significantly different clusters. The scale corresponds to 0.01 substitutions per 100 bp. (evolutionary distances). The numbers indicate the statistical significance of clustering (in %), determined using bootstrap analysis of 1000 alternative trees.

Cluster I included strains Hse-14, Hse-24 and Hse-10 as well as the type strain *P. endophyticum* PEPV15T. Strains Hse-24 and Hse-10 were identified as *P. endophyticum*, showing high homology of the *rrs* gene with that of the PEPV15T type strain (99.6 and

99.9%, respectively). Strain Hse-14 was described as *Phyllobacterium* sp. The percentages of similarity of *rrs* genes in the fast-growing isolates and the type strains of genera *Phyllobacterium* and *Rhizobium* are presented in Supplement 1. Table 2.

Cluster II combined strains Hse-29, Hse-17, Hse-20, Hse-30, Hse-19, Hse-9, Hse-13 and type strains *P. sophorae* CCBAU03422T, *P. bourgognense* STM201T, *P. brassicacearum* STM 196T, *P. loti* S658T, *P. trifolii* PETP02T, *P. catacumbae* CSC19T, *P. myrsinacearum* STM 948T and *P. ifriqiyense* STM 370T (Figure 5). Strain Hse-20 was identified as *Phyllobacterium* sp., because it was the closest to the *rrs* gene of the two species (the degree of similarity to the type strains *P. trifolii* PETP02T and *P. loti* S658T was 99.7 and 99.8%, respectively). The degree of similarity of the *rrs* gene in strains Hse-9, Hse-19 and Hse-30 and the type strain *P. loti* S658T was 99.8%. On this basis, the listed strains were described as *Phyllobacterium loti*. Isolate Hse-13 showed 99.9% similarity with the two type strains *P. myrsinacearum* STM 948T and *P. ifriqiyense* STM 370T, so it was identified only to the genus and defined as *Phyllobacterium* sp. Strains Hse-17 and Hse-29 were also assigned to *Phyllobacterium* sp. as they had a low similarity (99.3%) with the closest type strain *P. brassicacearum* STM 196T (Supplement 1. Table 2).

Cluster III was formed by strain Hse-26 and the type strain *Rhizobium giardinii* NBRC 107135T. Based on the results of *rrs* gene sequencing, isolate Hse-26 was identified as *Rhizobium* sp. (the degree of similarity in *rrs* gene with the type strain *R. giardinii* NBRC 107135T is 98.9%).

For the three slow-growing rhizobial isolates, an *rrs*-filogram was constructed to reflect their taxonomic position within the *Bradyrhizobiaceae* and *Boseaceae* family. They formed a separate cluster I with 99% support (Figure 6).

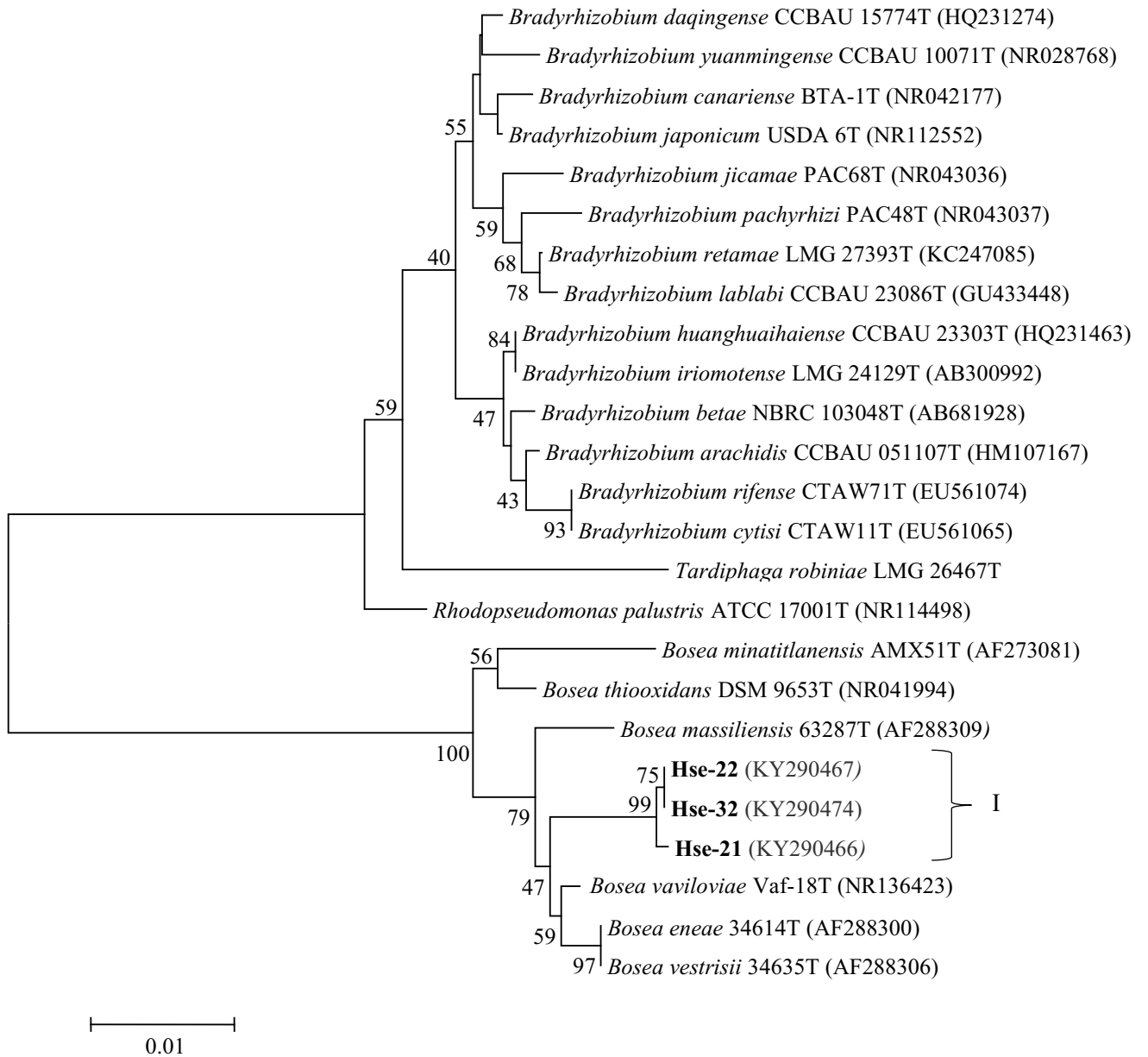


Figure 6. *Rrs*-phylogram of slow-growing strains isolated from *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum* nodules in the Baikal region, and representatives of related *Bradyrhizobiaceae* and *Boseaceae* species. Type strains are marked with the letter "T". Numbers of isolates are marked in bold. I - statistically significantly different cluster. Scale corresponds to 0.01 substitutions per 100 bp (evolution distance). Numbers indicate the statistical significance of clustering (in %) determined by bootstrap analysis of 1000 alternative trees.

Strains Hse-21 and Hse-32 showed 98.5% homology in the *rrs* gene with the type strain *Bosea vaviloviae* Vaf-18T and 98.6% homology with the type strains *B. eneeae* 34614T and *B. vestrisii* 34635T. The similarity in the *rrs* gene between the Hse-22 isolate

and the closest type strain *B. vaviloviae* Vaf-18T was 98.0% (Supplement 1, Table 3). On this basis, strains Hse-21, Hse-22 and Hse-32 were identified as *Bosea* sp.

Table 3. Species of microorganisms of the order *Rhizobiales* isolated from the nodules of *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum*.

Family/Species	Strains	Total
Family Rhizobiaceae:		1
<i>Rhizobium</i> sp.	Hse-26	1
Family Phyllobacteriaceae:		10
<i>Phyllobacterium endophyticum</i>	Hse-10, Hse-24	2
<i>Phyllobacterium loti</i>	Hse-9, Hse-19, Hse-30	3
<i>Phyllobacterium</i> sp.	Hse-13, Hse-14, Hse-17, Hse-20, Hse-29	5
Family Boseaceae:		3
<i>Bosea</i> sp.	Hse-21, Hse-22, Hse-32	3

In addition to 14 rhizobial isolates, 5 strains belonging to *Acinetobacter* (family *Moraxellaceae*) - strain Hse-27, *Stenotrophomonas* (family *Xanthomonadaceae*) - strain Hse-15, *Mycobacterium* (family *Mycobacteriaceae*) - strain Hse-16, *Agromyces* (family *Microbacteriaceae*) - strain Hse-18, *Sphingomonas* (family *Sphingomonadaceae*) - strain Hse-25 (Supplement 2.2). Representatives of the genus *Stenotrophomonas* were also isolated from other legumes of Baikal region [28]. According to literature data, representatives of these genera may be present in the nodules of legumes, and also be inhabitants of the rhizosphere and phyllosphere of various plants [103, 118, 204].

Thus, for the first time, this study obtained a collection of strains isolated from the relic legume *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum* growing in the Baikal region (Table 3). The study showed that among the microsymbionts of this plant, strains of symbiotic nodule bacteria (*Rhizobium* sp.), as well as representatives of atypical species (*P. endophyticum*, *P. loti* and *Bosea* sp.), whose ability to form nodules independently has not been previously observed [104, 107, 120, 185], may occur. To date, only two species of *Phyllobacterium* (*P. sophorae* and *P. trifolii*) have described the formation of nitrogen-fixing symbiosis with host plants (*Sophorae flavescens*, *Trifolium repens* and *Lupinus albus*) [138, 196]. At the same time, common nodulation genes *nodACD*, as well as the gene *nifH* encoding the Fe-protein of nitrogenase enzyme, were found in *P. sophorae* and

P. trifolii strains [138, 196, 207]. The formation of symbiosis by representatives of the genus *Bosea* was not previously confirmed, although strains of 5 species (*B. lupini*, *B. lathyri*, *B. robiniae*, *B. spartocytisi* and *B. vaviloviae*) were isolated from the nodules of legumes *Lupinus*, *Lathyrus*, *Robinia*, *Spartocytisus* and *Vavilovia*, respectively [107, 168, 180]. The *nifH* gene was detected in several strains of this genus, including the type strains *B. vestrisii* 34635T and *B. eneae* 34614T (De Meyer, 2012).

Isolates from the nodules of *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum* belonging to the genus *Bosea*, as well as bacteria of the genus *Phyllobacterium*, which are quite often found in the nodules of wild legumes of temperate climates [7], are of great interest for further study. It is likely that strains of species unable to form nodules on their own are present in them as carriers of genes not directly involved in symbiosis formation, but affecting its efficiency. It should also be noted that from the nodules of other *Hedysarum* species growing in the Mediterranean, the northwestern areas of China, and the middle belt of Russia, the microorganisms of the genera *Bosea* and *Phyllobacterium* were not isolated [60, 96, 189, 203].

Although the composition of the studied microsymbionts was quite diverse, it should be noted that the dominant number of isolated strains belonged to the genus *Phyllobacterium*, most of which had a low degree of similarity with the nearest typical strains, which may indicate that they belong to new species.

There is evidence in the literature that other *Hedysarum* species such as *Hedysarum spinosissimum* subsp. *capitatum* (Rouy) Asch. and Graebn. and some other species of the genus (*H. pallidum* Desf, *H. carnosum* Desf.) native to the Mediterranean region are bacteria belonging to the class *Gammaproteobacteria* - *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter cloacae*, *Leclercia adecarboxylata*, *Escherichia vulneris*, and *Pseudomonas* sp. [96]. *H. coronarium* L., is nodulated with strains of *Rhizobium sullae* [189]. According to Chinese researchers, representatives of the genus *Rhizobium* have also been isolated from the nodules of the species *H. scoparium* Fisch. and C.A. Meyer and *H. polybotrys* Hand.-Mazz. growing in northwest China [203]. In addition, it has been shown that plants of *H. alpinum* L. can be nodulated by members of

the genus *Mesorhizobium* [60]. Thus, it is possible to say that the hemlocks have a rather wide range of microsymbionts, which is also confirmed by this work. The results obtained may indicate that the relic legume-rhizobial symbioses formed, in particular, by *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum*, are a prototype of modern symbiotic systems and reflect the evolutionary pathways towards recruitment of symbiotic genes of different microorganisms and increasing the specificity of plant-microbe relationships [58].

2.1.3 Species diversity of microsymbionts of the *Oxytropis triphylla* (Pall.) Pers.

Oxytropis triphylla belongs to the tribe *Galegeae* Dumort, subtribe *Astragalinae* DC., genus *Oxytropis* DC. It is a perennial stemless, turfy plant with a thick caudex base. Leaflets are 3-5 pairs, narrow-oval or oblong-ovate, 10-15(20) mm long and 3-5(7) mm wide, naked on both sides, long ciliate at margins. Peduncles thin, hairy, with 2 to 3 flowers. Flowers large, 25-30 mm long, corolla red-purple. Pods roundish-ovate, swollen, thin-skinned, white-fleshed, 12-15 mm long. Grows on dry stony slopes, rocks and pebbles [77]. *O. triphylla* is endemic to Russia (west coast of Lake Baikal and Olkhon Island), included in the Red Book of the Russian Federation [50] and belongs to the Pliocene desert-steppe relicts [45, 194]. The species probably belonged to a single belt of mountain xerophytic vegetation from Gobi to Baikal, and is related to the Gobi *O. rhizantha* Palib. [44]. Although plants of the genus *Oxytropis* have no particular agricultural value, they form natural pastures and grow successfully on poor soils in northern temperate, subarctic and arctic regions [182].

To study microsymbionts of *O. triphylla*, 29 root nodules were collected from populations growing on Cape Zunduk, and 13 nodules were obtained in a vegetation experiment (Table 1). A total of 49 strains were isolated. From these, 33 strains were selected for further identification.

Analysis of the *rrs* gene sequences showed that 5 isolates belonged to the genus *Phyllobacterium*: 2 of them (Tri-35, Tri-40) were identified as *Phyllobacterium ifriqiense* (similarity with the type strain *P. ifriqiense* STM 370T was 99.8%, 99.7%).

Strains Tri-34, Tri-45, and Tri-56 were identified as *Phyllobacterium* sp. because the similarity with the closest type strain *P. bourgognense* STM 201T was 99.3%, 99.4%, and 99.4%. Isolates Tri-44 and Tri-52 were assigned to the species *Bosea vestrisii* (99.7% and 99.6% similarity with the type strain *B. vestrisii* 34635T, respectively). Strain Tri-471 was identified as *Bosea* sp. (similarity with the closest type strain *B. vestrisii* 34635T is 98.9%). Five strains belonged to the genus *Rhizobium*: 3 isolates (Tri-43, Tri-51, and Tri-155) were attributed to *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (similarity with the type strain *R. leguminosarum* bv. *viciae* USDA 2370T by *rrs* gene - 100%). Two isolates of the genus *Rhizobium* were left without species identity: isolate Tri-152 had 100% similarity with several type strains at a time (*R. azibense* 23C2T, *R. mongolense* subsp. *loessense* CCBAU 7190BT, *R. gallicum*), and isolate Tri-55 - 99.4% similarity with the nearest type strain *R. lusitanum* P1-7T. Isolate Tri-146 was assigned to *Neorhizobium galegae* (similarity with the type strain *N. galegae* NBRC 14965T 99.9%). Tri-143 isolate had 99.7% similarity with two typical strains of *N. galegae* NBRC 14965T and *N. huautlense* SO2T, so it was left without species identity as *Neorhizobium* sp. as was strain Tri-149. Isolate Tri-42 was described as *Bradyrhizobium* sp. (similarity to the closest type strains *B. lupini* USDA 3051T and *B. canariense* NBRC 103049T is 96.5%) (Table 4). Another 8 strains not related to nodule bacteria were assigned to genera *Agromyces* (family *Microbacteriaceae*), *Sphingomonas* (family *Sphingomonadaceae*), *Acinetobacter* (family *Moraxellaceae*) and *Lysobacter* (family *Xanthomonadaceae*) (Supplement 2.3).

Table 4. Species of microorganisms of the order *Rhizobiales* isolated from the nodules of *Oxytropis triphylla*.

Family/Species	Strains	Total
Family <i>Rhizobiaceae</i>:		8
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Tri-43, Tri-51, Tri-155	3
<i>Rhizobium</i> sp.	Tri-55, Tri-152	2
<i>Neorhizobium galegae</i>	Tri-146	1
<i>Neorhizobium</i> sp.	Tri-143, Tri-149	2
Family <i>Phyllobacteriaceae</i>:		9
<i>Phyllobacterium ifriqiense</i>	Tri-35, Tri-40	2
<i>Phyllobacterium</i> sp.	Tri-34, Tri-45, Tri-56	3

<i>Phyllobacterium zundukense</i>	Tri-36, Tri-38, Tri-48, Tri-53	4
Family <i>Boseaceae</i>:		7
<i>Bosea vestrisii</i>	Tri-37, Tri-39, Tri-44, Tri-49, Tri-54, Tri-52	6
<i>Bosea sp.</i>	Tri-471	1
Family <i>Bradyrhizobiaceae</i>:		1
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Tri-42	1

Four pairs of isolates, each isolated from one nodule, were of the greatest interest for the study: Tri-36 and Tri-37, Tri-38 and Tri-39, Tri-48 and Tri-49, Tri-53 and Tri-54. Colonies of paired isolates on YMSA medium differed in growth rate: fast-growing ones appeared on day 3 and slow-growing ones on day 6-7. The strains that made up the pairs were present in the nodules in approximately equal proportions. The total number of colony-forming cells per nodule was about 10^4 . Preliminary identification of the isolates by *rrs* gene sequencing showed that the slow-growing strain of each pair (Tri-37, Tri-39, Tri-49, and Tri-54) belonged to the species *Bosea vestrisii* (similarity with the type strain *B. vestrisii* 34635T 99.6 to 99.8%). *Rrs*-phylogram of these isolates and representatives of the *Bradyrhizobiaceae* and *Boseaceae* family is shown in Figure 7. The isolates formed a common cluster I with two typical strains of *B. vestrisii* 34635T and *B. eneeae* 34614T with 99% support.

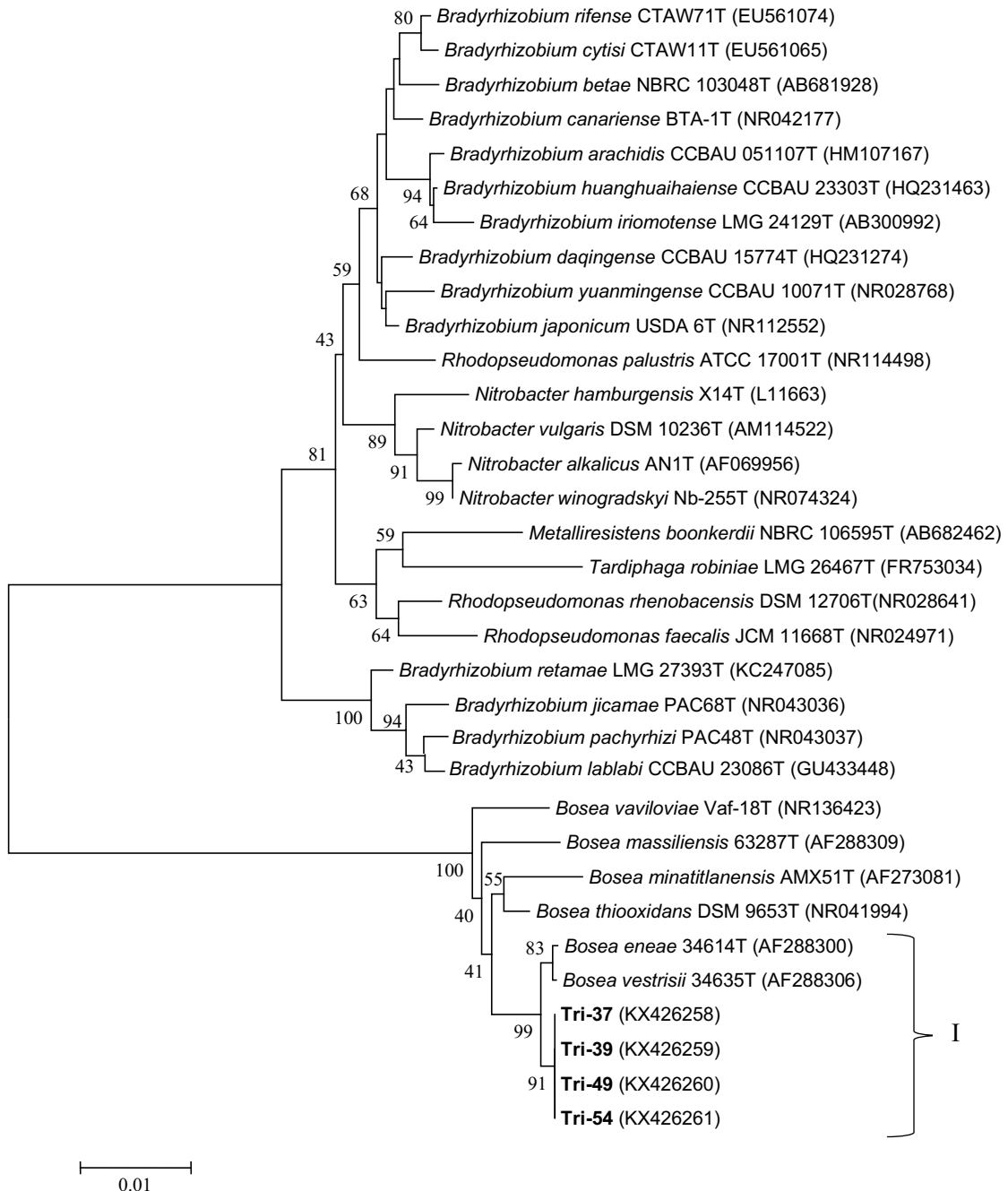


Figure 7. *Rrs*-phylogram of representatives of the *Bradyrhizobiaceae* and *Boseaceae* family, including isolates from *Oxytropis triphylla*. Type strains are marked with the letter "T". Numbers of isolates are in bold type. I - statistically significantly different cluster. The scale corresponds to 0.01 substitutions per 100 bp (evolutionary distances). Numbers indicate the statistical significance of clustering (in %) determined by bootstrap analysis of 1000 alternative trees.

The fast-growing isolates Tri-36, Tri-38, Tri-48, and Tri-53 were phylogenetically closest to the type strains *Phyllobacterium endophyticum* PEPV15T (*rrs* similarity 98.8

to 99.5%) and *Phyllobacterium bourgognense* STM 201T (similarity 98.8 to 99.3%) (Table 5). *Rrs*-phylograms of isolates and representatives of the families *Phyllobacteriaceae* and *Brucellaceae* are shown in Figure 8.

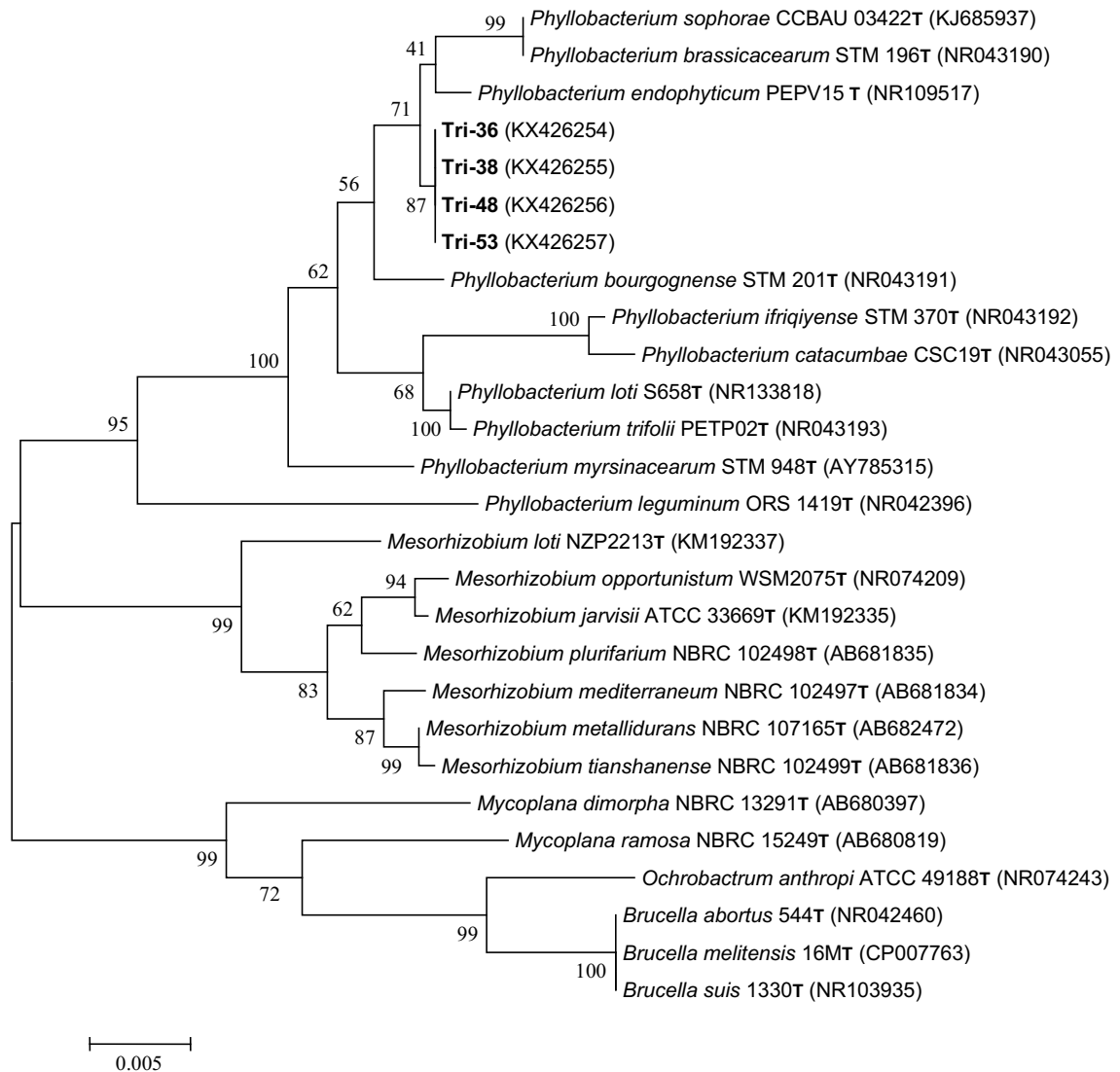


Figure 8. *Rrs*-phylogram of representatives of the families *Phyllobacteriaceae* and *Brucellaceae*, including isolates from *Oxytropis triphylla*. Type strains are marked with the letter "T". Isolate numbers are in bold type. The scale corresponds to 0.005 substitutions per 100 bp (evolutionary distances). Numbers indicate the statistical significance of clustering (in %) determined by bootstrap analysis of 1000 alternative trees.

The 1280 bp region between the 16S and 23S rRNA genes (ITS region), as well as the "housekeeping" genes *atpD*, *recA*, and *glnII*, used as marker genes for differentiation

of closely related species of the genus *Phyllobacterium*, were sequenced for more accurate identification of rapidly growing isolates [185]. Sequences of the *atpD* gene for the type strains of the closest *Phyllobacterium* spp. species were available in the GenBank database; the remaining loci (*recA* and *glnII*) for the type strains *P. endophyticum* LMG26470T, *P. bourgognense* LMG22837T, *P. brassicacearum* LMG22836T, and *P. sophorae* LMG27899T were sequenced in this work. The sequence similarity of the *rrs*, *atpD*, *glnII*, *recA* genes and ITS region between all the isolates studied and the reference strains is shown in Table 5.

Table 5. Similarity of *rrs*, *atpD*, *glnII*, *recA* genes and ITS region sequences between *Phyllobacterium* strains isolated from *Oxytropis triphylla* nodules and typical strains of closely related rhizobia species.

Similarity (%) with type strains		Isolates from <i>Oxytropis triphylla</i> nodules			
Type strain	Locus	Tri-36	Tri-38	Tri-48 ^T	Tri-53
<i>P. endophyticum</i> LMG26470T	<i>rrs</i>	98.8	99.5	99.0	99.4
	ITS	87.9	88.3	88.2	88.4
	<i>atpD</i>	89.4	89.6	89.4	89.8
	<i>glnII</i>	82.1	82.3	82.3	82.3
	<i>recA</i>	88.3	87.7	88.1	88.1
<i>P. brassicacearum</i> LMG22836T	<i>rrs</i>	99.1	98.8	98.7	99.2
	ITS	89.6	89.0	89.4	89.3
	<i>atpD</i>	88.0	88.0	88.0	88.0
	<i>glnII</i>	84.8	85.1	85.1	84.8
	<i>recA</i>	91.4	90.6	91.3	90.8
<i>P. sophorae</i> LMG27899T	<i>rrs</i>	98.7	98.8	98.6	99.0
	ITS	87.5	87.0	87.1	87.1
	<i>atpD</i>	91.6	91.6	91.6	91.6
	<i>glnII</i>	89.4	89.5	89.5	88.1
	<i>recA</i>	95.4	95.1	95.1	95.1
<i>P. bourgognense</i> LMG22837T	<i>rrs</i>	99.2	99.3	98.8	99.3
	ITS	87.9	88.2	88.3	88.2
	<i>atpD</i>	91.8	91.8	91.8	91.8
	<i>glnII</i>	81.3	82.1	82.1	82.1
	<i>recA</i>	89.7	89.5	89.5	89.7

The sequences of *recA* and *glnII* genes in the studied isolates showed maximum similarity with the typical strains of *P. sophorae* LMG27899T (95.4 and 89.5%,

respectively) and *P. brassicacearum* LMG22836T (91.4 and 85.1%, respectively). The ITS region sequences were closest to the type strains *P. brassicacearum* LMG 22836T and *P. endophyticum* LMG26470T (89.6 and 88.4%, respectively), whereas the *atpD* gene was closer to *P. bourgognense* LMG22837T (91.8%). The phylogenetic tree for the *atpD* locus is shown in Figure 9 [174]. The trees for the other loci are not presented due to the lack of a sufficient sample of sequences in the NCBI database.

The results of the sequencing of the *rrs* gene, ITS region and "housekeeping" genes *atpD*, *recA* and *glnII* suggested that the group of strains Tri-36, Tri-38, Tri-48 and Tri-53 belonged to a new species of the genus *Phyllobacterium*. To describe the new species, additional experiments were performed using the most closely related type strains *P. sophorae* LMG27899T, *P. brassicacearum* LMG 22836T, and *P. endophyticum* LMG26470T as reference strains.

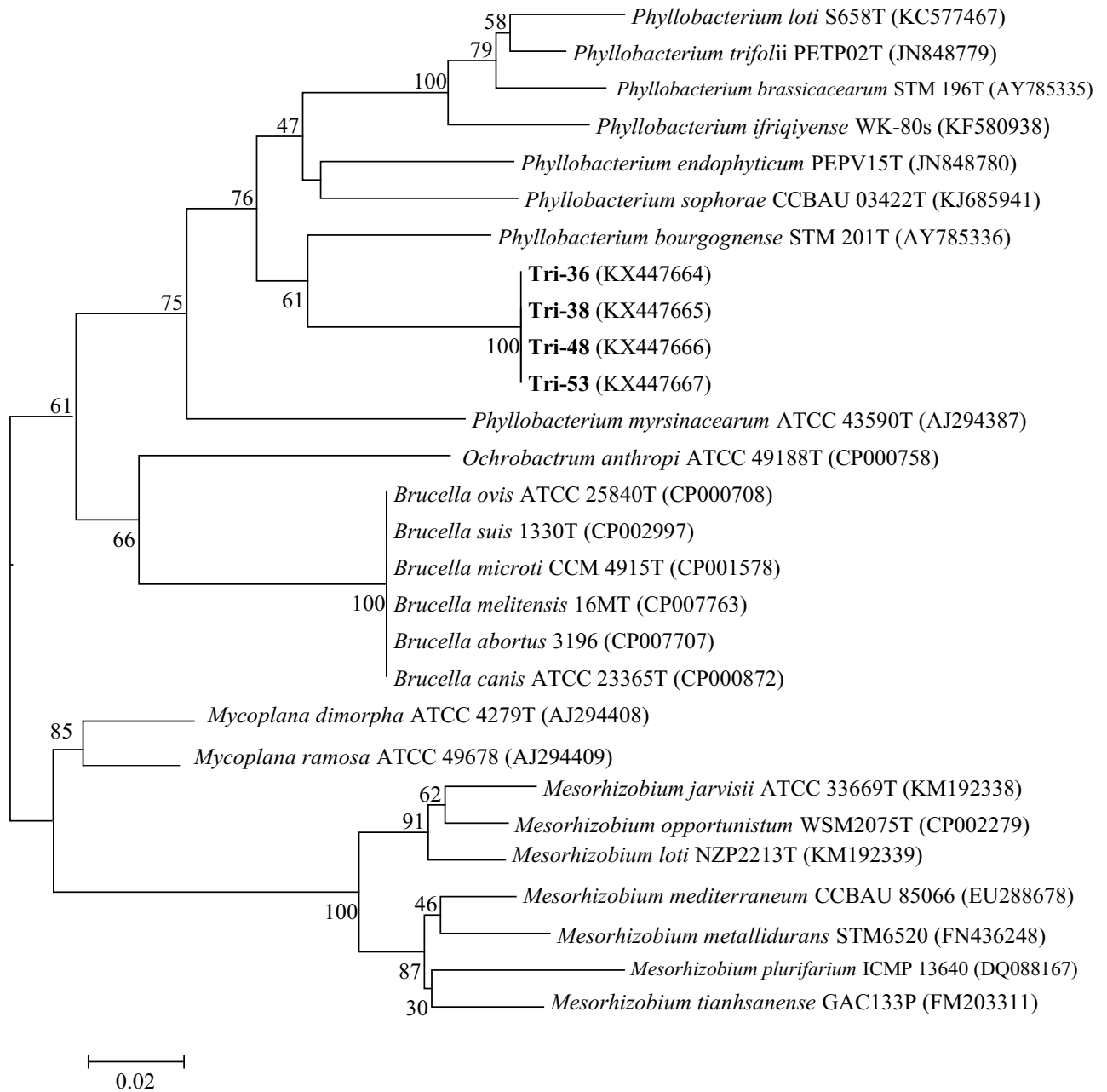


Figure 9. Phylogenetic tree of isolates from *O. triphylla* and phylogenetically related strains based on *atpD* gene sequences constructed by Neighbour-Joining method. Type strains are marked with the letter "T". Isolates from *O. triphylla* are shown in bold. The scale corresponds to 0.02 substitutions per 100 bp (evolutionary distances). Numbers indicate the statistical significance of clustering (in %) determined by bootstrap analysis of 1000 alternative trees.

The results of comparative analysis of the fatty acid profiles (FAME) of Tri-36, Tri-38, Tri-48, Tri-53 isolates and reference strains are listed in Supplement 1. Table 4. The novel isolates contained 18:1 ω 7c as the most abundant fatty acid (18.6–46.4 %),

which was the same for all the reference strains. The novel strains had significant amounts of 11 methyl 18:1 ω 7c (1.6–8.2 %), 12:00 (9.7–14.9 %), 16:0 (6.8–9.5 %), 16:0 3-OH (2.0–3.8 %), 17:0 ANTEISO (2.4– 8.7 %), 19:0 cyclo ω 8c (3.6–7.8 %), 20:00 (8.7–15.7 %), summed feature 2 (3.5–6.2 %), summed feature 3 (1.3– 2.1 %), summed feature 5 (1.2–3.8 %) and unidentified 18.814 (5.6–22.6 %). Unlike all the isolates from *O. triphylla*, *P. endophyticum* LMG 26470T was characterized by the presence of 15:0 ANTEISO and unidentified 16.582 as well as the absence of 16:0 3-OH and summed feature 3; *P. sophorae* LMG 27899T was characterized by the presence of 18:00 and the absence of 17:0 ANTEISO, summed feature 5 and unknown 18.814; *P. brassicacearum* LMG 22836T was characterized by the absence of 17:0 ANTEISO, summed feature 5 and unknown 18.814. Thus, differences in the fatty acid profiles of isolates and reference strains were shown.

The phenotypic properties of Tri-36, Tri-38, Tri-48, Tri-53 and the closest and typical strains of *P. sophorae* LMG27899T, *P. brassicacearum* LMG 22836T, *P. endophyticum* LMG26470T were also studied. The results of the comparative analysis are shown in Supplement 1. Table 5. The novel isolates had nearly identical phenotypic profiles with the exception of a few features. All of them possessed urease and catalase activities and were able to assimilate maltose, trehalose, sucrose, turanose, α -D-glucose, cellobiose, gentiobiose, D-galactose, D-mannose, D-fructose, fucose, L-rhamnose, D-sorbitol, D-mannitol, D-arabitol, glycerol, L-aspartic acid, L-glutamic acid, D-glucuronic acid, L-lactic acid, malic acid, propionic acid, acetic acid, formic acid and L-arginine. The isolates did not possess nitrate reduction and β -galactosidase activities as well as the ability to utilize dextrin, stachyose, gelatin, raffinose, melibiose, lactose, inosine, fusidic acid, D-aspartic acid, citric acid, mucic acid, D-saccharic acid and serine. The strains under investigation were sensitive to rifamycin, lincomycin, vancomycin and nalidixic acid. Only two isolates grew at 1 % (w/v) NaCl. Unlike all the reference strains, the novel isolates grew in the presence of Tween 40, did not grow at pH 6 and were not able to utilize L-galactonic acid lactone, bromosuccinic acid or L-alanine. All of these features were used in the description of the new species.

In addition, the genomes of isolates Tri-38 and Tri-48, as well as of typical strains of *P. brassicacearum* LMG 22836T, *P. endophyticum* LMG26470T, and *P. sophorae* LMG27899T were sequenced. The genome size of the isolate Tri-48T was 6 208 009 bp, comprising a chromosome of 3.95 Mbp and five plasmids ranging from 640 to 211 kbp. The DNA G+C content was 57.22 mol% and 5977 protein-coding sequences were found. The whole genome sequences of the isolates Tri-38 and Tri48T were very similar (99.99 % ANI) while ANI values between the genomes of these isolates and the reference type strains ranged from 79.23 % for *P. endophyticum* LMG 26470T to 85.74 % for *P. sophorae* LMG 27899T (Table 6). It should be noted that the most recent proposals recommend ANI values of less than 95 - 96 % for species separation, which corresponds to the traditional 70 % threshold used for DNA–DNA hybridization tests [171].

Table 6. Results of ANI calculation (%) between the whole genome sequences of the isolates Tri-38, Tri-48T and the type strains *P. sophorae* LMG 27899T, *P. brassicacearum* LMG 22836T и *P. endophyticum* LMG 26470T.

Strains	Tri-38	Tri-48T	<i>P. brassicacearum</i> LMG 22836T	<i>P. endophyticum</i> LMG 26470T	<i>P. sophorae</i> LMG 27899T
Tri-38	100.0	-	-	-	-
Tri-48	99.99	100.0	-	-	-
<i>P. brassicacearum</i> LMG 22836T	83.24	83.02	100.0	-	-
<i>P. endophyticum</i> LMG 26470T	79.28	79.23	78.35	100.0	-
<i>P. sophorae</i> LMG 27899T	85.74	85.64	81.71	78.39	100.0

Based on the results of sequencing the *rrs*, *atpD*, *glnII*, *recA* genes and ITS region of the Tri-38 and Tri-48 strains, analysis of their morphological, physiological properties, and fatty acid profiles, as well as ANI calculation, a new species of *Phyllobacterium zundukense* was described with the type strain Tri-48T (=LMG 30371T =RCAM 03910T) [175].

There is evidence in the literature that the nodules of *Oxytropis* species, such as *O. pumilio* (Pall.) Ledeb., *O. arctobia* Bunge, *O. deflexa* (Pall.) DC., *O. maydelliana* Trautv.,

O. monticola A. Gray, *O. riparia* Litv., *O. splendens* Douglas, and *Oxytropis glabra* DC. contain bacteria belonging to the genus *Rhizobium* [131, 135, 145, 182, 206]. Representatives of the genera *Mezorhizobium*, *Phyllobacterium* (for *O. pumilio* and *O. erecta*), *Bosea*, and *Tardiphaga* (for *O. pumilio*, *O. kamtschatica*, *O. erecta*, and *O. anadyrensis* Vass.) were also described among microsymbionts of *O. glabra*, *O. pumilio*, and *O. kamtschatica* Hultén [131, 182]. Isolates belonging to the species *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (family *Rhizobiaceae*), *Tardiphaga robiniae* (family *Bradyrhizobiaceae*) and *Bosea* sp. (family *Boseaceae*) were previously obtained from *Oxytropis sylvatica* (Pall.) DC. nodules [28]. This suggests that plants of the genus *Oxytropis* are not strict symbionts. However, the study of microsymbionts of relic species *O. triphylla* showed their unusually wide genetic diversity covering representatives of genera *Rhizobium*, *Neorhizobium* (fam. *Rhizobiaceae*), *Phyllobacterium* (fam. *Phyllobacteriaceae*), *Bosea* (fam. *Boseaceae*) и *Bradyrhizobium* (fam. *Bradyrhizobiaceae*) (Table 4). Such legume symbiotic systems with a wide range of microsymbionts are promising models for studying the evolution of host specificity, the impact of natural rhizobia diversity on plant growth and multilateral interactions between all symbiotic partners.

2.1.4 Species diversity of microsymbionts of the *Oxytropis popoviana* Peschkova

Oxytropis popoviana belongs to the tribe *Galegeae* Dumort, subtribe *Astragalinae* DC., genus *Oxytropis* DC. It is a stemless turfgrass with a thick root and short caudex branches. Leaves are appressed white-fleshed, 5-15 cm long. Leaflets are 3-5 pairs, oblong-lanceolate, 10-20 mm long and 3-5 mm wide. Peduncles are longer than the leaves and 2-3 times as thick as leaf petioles. Brushes are short, rounded or oval. Calyx is broadly tubular, with linear teeth, covered with appressed white and black hairs. Corolla pink-purple, flagellum 22-28 mm long. The spicisetum is 3(4) mm long. Pods broadly ovate, 10-20 mm long and 9-10 mm wide, thin-skinned, covered with white and black hairs, with fairly narrow septum along ventral seam. It grows on stony-rocky steppe slopes [77].

The species is a relic of the ancient Mediterranean Miocene-Pliocene flora [76, 194]. All known modern populations of this species are very small and are located in the Baikal National Park and Baikal-Lena Nature Reserve. It is included in the Red Book of the Irkutsk Region. It grows on stony and rubbly steppe slopes and tops of ranges along the western shore of Lake Baikal, as well as in the Selenga region of Buryatia [10].

During the expedition to the Republic of Buryatia, 40 nodules were collected from the roots of *O. popoviana*, and 29 nodules were obtained in the laboratory (Table 1). Most nodules were elongated (sometimes branched) and had pink coloration, which suggests the presence of hemoglobin and nitrogen-fixing activity. The shape of nodules corresponded to the elongated type of nodules usually with one, less often with two branches. The size of nodules varied from 1 to 5 mm.

A total of 62 strains were isolated from the nodules of *O. popoviana* plants which were divided into 3 groups according to growth rate on YMSA medium: fast-growing ones appeared on day 3 (25 strains), medium-growing on day 4-5 (35 strains), and slow-growing on day 6-7 (2 strains). Forty-three isolates were identified by *rrs* gene sequencing.

Analysis of the *rrs* gene sequences showed that 6 isolates belonged to the genus *Rhizobium*, three of them (Opo-157, Opo-161, Opo-234) were identified to *Rhizobium lusitanum* species (similarity with the type strain *R. lusitanum* P1-7T were 100%, 99.8%, and 100%, respectively). Opo-8 and Opo-169 isolates were identified as *Rhizobium* sp. because the similarity with the closest type strain *R. lusitanum* P1-7T was 99.4% for both. Isolate Opo-247 showed 99.7% similarity to the three type strains *R. mayense* CCGE526T, *R. lusitanum* P1-7T, and *A. rhizogenes* NBRC 13257T, so it was identified only to the genus and identified as *Rhizobium* sp. Strain Opo-7 was identified as *Neorhizobium galegae*, showing 99.7% similarity of the *rrs* gene to that of type strain NBRC 14965T. One strain Opo-230 was identified as *Bosea vaviloviae* (similarity with the type strain *B. vaviloviae* Vaf-18T by the *rrs* gene is 99.7%). We also detected 2 representatives of the genus *Phyllobacterium*: one isolate Opo-5 was determined as *Phyllobacterium ifriqiense* (similarity with the type strain STM 370T according to the

rrs gene is 99.6%), the second strain Opo-160 was determined as *Phyllobacterium trifolli* (similarity with the type strain PETH02T according to the *rrs* gene is 99.6%).

The greatest number of strains belonged to the genus *Mesorhizobium*. Phylogenetic analysis showed that 12 strains form two statistically significantly different clusters, with a support level of 87 and 82% (Figure 10).

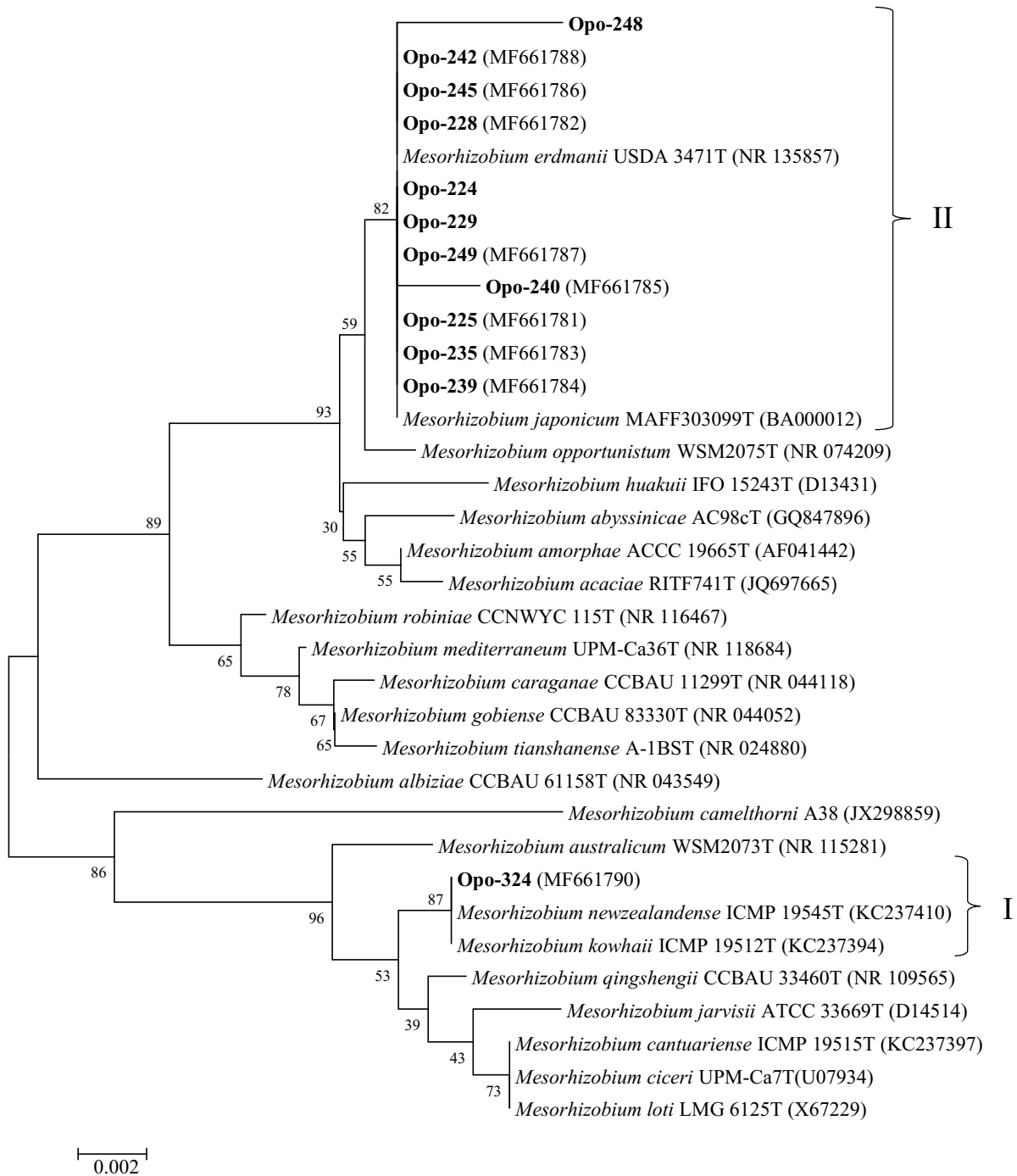


Figure 10. *Rrs*-phylogram demonstrating the taxonomic position of isolates isolated from *Oxytropis popoviana* and closely related *Mesorhizobium* species. Type strains are marked with the letter "T". I - II - statistically significantly different clusters. The numbers of isolates are shown in bold type. The scale corresponds to 0.002 substitutions per 100 bp (evolutionary distances). Numbers indicate the statistical significance of clustering (in %) determined by bootstrap analysis of 1000 alternative trees.

Cluster I grouped strain Opo-324 and the type strains *M. kowhaii* ICMP 19512T and *M. newzealandense* ICMP 19545T (Figure 10), with 100% and 99.8% similarity in the *rrs* gene, respectively. Thus, strain Opo-324 was identified as *M. kowhaii*.

Cluster II included strains Opo-224, Opo-225, Opo-228, Opo-229, Opo-235, Opo-239, Opo-240, Opo-242, Opo-245, Opo-248 and Opo-249 and two type strains *M. japonicum* MAFF 303099T and *M. erdmanii* USDA 3471T (Figure 10). All isolates had high homology of the *rrs* gene with those of the *M. japonicum* MAFF 303099T and *M. erdmanii* USDA 3471T type strains (99.61 - 100% and 99.68 - 100%, respectively) (Supplement 1. Table 6). To better determine the taxonomic position of the isolates, in addition to the *rrs* gene, the ITS region obtained by full-genome sequencing of two strains Opo-235 and Opo-242 was analyzed. The ITS-phylogram showed that both isolates form a separate cluster I with 100% support from the *M. japonicum* MAFF 303099T (Figure 11). The *rrs* gene similarity with the type strain *M. japonicum* MAFF 303099T was 99.78% for both isolates. Thus, strains Opo-235 and Opo-242 were identified to *M. japonicum* species. The remaining isolates were identified as *Mesorhizobium* sp. due to high percentages of similarity in the *rrs* gene with the two type strains at once.

Also, another 9 strains, Opo-223, Opo-227, Opo-238, Opo-246, Opo-251, Opo-252, Opo-254, Opo-325, and Opo-326 were identified as *Mesorhizobium* sp. because they had a low degree of similarity in the *rrs* gene with the closest type strains. Opo-223, Opo-227, Opo-238, and Opo-246 isolates were closest to the type strain *M. erdmanii* USDA 3471T (99.0 to 99.2% similarity degree). Opo-251, Opo-252, and Opo-254 isolates were most similar to the type strain *M. sophorae* ICMP 19535T (similarity 99.4 to 99.5%). The Opo-325 strain showed the greatest similarity with the type strain *M. australicum* WSM2073T (degree of similarity 99.2%), and the Opo-326 strain - with the type strain *M. norvegicum* 10.2.2T (degree of similarity 99.3%).

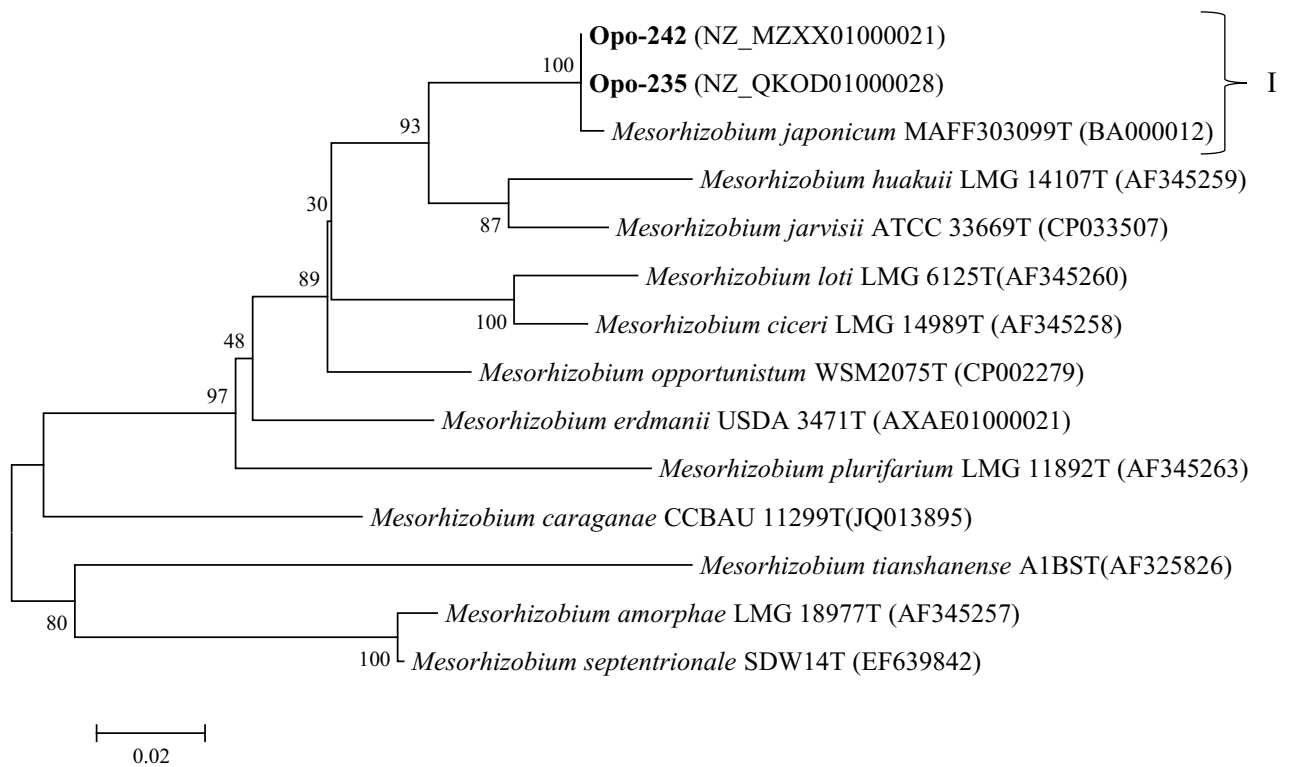


Figure 11. ITS-phylogram demonstrating the taxonomic position of Opo-242 and Opo-235 isolates and closely related *Mesorhizobium* species. Type strains are marked with the letter "T". Isolate numbers are in bold type. I - statistically significantly different cluster. The scale corresponds to 0.02 substitutions per 100 bp (evolutionary distances). Numbers indicate the statistical significance of clustering (in %) determined by bootstrap analysis of 1000 alternative trees.

Strain *M. japonicum* Opo-242 was isolated together with strain Opo-243. They were present in the nodule in approximately equal proportions of 10^4 CFU, but differed in their growth rates. Sequencing of the *rrs* gene of the slow-growing isolate Opo-243 showed that this isolate belongs to the *Bradyrhizobium* genus and is closest to the typical strain *B. diazoefficiens* USDA 110T (Figure 12), which was isolated from cultivated soybean and originally described as *B. japonicum* [109].

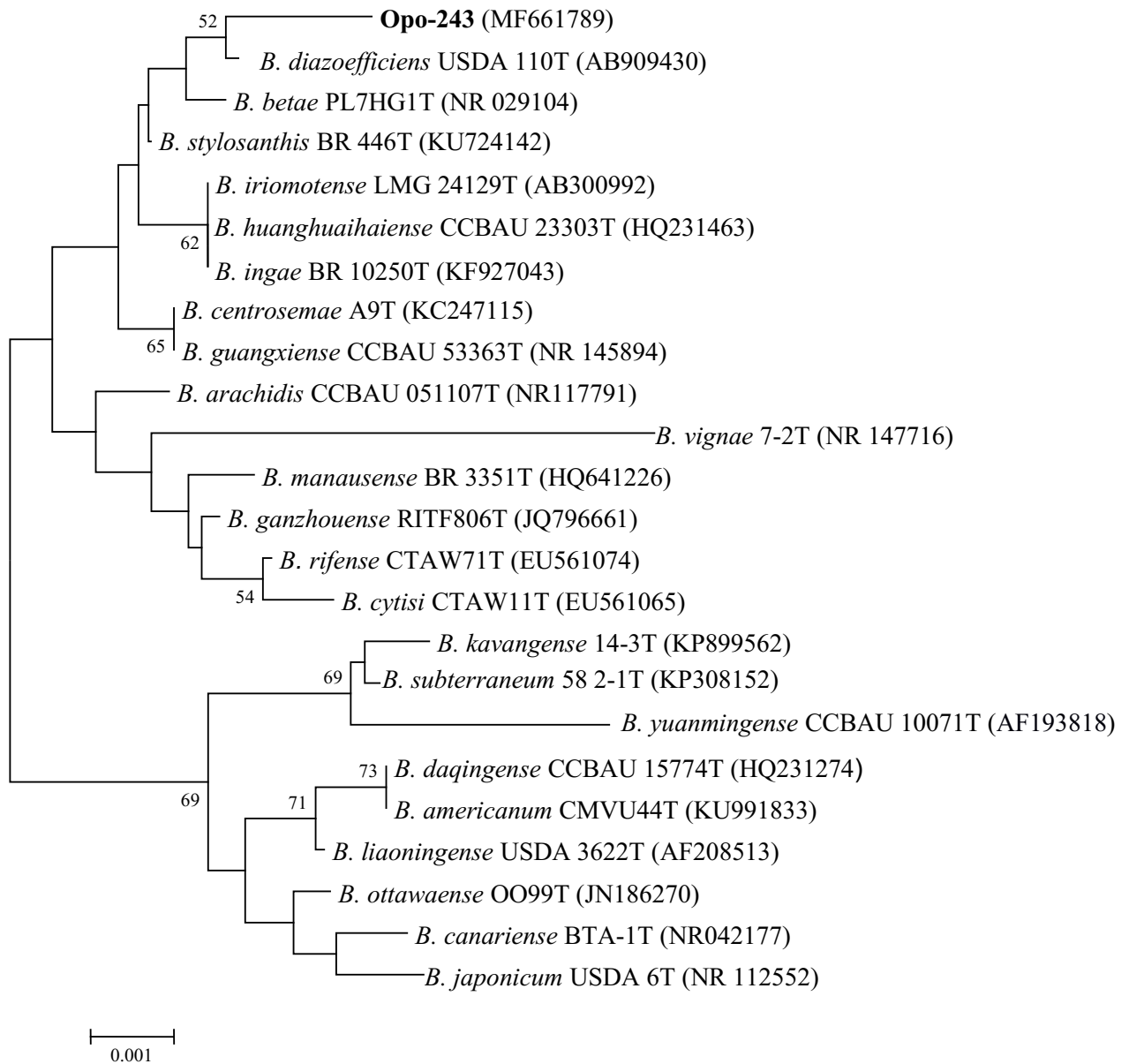


Figure 12. *Rrs*-phylogram demonstrating the taxonomic position of the Opo-243 isolate and closely related *Bradyrhizobium* species. Type strains are marked with the letter "T". The number of the isolate is shown in bold type. The scale corresponds to 0.001 substitutions per 100 bp (evolutionary distances). Numbers indicate the statistical significance of clustering (in %) determined by bootstrap analysis of 1000 alternative trees.

Nevertheless, the low level of support (52%) indicates a significant difference between these strains. The percentage of similarity in the *rrs* gene between the Opo-243 isolate and the nearest type strain *B. diazoefficiens* USDA 110T was 99.48% (Table 7).

Table 7. Sequence similarity between *Bradyrhizobium* sp. strain Opo-243 and type strains of the closest species. 1 - *B. diazoefficiens* USDA 110T, 2 - *B. japonicum* USDA 6T, 3 - *B. canariense* BTA-1T, 4 - *B. betae* LMG 21987T, 5 - *B. rifense* CTAW71T, 6 - *B. cytisi* CTAW11T.

Locus	Sequence similarity					
	1	2	3	4	5	6
<i>rrs</i>	99.48	99.15	99.34	99.75	99.53	99.43
ITS	91.96	91.14	91.75	95.17	95.69	94.19
<i>recA</i>	95.14	94.56	94.52	94.69	94.00	94.84
<i>glnII</i>	95.32	96.23	94.11	94.19	95.91	95.91
<i>rpoB</i>	95.83	95.69	93.51	95.83	94.72	96.38

To more precisely determine the taxonomic position of the Opo-243 isolate, the ITS region as well as *recA*, *glnII*, and *rpoB* genes obtained by whole-genome sequencing were analyzed in addition to the *rrs* gene. The ITS phylogram showed that the Opo-243 isolate forms a separate cluster I at 98% support with the type strains *B. japonicum* USDA 6, *B. canariense* BTA-1T, *B. diazoefficiens* USDA 110T, *B. betae* LMG 21987T, *B. rifense* CTAW71T and *B. cytisi* CTAW11T (Figure 13).

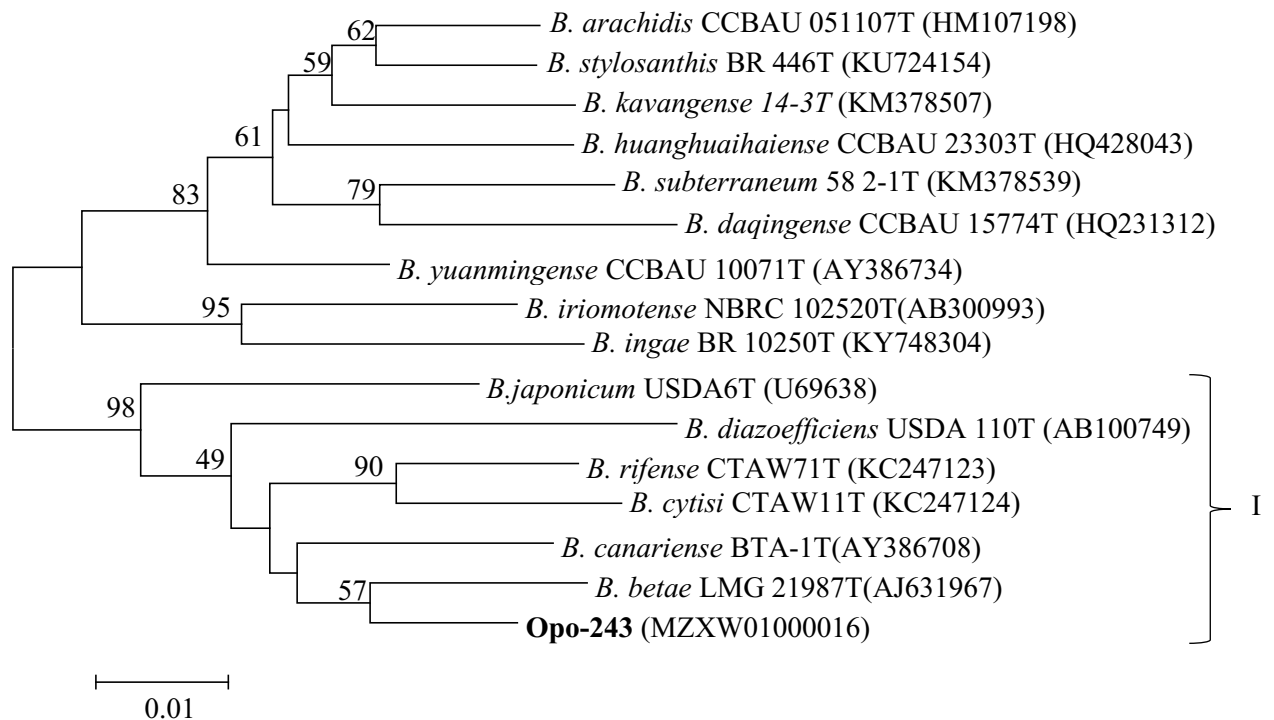


Figure 13. ITS-phylogram demonstrating the taxonomic position of the Opo-243 isolate and closely related *Bradyrhizobium* species. Type strains are marked with the letter "T". The number of the isolate is shown in bold type. The scale corresponds to 0.01 substitutions per 100 bp (evolutionary distances). Numbers indicate the statistical significance of clustering (in %) determined by bootstrap analysis of 1000 alternative trees.

A phylogram based on the concatenated *recA*, *glnII*, and *rpoB* genes showed that the Oro-243 isolate is the closest to the *B. canariense* BTA1T, *B. rifense* CTAW71T, and *B. cytisi* CTAW11T type strains (Figure 14).

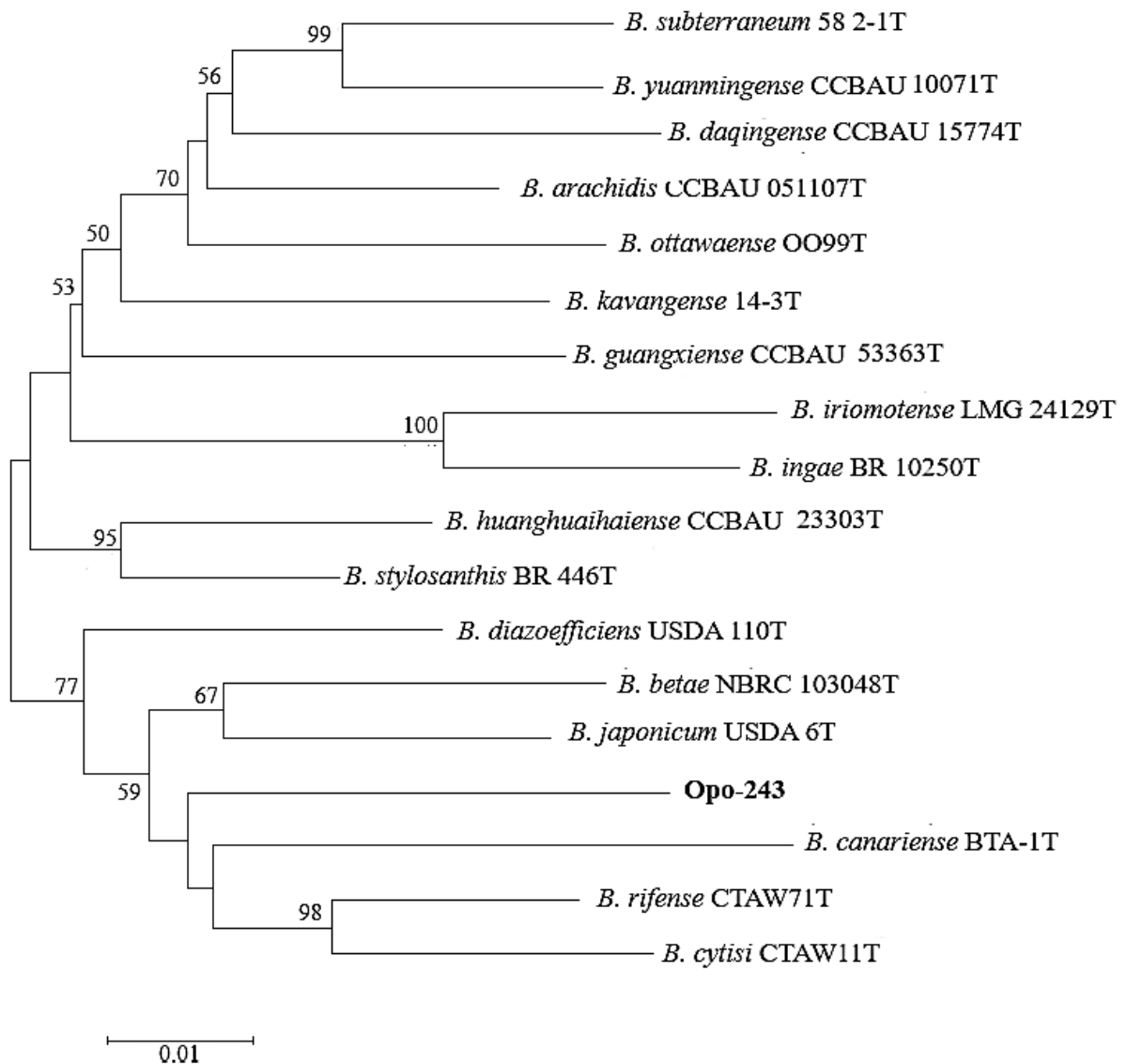


Figure 14. Phylogram based on united sequences of *recA*, *glnII*, and *rpoB* genes reflecting the taxonomic position of the Opo-243 isolate and closely related

Bradyrhizobium species. Neighbour-Joining method. Type strains are marked with a "T". The number of the isolate is shown in bold type. The scale corresponds to 0.01 substitutions per 100 bp (evolutionary distances). Numbers indicate the statistical significance of clustering (in %) determined by bootstrap analysis of 1000 alternative trees.

The percentages of homology for the ITS region and *recA*, *glnII*, *rpoB* genes between the isolated Opo-243 strain and the type strains mentioned above are shown in Table 7. Due to the low percent similarity of the *rrs*, *recA*, *glnII*, *rpoB*, and ITS region genes with the closest type strains, the isolate Opo-243 was identified as *Bradyrhizobium* sp. The percentages of homology for the ITS region and *recA*, *glnII*, *rpoB* genes between the isolated Opo-243 strain and the type strains mentioned above are shown in Table 7. Due to the low percent similarity of the *rrs*, *recA*, *glnII*, *rpoB*, and ITS region genes with the closest type strains, the isolate Opo-243 was identified as *Bradyrhizobium* sp.

There were also found representatives of genera: *Acetobacter* (family *Acetobacteraceae*), *Acinetobacter* (fam. *Moraxellaceae*), *Burkholderia* (fam. *Burkholderiaceae*), *Microbacterium* (fam. *Microbacteriaceae*), *Sphingobacterium* (fam. *Sphingobacteriaceae*) and *Sphingobacterium* sp. (fam. *Sphingobacteriaceae*), *Stenotrophomonas* (fam. *Xanthomonadaceae*) - 1 strain each; *Bacillus* (fam. *Bacillaceae*) - 2 strains; *Sphingomonas* (fam. *Sphingomonadaceae*) - 3 strains (Supplement 2.4.1 and 2.4.2).

Among microsymbionts belonging to the order *Rhizobiales*, representatives of genera *Rhizobium*, *Phyllobacterium*, *Mesorhizobium*, *Bosea* and *Bradyrhizobium* were found (Table 8).

Table 8. Species of microorganisms of the order *Rhizobiales* isolated from the nodules of *Oxytropis popoviana* Peschkova.

Family/Species	Strains	Total
Family <i>Rhizobiaceae</i>:		7
<i>Rhizobium lusitanum</i>	Opo-157, Opo-161, Opo-234,	3
<i>Rhizobium</i> sp.	Opo-8, Opo-169, Opo-247	3
<i>Neorhizobium galegae</i>	Opo-7	1

Family Phyllobacteriaceae:		23
<i>Phyllobacterium ifriqiyense</i>	Opo-5	1
<i>Phyllobacterium trifolli</i>	Opo-160	1
<i>Mesorhizobium kowhail</i>	Opo-324	1
<i>M. japonicum</i>	Opo-235, Opo-242	2
<i>Mesorhizobium sp.</i>	Opo-223, Opo-224, Opo-225, Opo-227, Opo-228, Opo-229, Opo-238, Opo-239, Opo-240, Opo-245, Opo-246, Opo-248, Opo-249, Opo-251, Opo-252, Opo-254, Opo-325, Opo-326	18
Family Boseaceae:		1
<i>Bosea vaviloviae</i>	Opo-230	1
Family Bradyrhizobiaceae:		1
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Opo-243	1

The dominant number of the studied isolates is assigned to the genus *Mesorhizobium*; among them, the species *M. japonicum*, which was previously described as a microsymbiont of *Lotus* L. [157] and *M. kowhail*, a microsymbiont of *Sophora* L. [108]. In the literature, representatives of the genus *Mesorhizobium* are described as the predominant bacteria that nodulate plants of the genus *Oxytropis*, whereas the genera *Rhizobium*, *Sinorhizobium* and *Bradyrhizobium* were classified as minor microsymbionts [85,145].

The species *B. vaviloviae* was first isolated from the nodules of the relic plant *Vavilovia formosa* (Steven) Fed. (North Caucasus, RF) in 2014 [180]; it was also found in the nodules of narrowly endemic legume species *O. pumilio* (Pall.) Ledeb, *O. erecta* Kom., *O. anadyrensis* Vass., and *O. kamtschatica* Hultén growing on the Kamchatka Peninsula (Russian Federation) [182]. In this work, it was found in the nodules of relic legumes *O. popoviana* and *A. chorinensis* (Baikal region, Russian Federation). Probably, this species belongs to the primitive microsymbionts that can enter into low-specific relationships with a wide range of plants.

Thus, the study of microsymbionts of the relic species *O. popoviana* has shown their unusually wide genetic diversity [176].

2.1.5 Species diversity of microsymbionts of the *Astragalus chorinensis* Bunge

Astragalus chorinensis belongs to the tribe *Galegeae* Dumort, subtribe *Astragalinae* DC., genus *Astragalus* L. It is a perennial herbaceous plant with a tap root and developed caudex. There may be several stems, which are ascending, 2-20 cm in height. Leaflets are linear-lanceolate, 4-5 (6) pairs, 8-25 mm long, naked, less often squarrose-white-haired. Flowers (6-12) in dense short racemes. Corolla white or light yellow, 14-15 mm long, with purple spot at end of raceme. Pods globular, inflated, on a short peduncle, finely webbed, deflexed or slightly drooping. Grows in steppes on stony and rubbly slopes, on sands [77]. It is a local endemic of Priolkhonye and southwestern Transbaikalia; it is listed in the Red Book of Buryatia [34]. A relict of the ancient Mediterranean Miocene-Pliocene flora [65].

During the expedition to the Republic of Buryatia, soil samples and seeds of *A. chorinensis* were collected. Under laboratory conditions, 34 nodules were obtained (Table 1). From them, 40 strains were isolated, 28 of which were selected for further identification. Preliminary phylogenetic analysis of 21 strains performed by RFLP analysis of ITS-region revealed that strains form 8 groups with different types of profiles (Figure 15).

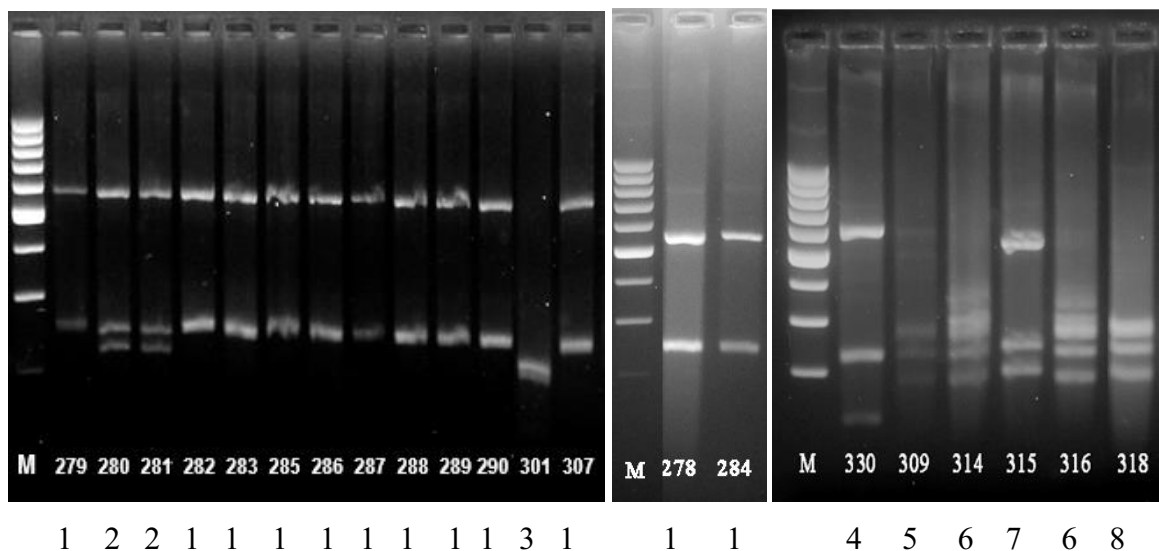


Figure 15. ITS-RFLP electrophoregrams of the analysis of 21 strains isolated from the nodules of *Astragalus chorinensis*. Restrictase MspI. M - DNA length marker 100-bp GeneRuler™; 1-8 - ITS-RFLP profile types.

In order to determine the the taxonomic belonging of the representatives of the identified groups of microorganisms and seven additional isolates taken (without ITS-RFLP profiles), *rrs* gene sequencing and comparative analysis with similar sequences deposited in the GenBank database were performed.

One strain, Ach-301, was fast-growing, colonies appeared on YMSA medium on day 3, and was assigned to the species *Rhizobium lusitanum* (similarity with the type strain *R. lusitanum* P1-7T in the *rrs* gene was 99.7%). The identification by *rrs* gene sequencing of 27 isolates whose colonies appeared on YMSA medium on day 5 showed that 12 of them (belonging to ITS-RFLP profile type 1) belonged to the species *Bosea vaviloviae* (*rrs* gene similarity with the type strain *B. vaviloviae* Vaf-18T was 99.7%). The identification of eight rhizobial strains (Ach-304, Ach-305, Ach-313, Ach-318, Ach-320, Ach-328, Ach-343, and Ach-347) by the sequencing of *rrs* gene showed that they belonged to different species of the genus *Mesorhizobium*. Rrs-phylogram reflecting the taxonomic position of the studied isolates and typical strains of the genus *Mesorhizobium* is shown in Figure 16.

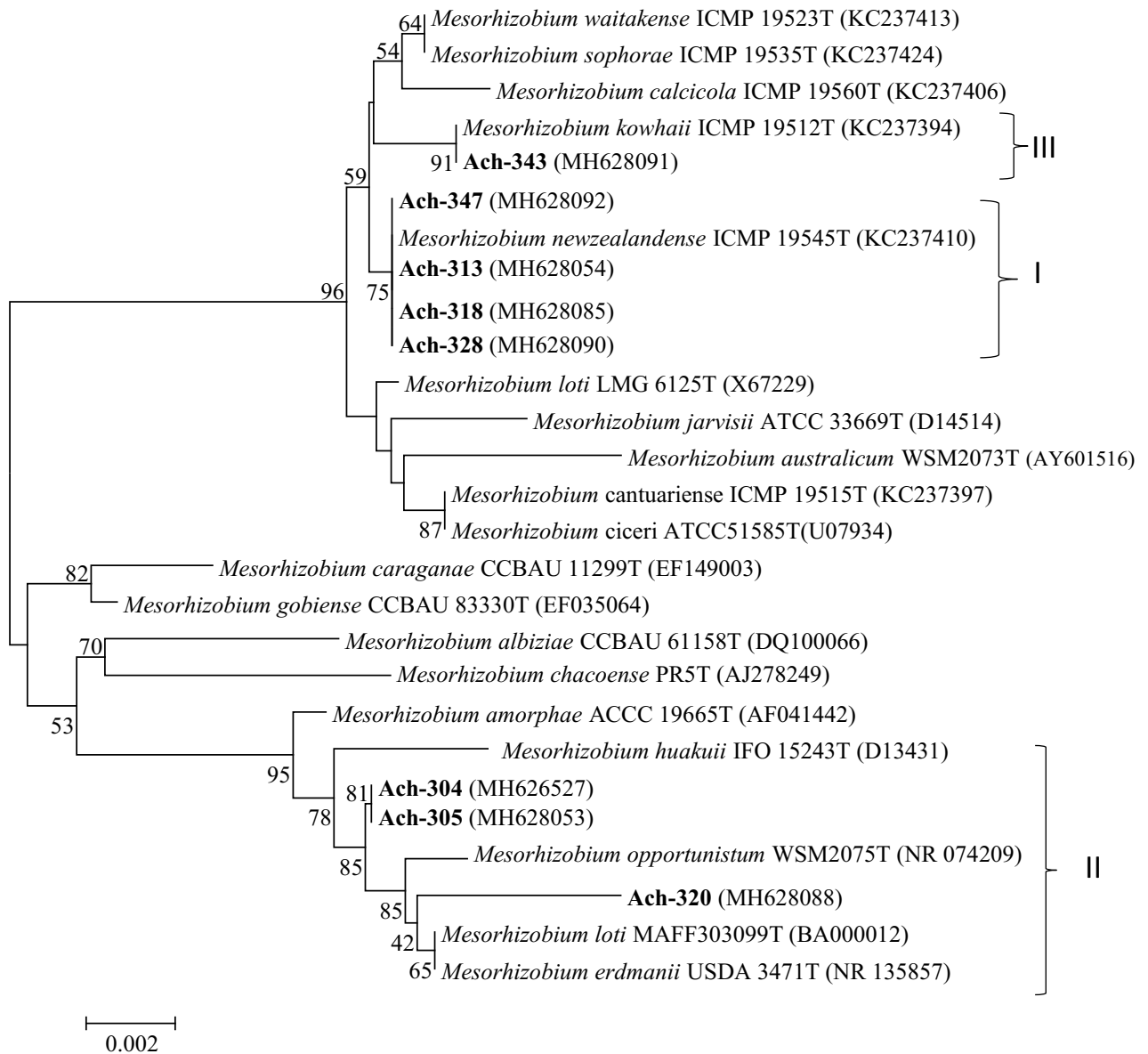


Figure 16. Phylogenetic tree generated by the Neighbor-Joining method using partial *rrs* gene sequences of the *Mesorhizobium*-related isolates from *Astragalus chorinensis* and closely related species. Type strains are indicated by the letter "T." The number of the isolate is shown in bold type. I - III - statistically significantly different clusters. Scale accords to 0.002 substitutions per 100 bp. (evolutionary distances). The numbers indicate the statistical significance of clustering (in %), determined using bootstrap analysis of 1000 alternative trees.

The isolates Ach-313, Ach-318, Ach-328 and Ach-347 formed a separate cluster I with the type strain *M. newzealandense* ICMP 19545T and had 100% *rrs* similarity with this type strain. The cluster support level was 75% (Figure 16). We preliminarily classified the isolates Ach-313, Ach-318, Ach-328 and Ach-347 as *M. newzealandense*.

The isolates Ach-304 and Ach-305 grouped together and were the closest to the type strain *M. huakuii* IFO 5243T with 99.9% *rrs* similarity (cluster II, support level 78%). Thus, the isolates Ach-304 and Ach-305 were assigned to the species *M. huakuii*.

Ach-343 formed the high supported cluster III (support level 91%) with the type strain *M. kowhii* ICMP 19512T (99.9% *rrs* similarity) while the isolate Ach-320 was the most closely related to the species *M. japonicum* (99.5% with the type strain MAFF 303099T). Thus, the isolates Ach-343 was assigned to the species *M. kowhii* and the isolate Ach-320 without species definition.

Another seven strains, Ach-280, Ach-281, Ach-309, Ach-314, Ach-315, Ach-316, and Ach-330, were also identified only to the genus and described as *Mesorhizobium* sp. because they had a low degree of similarity in the *rrs* gene with the nearest type strains. Isolates Ach-280 and Ach-281 (belonging to the type 2 ITS-RFLP profile) were closest to the type strains *M. norvegicum* 10.2.2T and *M. loti* LMG 6125T (the similarity degree of the Ach-280 isolate with both type strains was 99.3%). Strains Ach-309 and Ach-330 (types 5 and 4 ITS-RFLP profiles, respectively), and Ach-314 (sharing type 6 ITS-RFLP profile with strain Ach-316) were the closest to the type strain *M. jarvisii* ATCC 33669T - the degree of similarity was 99.2 to 99.4%. The Ach-315 isolate had 99.5% similarity in the *rrs* gene with the closest type strain *M. australicum* WSM2073T (Supplement 2.5).

Thus, it was shown that *A. chorinensis* can also enter into symbiotic relationships with various species of microorganisms of the families *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, and *Boseaceae*. However, the greatest species diversity was observed within the genus *Mesorhizobium* (Table 9).

Table 9. Species of microorganisms of the order *Rhizobiales* isolated from the nodules of *Astragalus chorinensis* Bunge.

Family/Species	Strains	Total
Family <i>Rhizobiaceae</i>:		1
<i>Rhizobium lusitanum</i>	Ach-301	1
Family <i>Phyllobacteriaceae</i>:		15
<i>Mesorhizobium newzealandense</i>	Ach-313, Ach-318, Ach-328, Ach-347	4
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	Ach-304, Ach-305	2

<i>Mesorhizobium kowhii</i>	Ach-343	1
<i>Mesorhizobium sp.</i>	Ach-280, Ach-281, Ach-309, Ach-314, Ach-315, Ach-316, Ach-320, Ach-330	8
Family Boseaceae:		12
<i>Bosea vaviloviae</i>	Ach-278, Ach-279, Ach-282, Ach-283, Ach-284, Ach-285, Ach-286, Ach-287, Ach-288, Ach-289, Ach-290, Ach-307	12

The species *M. newzealandense* and *M. kowhii* were recently described as microsymbionts of New Zealand endemic species *Sophora prostrata* Buchanan and *Sophora microphylla* Aiton [108]. The rhizobial species *M. huakuii* being described long ago [100] was up to now known as a specific microsymbiont of the plant species *Astragalus sinicus* L. [121, 136]. Strains belonging to *M. septentrionale* and *M. temperatum* species, as well as representatives of *Agrobacterium*, *Rhizobium*, and *Sinorhizobium* genera, were isolated from the nodules of other species, for example, *Astragalus adsurgens* Pall. [122]. Among the microsymbionts of *Astragalus scaberrimus* Bunge, the species *M. amorphae* was described [138]. Literature data on microsymbionts of the genus *Astragalus* L. confirm the wide diversity of these microorganisms, which belong to different genera of the order *Rhizobiales*: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Mesorhizobium* [61, 122, 145, 202]. Obviously, plants of the genus *Astragalus* are not strict symbionts; the predominance of certain groups of microsymbionts in *A. chorinensis* may be related to the growing conditions (stony, mostly southern slopes, river banks, pebbles). Probably, representatives of the genus *Mesorhizobium* are more adapted to such conditions of existence.

2.2 Symbiotic genes of isolates

Symbiotic gene analysis was necessary to determine the role of different isolates isolated from the same nodule in the formation of symbiotic relationships between the microorganisms and the plant. For this, 6 pairs of co-microsymbionts belonging to different bacterial taxa were selected. Three pairs were isolated from *O. triphylla*, two pairs from *O. popoviana*, and one pair from *A. chorinensis*. The results of the search for

symbiotic genes *nod*, *fix*, *nif*, *noe* and *nol* showed significant differences between the isolates: some of them had single symbiotic genes, while other isolates had a fairly complete set of genes for the successful formation of symbiosis. The results obtained are presented in the form of a Table 10.

Table 10. Genes responsible for the formation and functioning of symbiosis (*nod*, *fix*, *nif*, *noe* and *nol*) in 6 pairs of co-microsymbionts belonging to different rhizobial taxa and isolated from *O. triphylla*, *O. popoviana* and *A. chorinensis* plants. Each pair of isolates was isolated from one nodule.

Host plant	Pairs of isolates	Genus, species	Symbiotic genes				
			<i>nod</i>	<i>nif</i>	<i>fix</i>	<i>nol</i>	<i>noe</i>
<i>O. triphylla</i>	Tri-38	<i>Phyllobacterium zundukense</i>	<i>GNPQ</i>	-	-	-	-
	Tri-39	<i>Bosea vestrisii</i>	-	-	-	-	-
	Tri-48	<i>Phyllobacterium zundukense</i>	<i>GMNPQ</i> <i>VW</i>	-	<i>NO</i>	-	-
	Tri-49	<i>Bosea vestrisii</i>	<i>MPQ</i>	-	<i>JL</i>	<i>O</i>	-
	Tri-43	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. viciae</i>	-	<i>LS</i>	-	-	<i>KJ</i>
	Tri-44	<i>Bosea vestrisii</i>	-	-	-	-	-
	Opo-242	<i>M. japonicum</i>	<i>ABCDE</i> <i>FIJGNL</i> <i>MTZ</i>	<i>ABHDK</i> <i>ENQTZX</i> <i>WSU</i>	<i>ABCXGHI</i> <i>SJKLNOP</i> <i>Q</i>	-	<i>K</i>
	Opo-243	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>GNPQT</i>	<i>LS</i>	<i>GHISJKL</i> <i>NOPOQ</i>	<i>K</i>	<i>L</i>
Opo-234	<i>Rhizobium lusitanum</i>	<i>GMNPQ</i> <i>T</i>	-	<i>AB</i>	<i>L</i>	<i>K</i>	
Opo-235	<i>M. japonicum</i>	<i>ABCDE</i> <i>FIJLPQ</i> <i>TWZ</i>	<i>ABHDK</i> <i>ENTZXV</i> <i>WS</i>	<i>ABCXGHI</i> <i>SJKLNOP</i> <i>Q</i>	<i>L</i>	<i>K</i>	
<i>A. chorinensis</i>	Ach-343	<i>Mesorhizobium kowhii</i>	<i>ABCDE</i> <i>FIJGNL</i> <i>MPOZ</i>	<i>ABHDK</i> <i>ENQTZX</i> <i>WS</i>	<i>ABCXGHI</i> <i>SNOPOQ</i>	-	-
	Ach-307	<i>Bosea vaviloviae</i>	<i>MT</i>	<i>U</i>	<i>ABR</i>	<i>L</i>	-

Isolates of *M. japonicum* Opo-242, *M. japonicum* Opo-235 and *M. kowhii* Ach-343 shared the *nodABC* genes necessary for nodulation [201] and some other *nod*, *nol*

and *noe* genes involved in the biosynthesis, modification and transport of rhizobial Nod factors (NFs) [86, 152, 153, 167], as well as the *nif* and *fix* genes required for nitrogen fixation: the *nifHDK* and *nifENB* genes encoding the structural and catalytic components of the nitrogenase complex [112], as well as the *fixABCX*, *fixNOPQ* and *fixGHIS* genes involved in the transfer electrons to nitrogenase and the oxidase complex [116, 119]. The strain *Bradyrhizobium* sp. Opo-243 did not contain the main genes *nod*, *nif* and *fix*, but some other symbiotic genes were found: *nodNTGPQ*, *nifLS*, *fixNOPQGHISJKL*, *nolK* and *noeL*.

Tri-38 and Tri-48T isolates, belonging to the new species *Phyllobacterium zundukense*, also lacked common *nodABC* genes, however, individual symbiotic genes with chromosomal localization were found: *nodG*, *nodM*, *nodN*, *nodPQ*, *nodVW*, *fixN*, *fixO* genes - in strain Tri-48T; *nodG*, *nodN*, *nodPQ* genes – in strain Tri-38. These genes, in particular *nodG*, *nodM* and *nodN*, encode the following enzymes that are involved in the biosynthesis and modification of NFs: 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase [152], glucosamine synthase [91, 151] and dehydratase [91], the *nodPQ* genes are responsible for the synthesis of the sulfate group donor by the complex of ATP sulfurylase (*nodP*) and APS kinase (*nodQ*), while the *nodVW* genes are responsible for the transcriptional regulation of the *nod/nol/noe* genes [66]. And the *fixN*, *fixO* genes are involved in the transfer of electrons to nitrogenase and the oxidase complex [116, 119].

From this we can suggest that strains lacking basic nodulation genes follow nodule-forming rhizobia during symbiosis formation and participate in the formation of a multicomponent symbiotic system. The simultaneous presence on the roots of co-microsymbionts, which may have complementary symbiotic genes, may also affect the efficiency of symbiotic relationships with relict species of leguminous plants.

2.3 Symbiotic gene complementations, efficiency, and host specificity of isolates

To study the phenomenon of complementation of symbiotic genes in rhizobial co-microsymbionts, 2 pairs of isolates were selected: *M. japonicum* Opo-242 and

Bradyrhizobium sp. Opo-243 (isolated from one nodule on *O. popoviana*), as well as *M. kowhii* Ach-343 and *M. japonicum* Opo-235 (isolated from nodules on *A. chorinensis* and *O. popoviana*, respectively). The Opo-242 isolate had the main *nod*, *nif*, and *fix* genes; the paired Opo-243 strain did not have them, but contained 5 additional genes (*nodPQ*, *nifL*, *nolK*, and *noeL*) that affect the specificity of plant-microbial interactions through modification of NFs (Table 11). The *nolK* and *noeL* genes are responsible for the fucosylation of NFs [139, 159], while the *nodPQ* genes are involved in their sulfation [173]. Previously, it was shown that mutations in these four genes lead to the inability of rhizobia to enter into symbiosis with the host plant or significantly reduce competitiveness [146, 188, 201].

The second pair of isolates (*M. kowhii* Ach-343 and *M. japonicum* Opo-235) were selected as having the highest number of complementary loci: the Ach-343 isolate contained additional *nodG*, *nodM*, *nodN*, and *nifQ* genes, while the *nodT*, *nodW*, *nifV* and *fixJKL* genes were only present in the Opo-235 isolate. In addition, the Opo-235 strain had two additional genes for modifying NFs that are absent in Ach-343: the *noeK* gene, which is involved in fucosylation [146] and the *nolL* gene, which is involved in the acetylation of the fucosyl residue [104] (Table 11).

Table 11. Strains isolated from nodules of *O. popoviana* (*M. japonicum* Opo-242, Opo-235, *Bradyrhizobium* sp. Opo-243) and *A. chorinensis* (*M. kowhii* Ach-343) with different sets of symbiotic genes and selected for microvegetation experiments. A pair of Opo-242 and Opo-243 isolates was isolated from one nodule, Ach-343 and Opo-235 isolates were isolated from nodules of different plants. The genes missing in the paired isolate are marked in square brackets.

Pairs of isolates	Symbiotic genes				
	<i>nod</i>	<i>nif</i>	<i>fix</i>	<i>nol</i>	<i>noe</i>
Opo-242	[ABCDEFGHIJ]GN[L M]T[Z]	[ABHDKENQTZ XW]S[U]	[ABCX]GHISJ KLNOPQ	-	[K]
Opo-243	GN[PQ]T	[L]S	GHISJKLNOP Q	[K]	[L]
Ach-343				-	-

	ABCDEFGHIJ[GN]L[M]PQZ	ABHDKEN[Q]TZXWS	ABCXGHISNO PQ		
Opo-235	ABCDEFGHIJLPQ[TW]Z	ABHDKENTZX[V]WS	ABCXGHIS[JKL]NOPQ	[L]	[K]

Vegetation Experience # 1

Symbiotic phenotype of the isolates Opo-242 and Opo-243 was studied in sterile plant nodulation assay with *O. popoviana* plants using treatments of mono- and co-inoculation. Results of nodulation rate after inoculation with a single strains and co-inoculation with both strains are present in Table 12.

Table 12. Effect of mono- and co-inoculation of *O. popoviana* plants with *M. japonicum* Opo-242 and *Bradyrhizobium* sp. Opo-243 under sterile growing assay. The Opo-243 isolate does not form nodules. Data are means \pm SD, n = 12. Symbols: DW- dry weight; *- various letters show significant differences between inoculation variants (LSD test, P<0.05).

Inoculation variant	Seedling biomass, mg DW plant ⁻¹	Root biomass, mg DW plant ⁻¹	Acetylene reductase activity, nmol C ₂ H ₄ plant ⁻¹ hour ⁻¹
Control without inoculation	2.2 \pm 0.3 a*	0.7 \pm 0.2 a	0.1 \pm 0.02 a
Opo-243	2.3 \pm 0.2 a	0.6 \pm 0.1 a	0.1 \pm 0.01 a
Opo-242	2.8 \pm 0.2 ab	1.0 \pm 0.1 b	2.1 \pm 0.4 b
Opo-242 + Opo-243	3.2 \pm 0.3 b	1.2 \pm 0.2 b	2.3 \pm 0.3 b

As expected, nitrogen-fixing nodules were observed in two variants of inoculation: with the Opo-242 isolate and in the variant of co-inoculation with both strains. The strain *Bradyrhizobium* sp. Opo-243 could not form nodules on its own, however, after co-inoculation with *M. japonicum* Opo-242 isolate, the rate of formation and size of nodules increased significantly. Nodulation rate results after inoculation with Opo-242 and co-inoculation with both strains are shown in the Figure 17.

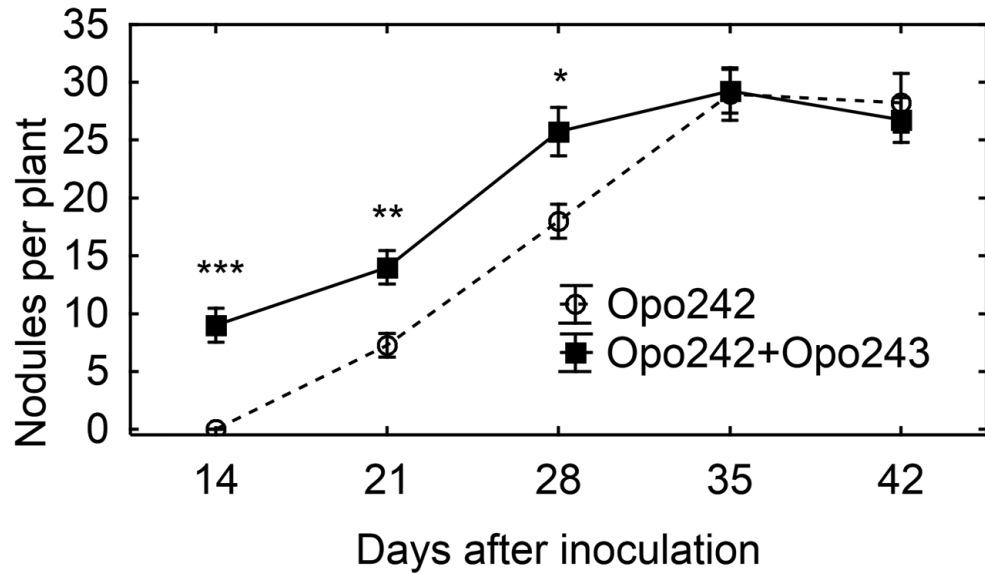


Figure 17. Nodule formation on *O. popoviana* roots after mono- and co-inoculation with isolates Opo-242 and Opo-243 in the sterile plant nodulation assays. Asterisks indicate probability at $P < 0.0001$ (***), $P < 0.001$ (**), and $P < 0.05$ (*), respectively (Student's t-test). Data from two experiments in 6-fold replication.

A simultaneous inoculation with strains Opo-242 and Opo-243 increased the nodulation rate as compared with a single strain Opo-242: the first nodules appeared after 2 weeks, while the isolate Opo-242 alone induced nodule formation after 3 weeks only. The number of nodules significantly increased in the course of experiment and stabilized after 4 weeks in case of co-inoculation and after 5 weeks when plants were inoculated with single Opo-242 (Figure 17). It can be assumed that the presence of *nodK*, *noeL* and *nodPG* genes in the strain Opo-243 were involved in the modification of NFs and triggered the nodulation process. The strains re-isolated from nodules, as estimated by 16S rDNA sequencing, corresponded to those used for inoculation. The ratio of the strains Opo-242 and Opo-243 in nodules was approximately 20 to 1. It is yet unknown how the isolate Opo-243 penetrated into nodules. However, it was shown that some *Bradyrhizobium* related strains having no common *nodABC* genes infected the tropical legume plants *Aeschynomene* spp. through epidermal fissures via the "crack-entry" process [126, 161, 166]. Pictures of nodules obtained in the sterile assay after 2, 4 and 6 weeks of plant vegetation are presented in the Figure 18.

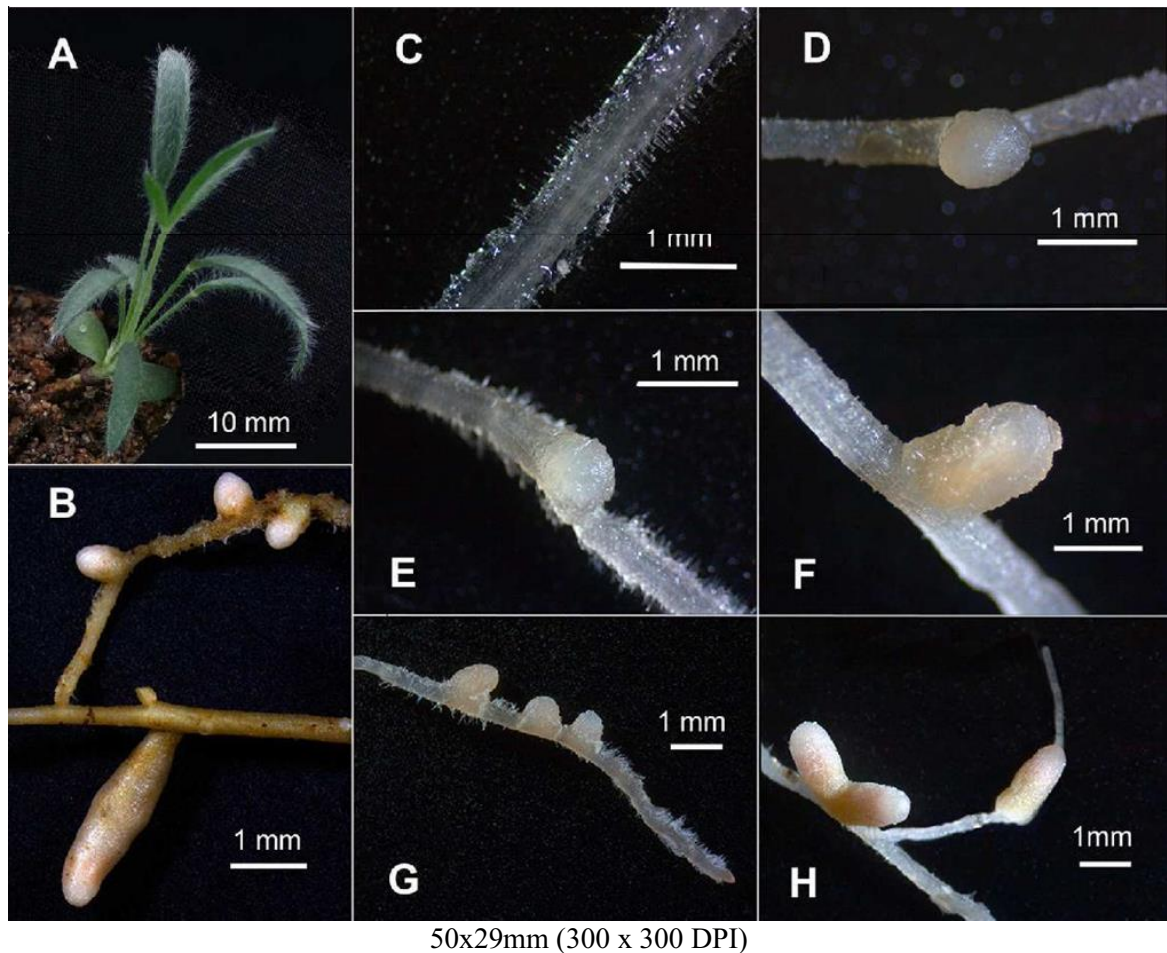


Figure 18. Pictures of *O. popoviana* plant and root nodules in pot experiment (A, B) and after 2, 4 and 6 weeks of cultivation (C - H): C, E, G – monoinoculation with isolate Opo-242; B, D, F, H – co-inoculation with isolates Opo-242 и Opo-243; C, D – after 2 weeks; E, F – after 4 weeks; B, G, H – after 6 weeks of cultivation.

The shape of nodules was round in the early stages (Figure 18. Picture D, E), but later on they were more elongated with predominantly one brunch (Figure 18. Picture F - H). An obvious difference in the size of nodules was found. Nodules formed by the strain Opo-242 were about half as large as the nodules that appeared after inoculation with the mixture of strains Opo-242 and Opo-243. This phenomenon can be associated with an earlier formation of nodules in 1the co-inoculation treatment.

Thus, it has been demonstrated for the first time that strains isolated from the same nodule on the relic legume *O. popoviana* can have complementary sets of symbiotic genes, and their simultaneous presence on the roots increases the rate of nodulation [29, 176].

Vegetation Experience # 2

Symbiotic properties of the unlabeled strains *M. kowhii* Ach343 and *M. japonicum* Opo-235 as well as their fluorescent-labeled variants Ach-343(pHC60) and Opo-235(pMP4655) were preliminarily studied in gnotobiotic plant nodulation assay with their host plants *A. chorinensis* and *O. popoviana*. The Ach-343(pHC60) strain contained the pHC60 plasmid (with the coding sequence for the red fluorescent proteins mCherry), the strain Opo-235(pMP4655) contained the pMP4655 plasmid (with the green fluorescent protein gene EGFP). It was shown, that all strains nodulated both plant species, but formed low effective symbiosis with *O. popoviana* plants (no differences with uninoculated control on the plant biomass). However, they were significantly more effective on *A. chorinensis* plants, although they did not differ in any of the symbiotic parameters. No differences were found between unlabeled strains and their fluorescent-labeled variants (Table 13).

Table 13. Symbiotic properties of the unlabeled strains *M. kowhii* Ach-343 and *M. japonicum* Opo-235 as well as their fluorescent-labeled variants in gnotobiotic plant nodulation assay with their host plants *A. chorinensis* and *O. popoviana*. The data means \pm standard errors of one representative experiment ($n = 12$). Different letters show significant differences between treatments (least significant difference test, $P < 0.05$). NN stands for number of nodules (plant^{-1}), PB – plant biomass ($\text{mg fresh weight plant}^{-1}$), ARA stands for acetylene reduction activity ($\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ plant}^{-1}\text{h}^{-1}$), ND stands for not detected.

Strains for inoculation	Host plant					
	<i>A. chorinensis</i>			<i>O. popoviana</i>		
	NN	PB	ARA	NN	PB	ARA
Ach-343	2.7 \pm 0.7a	121 \pm 11a	68 \pm 23a	1.0 \pm 0.5a	68 \pm 7a	20 \pm 6a
Ach-343 (pHC60)	3.2 \pm 0.5a	142 \pm 17a	76 \pm 22a	1.2 \pm 0.7a	60 \pm 7a	22 \pm 7a
Opo-235	2.8 \pm 0.6a	146 \pm 19a	55 \pm 16a	1.6 \pm 0.6a	73 \pm 9a	16 \pm 4a
Opo-235(pMP4655)	2.5 \pm 0.7a	135 \pm 18a	70 \pm 19a	2.0 \pm 0.9a	65 \pm 6a	25 \pm 9a
Control without inoculation	ND	76 \pm 6b	ND	ND	65 \pm 8a	ND

Vegetation Experience # 3

Symbiotic phenotype of the fluorescent-labeled strains *M. kowhainii* Ach-343(pHC60) and *M. japonicum* Opo-235(pMP4655) was studied in gnotobiotic plant nodulation assay with *A. sericeocanus*, *G. uralensis*, *O. caespitosa*, *M. sativa*, and *T. pratense* plants using treatments of mono- and co-inoculation. They had significant differences in the sets of symbiotic genes and complemented each other with 12 *nod*, *nif*, *fix*, *noe* and *nol* genes (Table 11). Plant seeds were collected during expeditions to the Baikal region. *Astragalus sericeocanus* Gontsch. - a rare species endemic to the eastern coast of Lake Baikal. It is a source of valuable secondary metabolites with medicinal effects [82]. *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. - a relic of the desert Paleogene flora, one of the locations is the territory of the Baikal National Park. It is a valuable medicinal plant [11]. *Oxytropis caespitosa* Pall. - an endemic of Transbaikalia and a xerothermic relic of the Amur region, the number of which is declining as a result of changing living conditions [64]. Widespread fodder leguminous plants were also used: *Medicago sativa* L. and *Trifolium pratense* L.

The results of plant nodulation assay demonstrated that the strains Ach-343 and Opo-235 had a wide range of host plants including different species and genera of legumes from tribes *Galegeae* (*Astragalus*, *Oxytropis*, *Glycyrrhiza*) and *Trifolieae* (*Medicago*, *Trifolium*). After 2 weeks of cultivation root nodules were observed on *A. sericeocanus* roots (in all variants of inoculation) and *G. uralensis* (in the co-inoculation treatment), while after 3 weeks of cultivation only uninoculated controls had no nodules. However, the number of nodules as well as their acetylene reduction activity was different depending on the plant species and treatments: as a rule, the strain Opo-235 induced more nodules and was more active in acetylene reduction than the strain Ach-343 (Table 14).

Table 14. Effects of mono- and co-inoculation of *A. sericeocanus*, *G. uralensis*, *O. caespitosa*, *M. sativa* and *T. pratense* plants with the strains *M. kowhainii* Ach-343 and *M. japonicum* Opo-235 in the gnotobiotic plant nodulation assay. The data means \pm standard errors of one representative experiment (n = 15). Different letters show significant differences between treatments (least significant difference test, P < 0.05). NN stands for

number of nodules (plant⁻¹), PB – plant biomass (mg fresh weight plant⁻¹), ARA stands for acetylene reduction activity (nmol C₂H₄ plant⁻¹h⁻¹), ND stands for not detected.

Strains for inoculation	Host plant												
	<i>A. sericeocanus</i>			<i>G. uralensis</i>			<i>O. caespitosa</i>			<i>M. sativa</i>		<i>T. pratense</i>	
	NN	PB	AR A	NN	PB	AR A	NN	PB	AR A	NN	PB	NN	PB
Ach-343	4.4 ± 1.4a	235 ± 24ab	14 ± 4a	3.0 ± 0.7a	139 ± 10a	ND	3.3 ± 0.8a	86 ± 8a	10 ± 2a	2.6 ± 0.8a	191 ± 14a	10 ± 3a	169 ± 26a
Opo-235	9.3 ± 2.6b	384 ± 49c	216 ± 78b	1.5 ± 0.6a	159 ± 33a	6 ± 4a	5.0 ± 1.2a	121 ± 13b	31 ± 8b	1.6 ± 0.7a	188 ± 13a	25 ± 12b	189 ± 27a
Ach-343 + Opo-235	5.9 ± 1.3ab	289 ± 16b	32 ± 11a	8.0 ± 1.7b	277 ± 37b	54 ± 38b	3.5 ± 0.4a	113 ± 7b	30 ± 6b	1.9 ± 0.8a	180 ± 15a	11 ± 2a	138 ± 22a
Control without inoculation	ND	190 ± 22a	ND	ND	167 ± 21a	ND	ND	78 ± 14a	ND	ND	170 ± 14a	ND	149 ± 35a

The data showed that depending on plant species the effects of a combined inoculation with the strains Ach-343 and Opo-235 on plants varied from the decrease, no effect, to the increase in different symbiotic parameters including plant biomass as an indicator of the symbiotic effectiveness. Figure 19 illustrates this conclusion in the form of a diagram.

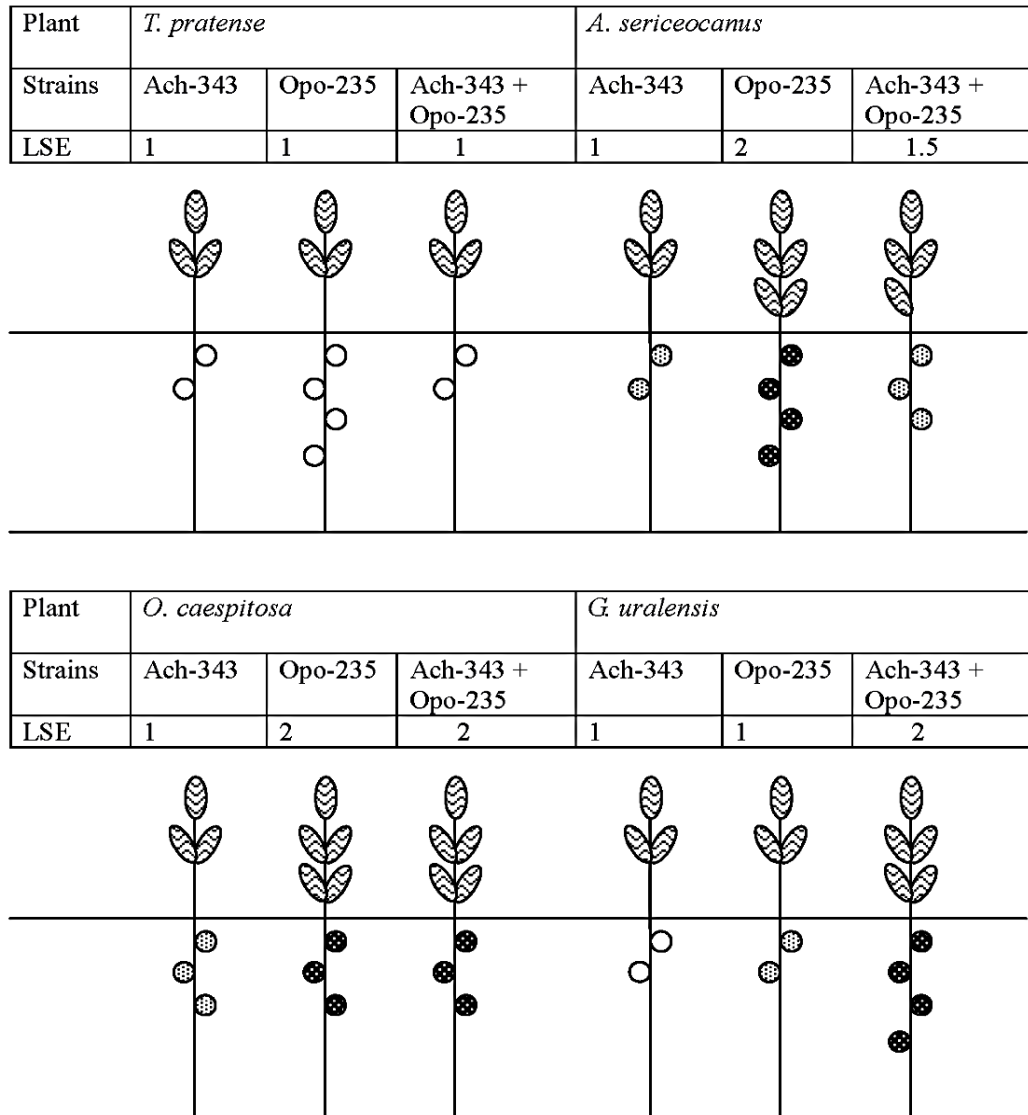


Figure 19. Diagram demonstrating the effects of co-inoculation with strains *M. kowhii* Ach-343 and *M. japonicum* Opo-235 on the effectiveness of symbioses with *T. pratense*, *A. sericeocanus*, *O. caespitosa* and *G. uralensis* plants. The strains Ach-343 and Opo-235 carried the plasmids pHC60 and pMP4655 and expressed fluorescent proteins mCherry (red) and EGFP (green), respectively. LSE stands for the conditionally level of symbiotic effectiveness (plant biomass). ○ non-active nodules, ● lower level of acetylene reduction activity, ● higher level of acetylene reduction activity.

If the symbiotic effectiveness of the strain Ach-343 is conditionally taken as level 1, the effectiveness of the strain Opo-235 may be taken as levels 1 or 2 (depending on the plant species). With this assumption the symbiotic effectiveness in the variants Ach-343 + Opo-235 can be designated as levels 1, 1.5, or 2, corresponding to the level of one co-microsymbiont (*T. pratense* and *O. caespitosa* plants), to an average level of two strains (*A. sericeocanus* plants) or to the level exceeding both strains (*G. uralensis* plants).

The most expressive example of a positive complementary interaction was the increase in all measured symbiotic parameters on *G. uralensis* plants after co-inoculation with *M. kowhainii* Ach-343 and *M. japonicum* Opo-235 strains compared to mono-inoculation with both strains. Acetylene reduction activity in *G. uralensis* nodules in the co-inoculation variant increased 9 times (Table 14). At the same time, the joint inoculation of *A. sericeocanus* plants led to a decrease in the number of nodules, a decrease in the activity of acetylene reduction and plant biomass compared to the most effective strain Opo-235. The obtained results suggest that the complementation of genes responsible for the specific modification of Nod-factors in different strains can not only increase the efficiency of host plant nodulation, but also reduce it. It is also possible that other genetic factors are involved in this process. It was shown above that the *nifQ* gene was discovered only in the strain Ach-343, while the *nifV* and *fixJKL* genes were found only in the strain Opo-235. The *nifQ* gene encodes the molybdenum ion binding protein with reductase activity that is known as a specific molybdenum donor for FeMo cofactor biosynthesis and the incorporation of reduced molybdenum in the Mo^{IV} oxidation state into nitrogenase [132]. The *nifV* gene is required for a maturation of the nitrogenase MoFe-protein through the homocitrate synthesis [117]; the *fixJKL* genes are important for expression of some *nif* and *fix* genes [119]. However, the mechanisms of complementation between *nif* and *fix* genes localized in different co-microsymbionts inside the same nodule are not clear. Apparently, the alteration of symbiotic activity may occur due to secreted products of these (or some other) genes, extracellular metabolites or any factors released as a result of bacteroid degradation. One the possible way of such complementation having a positive effect on the nitrogen-fixing activity of symbiosis is an increase in the amount of reduced molybdenum required for high nitrogenase activity and provided by the special Mo-binding proteins.

Localization and co-localization of the fluorescent-labeled strains *M. kowhainii* Ach-343(pHC60) and *M. japonicum* Opo-235(pMP4655) in nodules obtained in the plant nodulation assay was analyzed by the confocal microscopy (Figures 20, 21).

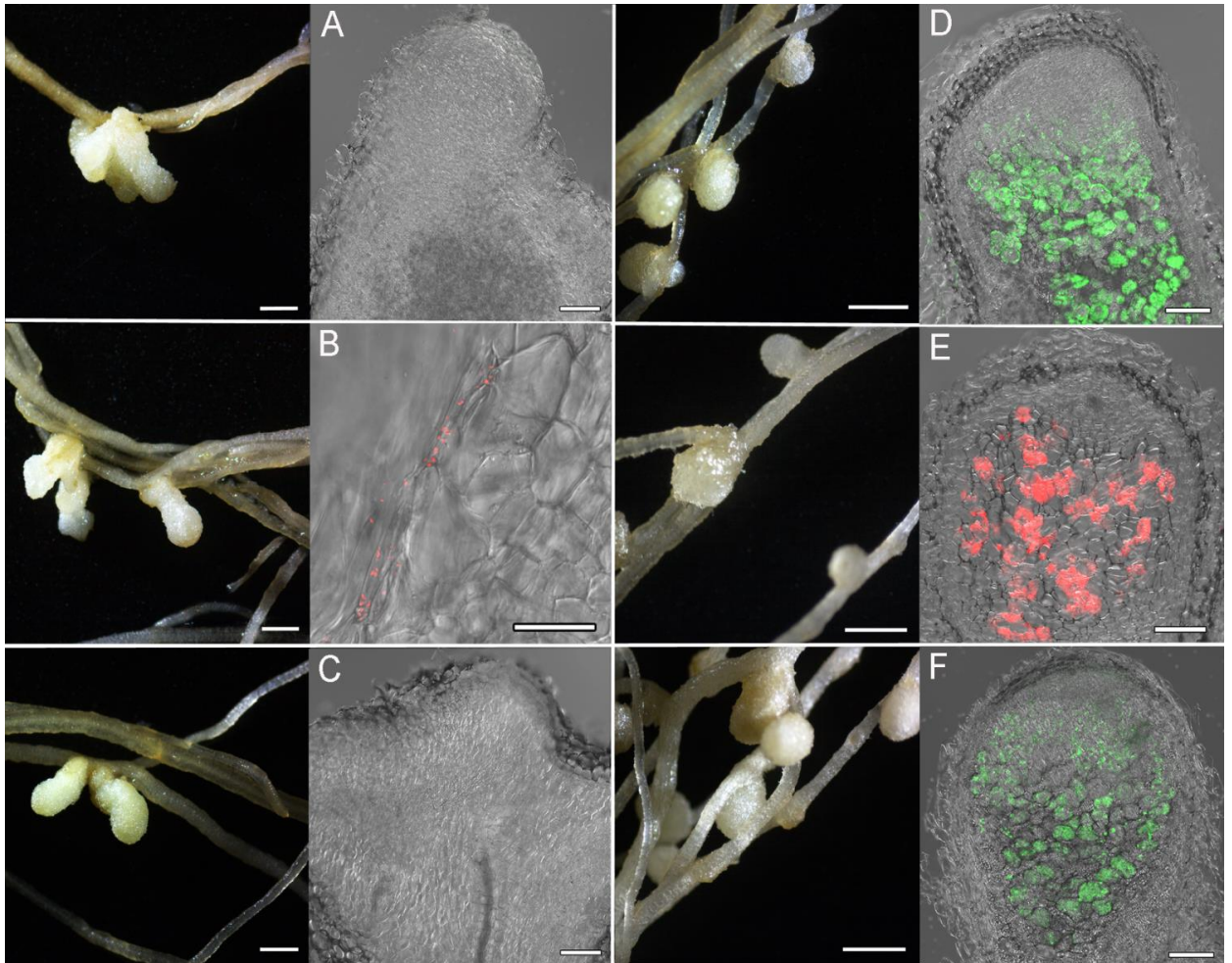


Figure 20. Pictures of root nodules formed by the fluorescent-labeled strains *M. kowhii* Ach-343(pHC60) and *M. japonicum* Opo-235(pMP4655) on the *M. sativa* and *T. pratense* plants in gnotobiotic nodulation assay. Plant species: A–C – *M. sativa*; D–F – *T. pratense*. Inoculation treatment: A, D – Opo-235, merge of differential interference contrast (DIC) and green channel; B, E – Ach-343, merge of DIC and red channel; C, F – Opo-235 + Ach-343, merge of DIC, green and red channels. Columns 1 and 3 present the general views of nodules and root surface (scale bar = 1 mm), columns 2 and 4 – the confocal microscopy images (scale bar = 100 μ m). Opo-235 bacteria in green, Ach-343 bacteria in red.

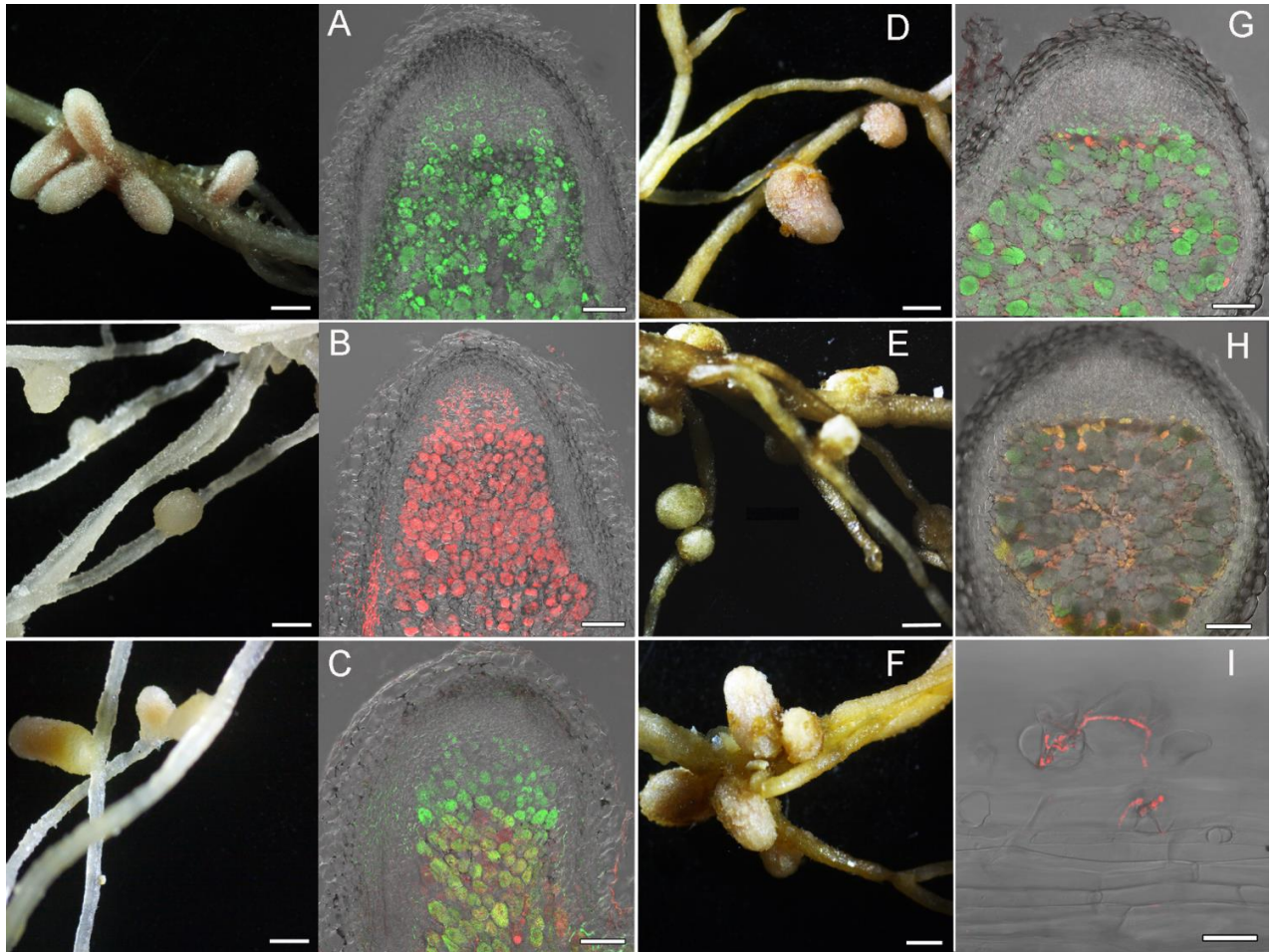


Figure 21. Pictures of root nodules formed by the fluorescent-labeled strains *M. kowhii* Ach-343(pHC60) and *M. japonicum* Opo-235(pMP4655) on the *A. sericeocanus* and *O. caespitosa* plants in gnotobiotic nodulation assay. Plant species: A – *A. sericeocanus*; B, C – *O. caespitosa*; D-I - *G. uralensis*. Inoculation treatment: A, D - Opo-235 bacteria in green; B, E - Ach-343 bacteria in red; C, F, G, H, I - Opo-235 + Ach-343; G, H – co-infection of plant cells in nodules; G - nodule in which the strains occupied the different cells; H - nodule in which there are cells with both strains (in yellow-orange); I - infection thread formed by the strain Ach-343. Column 1, 3 presents the general views of nodules (scale bar = 1 mm), column 2 – the confocal microscopy images (scale bar = 100 μ m). A - merge of DIC and green channel; B, I - merge of DIC and red channel; C, G, H - merge of DIC, green and red channels.

The image shows, that pseudonodules formed on *M. sativa* roots in all variants of inoculation did not contain any rhizobia (Figures 20. Pictures A-C), although bacterial cells of the strain Ach-343 were present on the root surface (Figures 20. Picture B). In contrast, in nodules on *T. pratense* roots inoculated with the strains Opo235(pMP4655) or Ach-343(pHC60) the corresponding bacteria were present (Figure 20. Pictures D, E),

while in the variant of co-inoculation only nodules with the strain Opo-235 (pMP4655) were observed (Figure 20. Picture F). In all variants of mono-inoculation *A. sericeocanus*, *O. caespitosa* and *G. uralensis* plants in the corresponding strains were detected in nodules. In the co-inoculation treatments, all nodules contained the strain Opo-235(pMP4655), however, the strain Ach-343(pHC60) was also observed in some nodules of *O. caespitosa* (Figure 21. Picture C), as well as in all nodules and some infection threads of *G. uralensis* (Figure 21. Pictures G-I). It should be noted that in nodules of *O. caespitosa* having both strains some plant cells were simultaneously infected by green and red bacteria, but in some plant cells only green or red bacteria were present (Figure 21. Picture C). In 3 of the 5 analyzed nodules of *G. uralensis* both strains were predominantly present in the same plant cells (Figure 21. Picture H); however, in two nodules the strains occupied different cells and the cells infected by Ach-343 were significantly smaller than the cells infected by Opo-235 (Figure 21. Picture G). The form of nodules was different depending on the plant species and rhizobial microsymbiont and varied from irregular in shape to round or elongated with one or several lobes (Figures 20, 21).

The co-inoculation of plants with both strains Ach-343 and Opo-235, which in some cases were localized in the same nodules, led to changes in symbiotic phenotypes (number of nodules, level of nitrogen fixation and plant biomass) compared with the mono-inoculation treatments. Wherein the effectiveness of symbiosis after co-inoculation could both increase and decrease. Thus, the strains *M. kowhii* Ach-343 and *M. japonicum* Opo-235 isolated from nodules of the relict legumes *A. chorinensis* and *O. popoviana*, respectively, had a wide range of host plants, including different genera of legumes (*Astragalus*, *Oxytropis*, *Glycyrrhiza* and *Trifolium*) [183]. The genetic basis for the low specificity of these isolates may be the similarity of their nod genes with representatives of different rhizobial families: *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae* and *Bradyrhizobiaceae*. This data is in agreement with previous reports suggesting that symbiotic systems of relict plants can be formed with different rhizobial strains belonging to various taxonomic

groups [178, 180]. The genes responsible for the formation and efficiency of symbiosis can be distributed between different strains of rhizobial co-microsymbionts.

SECTION CONCLUSIONS

1. A unique collection of relic legume microsymbionts of the Baikal region (195 strains) has been created. The collection is deposited in the Russian Collection of Agricultural Microorganisms (RCAM) and placed for long-term guaranteed storage in the UNU "Station of low-temperature automated storage of biological samples at -80°C". Information about the strains is available in the Internet database of RCAM (<http://arriam.ru/kollekciya-kul-tur1/>).

2. The genetic diversity of microsymbionts of such relic legumes as *L. humilis* (tribe *Fabeae* Rchb.), *H. gmelinii* subsp. *setigerum* (tribe *Hedysareae* DC.), *O. popoviana*, *O. triphylla* and *A. chorinensis* (tribe *Galegeae* Dumort), was studied for the first time. Molecular genetic methods were used to determine the taxonomic position of 136 strains, of which 105 belonged to different families and genera of the order *Rhizobiales*: *Mesorhizobium* and *Phyllobacterium* (family *Phyllobacteriaceae*) - 58 strains; *Neorhizobium* and *Rhizobium* (family *Rhizobiaceae*) - 21 strains; *Bosea* (family *Boseaceae*) - 23 strains; *Tardiphaga* and *Bradyrhizobium* (family *Bradyrhizobiaceae*) - 3 strains. Many isolates probably belong to new species, because their similarity with the nearest type rhizobial strains according to the *rrs* gene was less than 99.5%. Thus, a significant genetic diversity of microsymbionts of these relic legumes is shown.

3. A new species *Phyllobacterium zundukense* isolated from *O. triphylla* nodules was described with the type strain Tri-48T = LMG 30371T = RCAM 03910T. For species separation of isolates and reference strains, ANI method was used, fatty acid spectrum was compared with reference strains and phenotypic properties were studied using GENIII MicroPlate multi-substrate testing system (BioLog).

4. The ability of the studied strains to nodulate host plants was studied under the conditions of sterile vegetation experiments. The successful formation of nodules on *O. popoviana* and *A. chorinensis* plants was shown.

5. In *O. popoviana*, *O. triphylla* and *A. chorinensis* plants, the presence of two rhizobial strains of different taxonomic affiliation in the same nodule was found. Full

genome sequencing of 6 pairs of microsymbionts was carried out. The results of the search for symbiotic gene systems showed significant differences between the isolates. It is suggested that strains that lack the basic nodulation genes follow nodulation rhizobia during symbiosis formation, resulting in the formation of a multicomponent symbiotic system.

6. The work describes the phenomenon of complementary interaction in which the joint inoculation of plants by taxonomically different microsymbionts which occupy the same nodules results in a new symbiotic phenotype, different from the one formed by each of the strains separately. The effect of co-inoculation of the plants with co-microsymbiont strains in some cases is significantly positive and associated with a pronounced acceleration of nodulation, an increase in the total number of nodules and an increase in their nitrogen-fixing activity.

7. It is shown that microsymbionts of relic legumes have a wide range of host plants, including various species and genera of legumes from the tribes *Galegeae* (*Astragalus*, *Oxytropis*, *Glycyrrhiza*) and *Trifolieae* (*Trifolium*). Localization of fluorescently labeled variants of strains Ach-343 (pHC60mCherry, red) and Opo-235 (pMP4655egfp, green) in nodules of *A. sericeocanus*, *G. uralensis*, *O. caespitosa* and *T. pratense* was proved by confocal microscopy. Both strains were found to be present in some *O. caespitosa* nodules and in most *G. uralensis* nodules, and in *G. uralensis* nodules they are predominantly found in the same plant cells.

CONCLUSION

The study of plant-microbe symbioses has pronounced fundamental and applied aspects. It is one of the most important developing areas in modern agricultural biology. One of the main model objects for comprehensive study of symbiotic relations is legume-rhizobial symbiosis. However, to study the evolutionarily earlier plant-microbe relationships, it has been proposed to use as model objects symbiotic systems involving relict legumes, which are an intermediate link between extinct and now living species. The study of such systems should help to decipher the mechanisms of symbiont interaction and patterns of natural symbiosis evolution. Which is the basis for the creation of highly effective symbiotic systems and their use in ecologically sustainable agriculture.

Thus, the taxonomic diversity of nodule microsymbionts of relic legumes *Lathyrus humilis* (triba *Fabeae*); *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum* (triba *Hedysareae*); *Oxytropis popoviana*, *Oxytropis triphylla*, и *Astragalus chorinensis* (triba *Galegeae*), growing in the Baikal region was studied using modern methods of genosystematics. The obtained results indicate that symbiotic systems of relic plants are formed with participation of a wide range of rhizobia of different taxonomic positions. In particular, an unusually high diversity of microsymbiont strains, which belonged to different families of the order *Rhizobiales*: *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Boseaceae* was shown. Representatives of the families *Rhizobiaceae* and *Phyllobacteriaceae* were isolated in all plants. However, the greatest number of isolated strains belonged to the family *Phyllobacteriaceae* genus *Mesorhizobium*. Only representatives of the genus *Phyllobacterium* from the family *Phyllobacteriaceae* were found in representatives of the genus *Oxytropis*. Also, strains belonging to the family *Boseaceae* (genus *Bosea*) were isolated from the nodules of all plants except *Lathyrus humilis*. Representatives of the family *Bradyrhizobiaceae* were found only in *Lathyrus humilis* (genus *Tardiphaga*) and representatives of the genus *Oxytropis* (genus *Bradyrhizobium*).

In addition, the work revealed that two rhizobial strains belonging to different taxa can be present in one nodule. Combinations of strains in pairs were diverse: *Phyllobacterium* + *Bosea*; *Mesorhizobium* + *Bradyrhizobium*; *Rhizobium* + *Bosea*; *Rhizobium* + *Mesorhizobium*; *Mesorhizobium* + *Bosea*.

The relationship between the plant and rhizobia is not exclusive. The works of other authors have already shown the possibility of colonization of the same nodule by several strains of the same rhizobia species [99, 155, 160]. Also, the possibility of formation of nitrogen-fixing nodules was shown by simultaneous inoculation of the host plant with two mutants of the same strain, which were ineffective separately [141, 162].

In this work, we showed the possibility of nodulation containing two strains belonging to different taxonomic groups and determined the influence of each of them on nodulation formation and symbiosis efficiency. To study the phenomenon of rhizobial synergy (ability of strains with different taxonomic positions and complementary sets of symbiotic genes to be simultaneously present in nodules and increase the symbiosis efficiency), the symbiotic genes in pairs of microsymbionts isolated from one nodule were found and analyzed. Also, pairs of strains isolated from different nodules but possessing complementary gene sets were made up. The conducted vegetation experiments with different pairs of microsymbionts showed that strains isolated from relic symbiotic systems can possess a wide range of host plants, and the effect of joint inoculation varies significantly depending on the plant species.

The obtained results confirm the assumption that symbiotic systems of relic plants can be multicomponent and include rhizobial strains belonging to different taxonomic groups. This creates the prerequisites for effective exchange of genetic material between microsymbionts cohabiting in root nodules. This helps to explain the evolution of rhizobia by recruiting in one strain a wide set of genes which are obligatory or promising for symbiosis but distributed in different bacterial taxa.

Thus, the performed work helped to improve the systematics of nodule bacteria and expand the understanding of symbiotic systems of relic legumes, contributed greatly to

the study of symbiotic function of partner microorganisms and determine the role of each of them in the formation of microbial-plant symbiosis.

Further research, search and study of rhizobial co-microsymbionts with complementary sets of symbiotic genes will contribute to the discovery of mechanisms of effective integration between partners and use the phenomenon of rhizobial synergy to improve the efficiency of biological systems based on legume plants and their microsymbionts. This method will have a distinct advantage over the currently used mixed inoculation of legumes with rhizobia and growth-stimulating rhizosphere bacteria (PGPR), because it implies a much closer interaction between the symbiotic partners based on the complementation of genes directly related to the formation of effective symbiotic relationships with the plant. The most successful combinations of symbiotic rhizobia genomes can be used as a basis for selection and directed genetic construction of strains promising for agricultural practice.

REFERENCE LIST

1. Alekseeva A.E., Brusnigina N.F. Possibilities and prospects of using mass parallel sequencing methods in diagnostics and epidemiological surveillance of infectious diseases (analytical review) // *MediAl*. - 2014. - № 2 (12) - P. 6-28. / [Electronic resource]. - URL: http://www.medial-journal.ru/uploads/objects/rf_journal_article/1/110/pdf/алексеева (date of reference 08.12.2020).
2. Alesina N.V. Study of changing of bacterial components in rhizosphere and rhizoplane in the process of vegetation of plant on the example of oat (*Avena sativa*) // *Vestn. Moscow State Regional Univ. Ser. "Natural Sciences*. - 2010. - №1. - P. 5 - 9.
3. Baimiev An.Kh., Ptitsyn K.G., Muldashev A.A., Baimiev Al. Genetic characteristics of legume nodule bacteria of the genus *Lathyrus* growing in the Republic of Bashkortostan // *Ecological Genetics*. - 2011. - V, IX. - № 2 - P. 3 - 8.
4. Baimiev E. Review. Modern state of the problem of studying symbiosis of microorganisms with plants / [Electronic resource]. - URL: <http://biohim2005.narod.ru/biotehnology/mikoriza.htm> (date of reference 10.09.2019).
5. Baimiev An.Kh., Gumenko R.S., Matniyazov R.T., Chubukova O.V., Baimiev Al.Kh. / Modern systematics of nodule bacteria // *Biomika*. - 2013. - T.5 - №3(4). - P. 136 -157.
6. Baimiev A.Kh., Ivanova E.S., Gumenko R.S., Chubukova O.V., Baimiev Al.Kh. Impact analysis of rhizosphere bacteria *Phyllobacterium* sp. strain CA8 on the legume yield. // *Izvestiya Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. - 2013. - T. 15. № 3 (5). - P. 1559-1562.
7. Baimiev A.K., Ivanova E.S., Ptitsyn K.G., Belimov A.A., Safronova V.I., Baimiev A.I. Genetic characterization of wild leguminous nodular bacteria living in the South Urals. // *Molekuliarnaia Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya*. - 2012. - 27(1). - P. 29 - 34. DOI:10.3103/S0891416812010028.
8. Baimiev A.Kh., Vladimirova A.A., Akimova E.S., et al. Phylogenetic characteristics of nodule bacteria endemic to the Southern Urals species of the genus *Oxytropis* (Fabaceae) // *Ecological Genetics*. - 2020. - T. 18. (2). - P. 157 - 167. DOI: 10.17816/ecogen17805.
9. Belimov A.A. Interaction of associative bacteria and plants depending on biotic and abiotic factors: dis. for the degree of doctor of biological sciences. - St. Petersburg, 2009. - 320p.

10. Verkhozina A.V. BaikalRu. *Oxytropis popoviana* Peschkova. / [Electronic resource]. - URL: <https://baikalru.ru/baikal/krasnaja-kniga-irkutskoi-oblasti/sosudistye-rasteniya/ostrolodochnik-popova.html> (date of reference 20.12.2019).
11. Vishnyakova M.A., Burlyaeva M.A. Potential of household value and perspectives of using of russian chicklings (review) // *Agricultural Biology*. - 2006. - T.41, №6. - P. 85-97.
12. Gaikova O.Yu., Popov V.V., Abarinova N.G., Berman M.I. et al. Red Book of the Irkutsk region. // Irkutsk: OOO publishing house 'Time of Wanderings', 2010. - 480p.
13. Glick B.R., Pasternak D. *Molecular biotechnology: principles and applications: a textbook*. - Moscow: Mir, 2002.- 589p.
14. Glyanko A.K. Signal systems of rhizobia (*Rhizobiaceae*) and legumes (*Fabaceae*) during the formation of legume-rhizobial symbiosis (review) // *Applied Biochemistry and Microbiology*. - 2015. - Vol. 51. - No. 5. - P. 453-464.
15. Glyanko A.K., Ischenko A.A., Filinova N.V. Legume-rhizobial symbiosis: some modern knowledge. // *Vestnik of KhNAU series Biology*. - 2017. - 3 (42), - P. 6-22 / [Electronic resource]. - URL:http://www.knau.kharkov.ua/uploads/visn_biology/v7_3/1.pdf (date of reference 10.08.2019).
16. Emtsev V.T., Mishustin E.N. *Microbiology: a textbook for high schools, 5th ed. revised and supplementary-M.*: Drofa, 2005. - 445p., ill.
17. Zhuk A.V. Forms and place of mutualism in the system of symbiotic relationships of higher plants with other organisms // *Vestnik of St. Petersburg University*. - 2005. - Series 3, Issue 1. - P. 3 - 19.
18. Zhukov V. A., Rychagova T. S., Shtark O. Y., Borisov A. Y., Tikhonovich I. A. Genetic control of specificity of interaction between legume plants and nodule bacteria // *Ecological Genetics*. - 2008. – VI, № 4. - P. 12 - 19.
19. Ivanova E. S., Baimiev An. Kh., Ibragimov R. I., Baimiev Al. Kh. Symbiotic genes of nodule bacteria and the effect of their horizontal transfer on the species composition of legume plant microsymbionts // *Vestnik of Bashkir University*. - 2011. - T. 16, №4. - P. 1210 - 1213.
20. *Microbial identification. Systems for identifying and studying the properties of microbial cultures* *Biolog.* / [Electronic resource]. - Access mode: URL: - <http://www.ld.ru/microbiology/ilist-3958.html> (date of reference 12.10.2019).
21. Information and analytical system "Specially protected natural areas of Russia". Biodiversity base. *Hedysarum gmelinii* Ledeb. - URL: - <http://oopt.aari.ru/bio/44968> (date of reference 12.10.2020).

22. Info lesson. Relict plants and endemics of the Urals. / [Electronic resource]. - URL: <https://infourok.ru/reliktovie-rasteniya-i-endemiki-urala-476112.html>. (date of reference 17.09.2020).
23. Irkipedia. Flora of the Baikal natural area. Higher plants. / [Electronic resource]. - URL: http://irkipedia.ru/content/flora_baykalskoy_prirodnoy_territorii_vysshie_rasteniya (date of reference 06.06.2022).
24. Konychev A.S. Molecular Biology: Textbook for students of higher professional education / A.S. Konychev, G.A. Sevastyanova. - M.: Publishing Center "Academy", 2012. - 400p.
25. Krasilov V.A. Universal Encyclopedia of Cyril and Methodius. Relict plants. / [Electronic resource]. - URL: <https://megabook.ru/article/Реликтовые%20растения> (date of reference 17.09.2019).
26. Krivenko D.A. *Astragalus olchonensis* Gontsch. and *Astragalus sericeocanus* Gontsch. (Fabaceae): ecological and biological features of cenopopulations, phylogeny issues, protection: the dissertation for the degree of candidate of biological sciences - Irkutsk, 2014. - 129 p.
27. Kruglov Yu.V. Soil microbial community: physiological diversity and research methods // *Agricultural Biology*. - 2016. - T. 51, № 1. - P. 46 - 59.
28. Kuznetsova I.G., Sazanova A.L., Safronova V.I., Pinaev A.G., Verkhozina A.V. et al. Genetic diversity among microsymbionts of *Lathyrus*, *Vicia*, *Oxytropis* and *Astragalus* legume species from Baikal region. // *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*. - 2015. - T. 50, № 3. - P. 345 - 352. DOI: 10.15389/agrobiology.2015.3.345rus.
29. Kuznetsova I. G., Safronova V. I., Belimov A. A., Sazanova A. L., Chirak E. R., et al. Two rhizobial co-microsymbionts isolated from the relic legume *Oxytropis popoviana* have complementary sets of symbiotic genes and together increase the efficiency of host plant nodulation. // *Plants and microorganisms: biotechnology of the future. Materials of the International Scientific Conference, Ufa, June 13-17, 2018*. - Ufa: Electronic publication. Permanent posting address <http://plamic.ru/sbornik/>, 2018. - C. 173.
30. Kurilshchikov A.M., Tikunova N.V., Kabilov M.R. Methods and objects of metagenomic studies. // *Vestnik of Novosibirsk State University. Series: Biology, Clinical Medicine*. - 2012. - T.10, № 1. - P. 191 - 201.
31. Katsy E.I. Molecular and genetic processes affecting the associative interaction of soil bacteria with plants / Ed. by V.V. Ignatov. - Saratov: Publishing house of Saratov University. - 2003. - 169p.

32. Knyazev M.S. Legumes (*Fabaceae* Lindl.) of the Urals: speciation, geographical distribution, historical and ecological strata. Vol. 1: Ph.D. in Biology // Yekaterinburg, 2014. - 463p.
33. Kopat V.V., Chirak E.R., Kimeklis A.K., Safronova V.I., Belimov A.A. et al. Evolution of *FIXNOQP* genes encoding high oxygen affinity cytochrome oxidase in rhizobia and related bacteria. // Genetics. - 2017. - T.53, №7. - P. 795 - 804. DOI.org/10.7868/S0016675817070062.
34. Red Data Book of the Republic of Buryatia, 2013. / [Electronic resource]. - URL: http://minpriroda-rb.ru/redbook/2014/detalnoe-opisanie.php?ELEMENT_ID=44712. (Date of reference 20.09.2020).
35. Kulikov P.V. Flora of the Chelyabinsk Region (vascular plants). - Yekaterinburg, 2005. - 543p.
36. Lazikin A.G. Special course "Special microbiology. Systematics of microorganisms. Collection of lectures / [Electronic resource]. - URL: <https://cyberpedia.su/9x1438a.html> (date of reference 12.10.2019).
37. Forest encyclopedia: In 2 vols. Anuchin N.A., Atrokhin V.G., Vinogradov V.N. et al. - M.: Sov. Encyclopedia, 1985. - 563p., ill.
38. Small Encyclopedia of Transbaikalia: Natural Heritage / Ed. by R.F. Geniatulin. - Novosibirsk: Nauka, 2009. - 698 p.
39. Malyshev L.I., Peshkova G.A. Features and genesis of flora of Siberia (Predbaikalia and Transbaikalia). - Novosibirsk: Nauka, 1984. - 265p.
40. Matyaschenko G.V. The island ecosystems of Lake Baikal and their protection // Baikal and natural sciences for 100 years. - Irkutsk, 1993. - P. 166-173.
41. Medvedev S. C. Plant physiology: a textbook. - SPb: BHV-Peterburg, 2012. - 512p.: ill.
42. Merezhkovsky K.S. The theory of two plasmas as the basis of symbogenesis, a new doctrine of origin // Uch. Zapiski Kazan University. - 1909. - T. 76. - P. 93.
43. Muldashev A.A., Galeeva A.H., Maslova N.V., Elizarieva O.A. On the conservation status of *Hedysarum gmelinii* Ledeb. (*Fabaceae*) in the Republic of Bashkortostan. // Vestnik of the Orenburg State University. - 2009. - 6. - P. 254 - 257.
44. Namzalov B.B. On the question of relicts in flora and vegetation of steppe ecosystems of Baikal Siberia. // Plant World of Asian Russia. - 2012. - № 2(10). - P. 94 - 100.
45. Namzalov B.B. Endemism and relict phenomena in flora and vegetation of steppe ecosystems of Baikal Siberia. // Biodiversity of Baikal Siberia / V.M. Korsunov, N.M. Pronin, G.G. Gonchikov et al. - Novosibirsk, 1999. - P. 184 - 192.

46. Namzalov B. C. B., Taisaev T. T. Endemism of biota of Baikal natural area: origins, latest nodes and research prospects // Vestnik of Buryat Scientific Center of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences. - 2015. - № 1(17). - P. 164-174.
47. Neretina O.V. The chemical composition of the extractive substances of the bristlewort: *Hedysarum setigerum* Turcz. ex Fisch. Et Meyer: the dissertation for the degree of candidate of chemical sciences // Irkutsk, 2004. - 157p.
48. Netrusov A.I., Egorova M.A., Zakharchuk L.M. The practical course in microbiology: a textbook for students of higher educational institutions. - Moscow: Academia Publishing Center, 2005. - 608p.
49. Specially protected natural areas of Yugra. *Lathyrus humilis* (Ser.) Spreng. Compiled by: A.L. Vasina, M.S. Knyazev. / [Electronic resource]. - URL: <https://ugraopt.admhmao.ru/redbook/74077/2537893/> (date of reference 17.11.2020).
50. Peshkova G.A. Red Book. *Oxytropis triphylla*. / [Electronic resource]. - URL: <https://cicon.ru/oxytropis-triphylla.html> (date of reference 20.12.2018).
51. Nature of Lake Baikal. Author's project by V. Petukhin. / [Electronic resource]. - URL: <https://nature.baikal.ru/hiero.shtml?hiero=nature&pnt=Fabaceae#Fabaceae> (accessed 06.06.2022).
52. Provorov N.A. Plant-microbial symbioses as an evolutionary continuum. // Journal of General Biology. - 2009. - T. 70, № 1. - P. 10-34.
53. Provorov N.A., Vorobyov N.I., Andronov E.E. Macro- and microevolution of bacteria in symbiosis systems. // Genetics. - 2008. - T4, №1. - P. 12 - 28.
54. Provorov N. A., Shtark O. Yu., Dolgikh E. A. Evolution of nitrogen-fixing symbioses based on migration of bacteria from mycorrhizal fungi and soil to plant tissues. // General Biology. - 2016. - T.77, №5. - P. 329 - 345.
55. Provorov N. A. Adaptive macroevolution of legume-rhizobial symbiosis. // Agricultural Biology. - 2015. - T.50, №3. - P. 323 - 331.
56. Provorov N. A. Anton de Bary. The phenomenon of symbiosis (die Erscheinung der symbiose). // S.-ch. biolog. - 2014. - №3. - C. 113-126.
57. Rumyantseva M.L. Biological diversity of nodule bacteria in ecosystems and agrocenoses. Theoretical bases and methods / edited by Rumyantseva M.L., Simarov B.V. // Russian Academy of Agricultural Sciences, All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology. St. Petersburg, 2011. - 104p.
58. Sazanova A. L., Kuznetsova I. G., Safronova V. I., Belimov A. A., Popova Zh.P., Tikhomirova N.Yu., Osledkin Yu.S. Study of the genetic diversity of microsymbionts isolated from *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum*, growing in the baikal lake region. // Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya. - 2017. - V. 52, №5. - P. 1004-1011. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.5.1004rus.

59. Sandanov D.V. Rare legumes (Fabaceae Lindl.) in Buryatia: geographic distribution, eco-coenotic confinement, population diversity, and conservation challenges. // Journal of Sib. fed. univ. Biology. - 2020. - 13(1). - C. 81-93. DOI: 10.17516/1997-1389-028.
60. Safronova V.I., Chizhevskaya E.P., Belimov A.A., Pavlova E.A. Determination of taxonomic position of microsymbiont strains of *Hedysarum* and *Astragalus* by analysis of ribosomal RNA genes. // Agricultural Biology. - 2011. - 3. - P. 61 - 64.
61. Sidorova K.K., Shumnyi V.K., Vlasova E.Y., Glianenko M.N., Mishchenko T.M. et al. Symbogenetics and selection of macrosymbiont to increase nitrogen fixation by the example of *Pisum sativum* L.)// Vestnik VOGiS. - 2010. - Vol. 14, N°2. - P. 357 - 374.
62. Spink G. *Rhizobiaceae*. Molecular biology of bacteria interacting with plants. / G. Spink, A. Kondoroshi, P. Hukas. - St. Petersburg. - 2002. - 568p.
63. Starodumova I.P., Prysyzhnaya N.V., Tarlachkov S.V., Dorofeeva L.V., Vasilenko O.V., Evtushenko L.I. Systematics of *Rathayibacter*: from traditional approaches to genome analysis // First Pushchino School-Conference "Biochemistry, physiology and biosphere role of microorganisms". Abstracts. Pushchino. - 2014. - P. 7 - 11.
64. Starchenko V.M., Darman G.F. *Oxytropis caespitosa* (Pall.) Pers. Red Book of the Amur Region: Rare and endangered species of animals, plants and fungi: Official edition. 2nd edition, revised, revised and supplemented. // Blagoveshchensk: Far Eastern State Agrarian University. - 2020. - P. 264.
65. Stepanitsova N.V., Berlov O.E., 2006 - 2015: Plants of the Baikal region. / [Electronic resource]. - URL: <http://baikalflora.narod.ru>. (date of reference 20.09.2020).
66. Tikhonovich I.A., Provorov N.A. Symbioses of plants and microorganisms: molecular genetics of agricultural systems of the future. - Saint-Petersburg: Publishing house of S.-Petersburg State University, 2009. - 210p.
67. Troyan T.N. Formation of effective legume-rhizobium symbiosis and its role in increasing productivity of agroecosystems: dissertation for the candidate of biological sciences. // Moscow, 2010. - 157 p.
68. Turova T.N. The application of genosystems methods to solve the questions of taxonomy and studying of prokaryotes biodiversity: doctoral dissertation - Moscow, 2009. - 86p.
69. Tyulyukin S. Plants-endemics of the Irkutsk region. / [Electronic resource]. - URL: <https://pandia.ru/text/82/001/39875.php> (date of reference 21.09.2020).
70. Holina, A.B., Kozyrenko, M.M., Artyukova, E.V., and Sandanov, D.V. Modern state of populations of endemic *Oxytropis* species from baikal siberia and their

- phylogenetic relationships based on chloroplast dna markers. // Russian Journal of Genetics. - 2018. - T.54, № 7. - P. 795-806. DOI:10.1134/S0016675818070056.
71. Hoult J. Bergey's bacterial identifier: in 2 vols. Translated from English. 9th ed. / Ed. J. Hoult, N. Krieg, P. Sneath, et al. - M.: Mir. - 1997. - 432p., ill.
 72. Shirokikh A.A., Merzaeva O.V., Shirokikh I.G. Methodological approaches to the study of plant root zone microorganisms (review). // Agricultural Biology. - 2007. - № 1. - P. 43 - 55.
 73. Shtark O. Yu., Borisov A.Yu., Zhukov V.A., Nemankin T.A., Tikhonovich I.A. Multicomponent symbiosis of legumes with beneficial soil microorganisms: genetic and evolutionary rationale for use in adaptive crop production // Ecological Genetics. - 2011. - V. IX, №.2. - P. 80-94.
 74. Shchelkunov S.N. Genetic engineering: Training and reference manual. - Novosibirsk: Sib. univ. ed. - 496p.
 75. Famintsyn A.S. On the role of symbiosis in evolution of organisms // Notes of the Imperial Academy of Sciences. Ser. 8. - 1907. - T. 20, № 3. - P. 1 - 14.
 76. Flora of Baikal-Lensky reserve. Floristic diversity of the specially protected natural territory. / [Electronic resource]. - URL: <https://baikal-1.ru/specialists/baikal-lena/flora/> (date of reference 12.12.2018).
 77. Flora of Siberia. Vol. 9. *Fabaceae (Leguminosae)* / Comp. V.A. Polozhyi, S.N. Vydrina, V.I. Kurbatsky, O.D. Nikiforova. In 14 vols. - Novosibirsk: Siberian Publishing Company VO "Nauka", 1994. - 280p.
 78. Electronic database of the Russian Collection of Agricultural Microorganisms (RCAM). / [Electronic resource]. - URL: <http://www.arriam.spb.ru>. Undated.
 79. Electronic catalog of vascular plants of Asian Russia, 27.11.2002. / [Electronic resource]. - URL: <http://www-sbras.nsc.ru/win/elbib/atlas/flora/271.html>. (date of reference 12.11.2020).
 80. Yatsenko-Stepanova T.N., Nemtseva N.V., Ignatenko M.E. Diversity of symbioses and their role in the evolution of the organic world // Vestnik of OGU. - 2014. - №13 (174). - P. 142 - 147.
 81. Ahemad M., Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. // J. King Saud Univ.-Sci. - 2014. - 26. - pp. 1 - 20. DOI: 10.1016/j.jksus.2013.05.001.
 82. Ambros E., Kotsupy O., Novikova T., Vysochina G. Клональное микроразмножение редкого вида *Astragalus sericeocanus* Gontsch. и содержание фенольных соединений в условиях *in vitro* // Turczaninowia, 2018. - Т. 21, № 4. С. 87-99. DOI: 10.14258/turczaninowia.21.4.10.
 83. Andam C. P., Mondo S. J., Parker M. A. Monophyly of *nodA* and *nifH* genes across Texas and Costa Rican populations of *Cupriavidus* nodule symbionts. // Applied and

- Environmental Microbiology. - 2007. - 73(14). - pp. 4686 - 4690. DOI: 10.1128/AEM.00160-07.
84. Andam C. P., Parker, M. A. Novel Alphaproteobacterial root nodule symbiont associated with *Lupinus texensis*. // Applied and Environmental Microbiology. - 2007. - 73 (17). - pp. 5687-5691. DOI: 10.1128/AEM.01413-07.
 85. Ampomah O. Y., Mousavi S. A., Lindstrom K., Huss-Danell K. Diverse *Mesorhizobium* bacteria nodulate native *Astragalus* and *Oxytropis* in arctic and subarctic areas in Eurasia. // Syst. Appl. Microbiol. - 2017. - 40. - P. - 51 - 58. DOI: 10.1016/j.syapm.2016.11.004.
 86. Aoki S., Ito M., Iwasaki W. From β - to α -Proteobacteria: the origin and evolution of rhizobial nodulation genes *nodIJ*. // Mol Biol Evol. 2013. - 30(11). - P.2494–2508. DOI: 10.1093/molbev/mst153.
 87. David R. Whole-Genome Analyses: Average Nucleotide Identity// Methods in Microbiology. - 2014. - V. 41. - pp. 103-122 (DOI: 10.1016/bs.mim.2014.07.002).
 88. Ardley J.K., Parker M.A., De Meyer S.E. et al. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts // Int J Syst Evol Microbiol. - 2012. - 62. - pp. 2579 - 2588.
 89. Aryal S. Online Microbiology and Biology Notes. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) / [Электронный ресурс]. - URL: <https://microbenotes.com/author/sagararyalnepal/> \o "View all posts by Sagar Aryal" (дата обращения 22.12.2020).
 90. Aziz R.K., D. Bartels, A. A. Best, M. DeJongh, T. Disz, R. A. Edwards et. all. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology // BMC Genomics. - 2008. - 9(75). - P. 15. DOI.org/10.1186/1471-2164-9-75.
 91. Baev N., Schultze M., Barlier I., Ha D.C., Virelizier H., Kondorosi E., Kondorosi A. *Rhizobium nodM* and *nodN* genes are common *nod* genes: *nodM* encodes functions for efficiency of nod signal production and bacteroid maturation. // J. Bacteriol. - 1992. - 174. - pp. 7555 - 7565.
 92. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M. et other authors. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and ITS Applications to Single-Cell Sequencing. // J. Comput. Biol. 2012. - 19(5). - pp. 455 - 477.
 93. Barcellos F. G., Menna P., da Silva Batista J. S., Hungria M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. // Applied and Environmental Microbiology. - 2007. - 73(8). - pp. 2635-2643. DOI: 10.1128/AEM.01823-06.

94. Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L. E. *Azospirillum*–plant relationships: Physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003) // Canadian Journal of Microbiology. - 2004. -50(8). - pp. 521–577. DOI:10.1139/w04-035.
95. Behrendt U., Schumann P., Hamada M., Suzuki K., Spröer C., Ulrich A. Reclassification of *Leifsonia ginsengi* (Qiu et al. 2007) as *Herbiconiux ginsengi* gen. nov., comb. nov. and description of *Herbiconiux solani* sp. nov., an actinobacterium associated with the phyllosphere of *Solanum tuberosum* L. // Int. J Syst. Evol. Microbiol. - 2011. - 61(5). - pp. 1039 - 1047. DOI: 10.1099/ijms.0.021352-0.
96. Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A., Squartini A. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. // Systematic and Applied Microbiology. - 2004. - 27(4). - pp. 462 - 468. DOI: 10.1078/0723202041438527.
97. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. // Nat. Methods. - 2010.- Vol. 7, - № 5. - pp. 335-336. DOI: 10.1038/nmeth.f.303.
98. Cardoso J.D., Hungria M., Andrade D.S. Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2012. - 93. - pp. 2035 - 2049. DOI: 10.1007/s00253-011-3708-2.
99. Checcucci A., Azzarello E., Bazzicalupo M., Galardini M., Lagomarsino A., et al. Mixed nodule infection in *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* symbiosis suggest the presence of cheating behavior. // Frontiers in Plant Science. - 2016. - Vol. 7 (Art. 835). - 11p. DOI: 10.3389/fpls.2016.00835.
100. Chen G. W.X., Li S., Qi Y. L., Wang E. T., Yuan H. L., Li J. L. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 1991. - 41. - pp. 275-280. DOI: 10.1099/00207713-41-2-275.
101. Cheng, H.P., Walker G.C. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. // J. Bacteriol. - 1998. - 180. - pp. 5183 - 5191.
102. Chirak E.R., Kimeklis A.K., Karasev E.S., KopatV.V., Safronova V.I. et al. Search for ancestral features in genomes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains isolated from the relict legume *Vavilovia formosa*. // Genes. - 2019. - 10(12), 990. - P. 20. URL: <https://DOI.org/10.3390/genes10120990>.
103. Corretto E., Antonielli L., Sessitsch A., Compant S., Gorfer M. et al. *Agromyces aureus* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Salix caprea* L. grown in a heavy-metal-contaminated soil. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2016. - 66(9). - P. 3749-3754. DOI: 10.1099/ijsem.0.001260.

104. Corvera A., Promé D., Promé J.-C., Martínez-Romero E., Romero D. The *nolL* gene from *Rhizobium etli* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor. // *Mol. Plant Microbe Interact.* - 1999. - Vol. 12, - N°3. - P. 236-246. DOI:10.1094/mpmi.1999.12.3.236.
105. Dagan T., Martin W. Getting a better picture of microbial evolution en route to a network of genomes// *Phil. Trans. R.Soc. B.* - 2009. - V. 364. - P. 2187 - 2196.
106. De Meyer S.E., Coorevits A., Willems A. *Tardiphaga robiniae* gen. nov., sp. nov., a new genus in the family *Bradyrhizobiaceae* isolated from *Robinia pseudoacacia* in Flanders (Belgium). // *Systematic and Applied Microbiology.* - 2012. - 35 (4) - pp. 205-214. DOI: 10.1016/j.syapm.2012.02.002.
107. De Meyer S.E., Willems A. Multilocus sequence analysis of *Bosea* species and description of *Bosea lupini* sp. nov., *Bosea lathyri* sp. nov. and *Bosea robiniae* sp. nov., isolated from legumes. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* - 2012, - 62. - pp. 2505-2510. DOI: 10.1099/ijms.0.035477-0.
108. De Meyer S.E., Tan H.W., Andrews M., Heenan P.B., Willems A. *Mesorhizobium calcicola* sp. nov., *Mesorhizobium waitakense* sp. nov., *Mesorhizobium sophorae* sp. nov., *Mesorhizobium newzealandense* sp. nov. and *Mesorhizobium kowhainii* sp. nov. isolated from *Sophora* root nodules. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* - 2016. - 66. - pp. 786 - 795. DOI: 10.1099/ijsem.0.000796.
109. Delamuta J.R., Ribeiro R.A., Ormeño-Orrillo E., Melo I.S., Martínez-Romero E., Hungria M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* - 2013. - 63(9). - pp. 3342 - 3351. (DOI: 10.1099/ijms.0.049130-0).
110. Delcher A.L., Kasif S., Fleischmann R.D. et al. Alignment of Whole Genomes. // *Nucleic Acids Research.* - 1999. - V. 27, - N°11. - pp. 2369 - 2376. DOI: 10.1093/nar/27.11.2369.
111. Deloger M, E., Karoui M., Petit M.A. A genomic distance based on MUM indicates discontinuity between most bacterial species and genera. // *J. Bacteriol.* - 2009. - 191, - N° 1. - pp. 91- 99. DOI:10.1128/JB.01202-08.
112. Dos Santos P.C., Fang Z., Mason S.W., Setubal J. C., Dixon R. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. // *BMC Genomics.* - 2012. - 13. - pp. 162. DOI: 10.1186/1471-2164-13-162.
113. Drouin P., Prevost D., Antoun H. Physiological adaptation to low temperatures of strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* associated with *Lathyrus* spp. // *FEMS Microbiol. Ecol.* - 2000. - 32. - pp. 111 - 120.
114. Drouin P., Prevost D., Antoun H. Classification of bacteria nodulating *Lathyrus japonicus* and *Lathyrus pratensis* in Northern Quebec as strains of *Rhizobium*

- leguminosarum* biovar *viciae*. // Int. J. Syst. Bacteriol. - 1996. - 46 (4). - pp. 1016-1024. DOI:10.1099/00207713-46-4-1016.
115. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. // Nucleic Acids Res. - 2004. - Vol. 32, - № 5. - pp. 1792-1797. DOI:10.1093/nar/gkh340.
 116. Edgren, T., Nordlund S. The *fixABCX* genes in *Rhodospirillum rubrum* encode a putative membrane complex participating in electron transfer to nitrogenase. // J. Bacteriol. - 2004. - 186(7). - pp. 2052 - 2060.
 117. Evans D.J., Jones R., Woodley P.R., Wilborn J.R., Robson, R.L. Nucleotide sequence and genetic analysis of the *Azotobacter chroococcum nifUSVWZM* gene cluster, including a new gene (*nifP*) which encodes a serine acetyltransferase. // J. Bacteriol. - 1991. - 173(17). - pp. 5457 - 5469.
 118. Ezzakkioui F., El Mourabit N., Chahboune R., Castellano-Hinojosa A., Bedmar E.J., Barrijal S. Phenotypic and genetic characterization of rhizobia isolated from *Hedysarum flexuosum* in Northwest region of Morocco. // Journal of Basic Microbiology. - 2015. - 55(7). - pp. 830-837. DOI: 10.1002/jobm.201400790.
 119. Fischer H.-M. Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobia*. // Microbiol. - 1994. - Rev. 58. - pp. 352 - 386.
 120. Flores-Félix J.D., Carro L., Velázquez E., Valverde Á., Cerda-Castillo E., et al. *Phyllobacterium endophyticum* sp. nov., isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris*. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2013. - 63. - pp. 821 - 826.
 121. Fuli X., Wenlong Z., Xiao W., Jing Z., Baohai H. et al. A genome-wide prediction and identification of intergenic small RNAs by comparative analysis in *Mesorhizobium huakuii* 7653R. // Front. Microbiol. - 2017. - V. 8., A. 1730. - P. 15. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01730.
 122. Gao J., Terefework Z., Chen W., Lindstrom K. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China. // Journal of Biotechnology. - 2001. - 91(2-3). - pp. 155 - 168.
 123. Garg B., Dogra R.C., Sharma P.K. High-efficiency transformation of *Rhizobium leguminosarum* by electroporation. // Appl. Environ. Microbiol. - 1999. - 65. - pp. 2802 - 2804.
 124. Gaunt M.W., Turner S.L., Rigottier-Gois L., Lloyd-Macgilp S.A., Young J.P. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2001-V. 51(Pt 6) - pp. 2037- 48. DOI: 10.1099/00207713-51-6-2037.
 125. GenBank sequence database. The National Center for Biotechnology Information. / [Электронный ресурс]. - URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Без даты.

126. Giraud E., Moulin L., Vallenet D., Barbe V., Cytryn E. et al. Legumes symbioses: absence of *Nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. // *Science*. - 2007. - 316. - pp. 1307 - 1312. DOI: 10.1126/science.1139548.
127. Glaeser S.P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. // *Syst. Appl. Microbiol.* - 2015. - 38(4)/ - 237 - 245. DOI: 10.1016/j.syapm.2015.03.007.
128. Goris J., Konstantinidis K.T., Coenye T., Vandamme P., Tiedje J.M. DNA-DNA hybridization values and their relation to whole genome sequence // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* - 2007. - V. 57. - pp. 81- 91. DOI:10.1099/ijs.0.64483-0.
129. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies // *Bioinformatics* - 2013. - V.29, - I.8. - pp. 1072 -1075. URL: <https://DOI.org/10.1093/bioinformatics/btt086>.
130. Gyllenberg M., Preteasa D., Yan P. Ecology and evolution of symbiosis in metapopulations // *Journal of Biological Dynamics*. - 2009. - Vol. 3. - № 1. - pp. 39-57.
131. Han T. X., Han L. L., Wu L. J., Chen W. F., Sui X. H., et al. *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* - 2008. - 58 (11). - pp. 2610-2618. DOI: 10.1099/ijs.0.2008/000125-0.
132. Hernandez J.A., George S.J., Rubio, L.M. Molybdenum trafficking for nitrogen fixation. // *Biochemistry*. - 2009. - 48(41). - P. 9711 - 9721. DOI: 10.1021/bi901217p.
133. Hoffmann M., Monday S.R., Allard M.W. et al. *Vibrio caribbeanicus* sp. nov., isolated from the marine sponge *Scleritoderma cyanea*. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* - 2012. - 62. - pp.1736 -1743. DOI: 10.1099/ijs.0.032375-0.
134. Hordt A., Lopez M.G., Meier-Kolthoff J.P., Schleuning M., Weinhold L.M. et al. Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of *Alphaproteobacteria*. // *Front. Microbiol.* - 2020. - V. 11. A. 468. - P. 112. DOI:10.3389/fmicb.2020.00468.
135. Hou B. C., Wang E. T., Li Y., Jia R. Z., Chen W. F. et al. Rhizobial resource associated with epidemic legumes in Tibet. // *Microb. Ecol.* - 2009. - 57(1). - pp. - 69-81. DOI: 10.1007/s00248-008-9397-4.
136. Jarvis B.D.W., Van Berkum P., Chen W.X., Nour S.M., Fernandez M.P. et al. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* -1997. - 47. - pp. 895 - 898. DOI: 10.1099/00207713-47-3-895.
137. Jiang H., Wong W. H. SeqMap: mapping massive amount of oligonucleotides to the genome. // *Bioinformatics*. - 2008. - Vol. 24, - № 20. - pp. 2395 - 2396. DOI:10.1093/bioinformatics/btn429.
138. Jiao Y.S., Yan H., Ji Z.J., Liu Y.H., Sui X.H. et al. *Phyllobacterium sophorae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of *Sophora flavescens*. // *Int.*

- J. Syst. Evol. Microbiol. - 2015. - 65. pp. 399 - 406. DOI: 10.1099/ijs.0.067017-0.
139. Kaneko T., Maita H., Hirakawa H., Uchiike N., Minamisawa K., Watanabe A., Sato S. Complete genome sequence of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA6T. // Genes. - 2011. - 2(4). - pp. 763 - 787.
140. Kang C.H., Jung Y.T., Yoon J.H. *Mucilaginibacter sabulilitoris* sp. nov., isolated from marine sand in a firth // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2013 - 63 (Pt 8). - pp. 2865-2871. DOI:10.1099/ijs.0.045989-0.
141. Kapp D., Niehaus K., Quandt J., Muller P., Puhler A. Cooperative action of *Rhizobium meliloti* nodulation and infection mutants during the process of forming mixed infected *Alfalfa* nodules. // The Plant Cell. - 1990. - Vol. 2. - pp. 139-151.
142. Katoh K., Kuma K., Toh H., Miyata T. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. // Nucleic Acids Res. - 2005. - Vol. 33, - № 2. - pp. 511 - 518. DOI:10.1093/nar/gki198.
143. Kim M. K., Park M.J., Im W.T., Yang D.C. *Aeromicrobium ginsengisoli* sp. nov., isolated from a ginseng field. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2008.- 58 (9). - pp. 2025-2030. DOI:10.1099/ijs.0.64871-0. PMID 18768598.
144. Kurtz S., Phillippy A., Delcher A.L. et al. Versatile and open software for comparing large genomes. // Genome Biology. - 2004. - V.5. - I.2. - Article R12. - P. 9. DOI:10.1186/gb-2004-5-2-r12.
145. Laguerre G., van Berkum P., Amarger N., Prevost D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. // Appl. Environ. Microbiol. - 1997. - 63(12). - pp. 4748 - 4758.
146. Lamrabet Y., Bellogín R.A., Cubo T., Espuny R., Gil A. et al. Mutation in GDP-fucose synthesis genes of *Sinorhizobium fredii* alters *Nod* factors and significantly decreases competitiveness to nodulate soybeans. // Mol. Plant Microbe Interact. - 1999. - 12(3). - pp. 207-217.
147. Lei X., Wang E.T., Chen W.F., Sui X.H., Chen W.X. Diverse bacteria isolated from root nodules of wild *Vicia* species grown in temperate region of China. // Microbiology. - 2008. - 190(6). - P. 657 - 671. DOI: 10.1007/s00203-008-0418-y.
148. Li R., Li Y., Kristiansen K. et al. SOAP: short oligonucleotide alignment program. // Bioinformatics. - 2008. - Vol. 24, № 5. - pp. 713 - 714. DOI: 10.1093/bioinformatics/btn025.
149. Liu C. N., Toriello N.M., Mathies R.A. Multichannel PCR-CE microdevice for genetic analysis // Anal. Chem. - 2006. - Vol. 78. - pp. 5474 - 5479.
150. Löffler F.E, Yan J., Ritalahti K.M. et al. *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligate organohalide-respiring anaerobic bacteria, relevant to halogen cycling and ioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidetes* classis nov.,

- within the phylum *Chloroflexi*. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2013. – 63, Pt2. - pp. 625 - 635. DOI:10.1099/ijs.0.034926-0.
151. Lohrke S.M., Day B., Kolli V.S., Hancock R., Yuen J.P. et al. The *Bradyrhizobium japonicum noeD* gene: a negatively acting, genotype-specific nodulation gene for soybean. // Mol. Plant Microbe Interact. -1998. - 11(6). - pp. 476 - 488. DOI:10.1094/MPMI.1998.11.6.476.
 152. Lopez-Lara I.M., Geiger O. The nodulation protein *NodG* shows the enzymatic activity of an 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase. // Mol. Plant. Microb. Interact. - 2001. - 14(3). - pp.349 - 357. DOI:10.1094/MPMI.2001.14.3.349.
 153. Lopez-Lara I.M., Kafetzopoulos D., Spaink H.P., Thomas-Oates J.E. Rhizobial NodL O-acetyl transferase and NodS N-methyl transferase functionally interfere in production of modified Nod Factors. // J. Bacteriol. - 2001. - 183. - pp. 3408 -3416.
 154. Mantelin S., Saux M.F., Zakhia F., Béna G., Bonneau S., et al. Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. // Int. J Syst. Evol. Microbiol. - 2006. - 56, Pt.4. - pp. 827-839. DOI:10.1099/ijs.0.63911-0.
 155. Martensson A. M., Brutti L., Ljunggren H. Competition between strains of *Bradyrhizobium japonicum* for nodulation of soybeans at different nitrogen fertilizer levels. // Plant and Soil. - 1989. - Vol.117. - pp. 219-225.
 156. Martin W. *Archaeobacteria (Archaea)* and the origin of the eukaryotic nucleus // Curr Opin Microbiol. - 2005. - №8. - pp. 630 - 637.
 157. Martinez-Hidalgo P., Ramirez-Bahena M. H., Flores-Felix J. D., Igual J. M., Sanjuan, J., et al. ' Reclassification of strains MAFF 303099T and R7A into *Mesorhizobium japonicum* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2016. - 669(12). - pp. 4936-4941. DOI: 10.1099/ijsem.0.001448.
 158. Mikalsen J., Olsen A.B., Tengs T., Colquhoun D.J. *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* subsp. nov., isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2007. - 57. - pp. 1960-1965. URL: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64765-0>.
 159. Mergaert P., van Montagu M., Holsters M. The nodulation gene *nolK* of *Azorhizobium caulinodans* is involved in the formation of GDP-fucose from GDP-mannose. // FEBS Lett. - 1997. - 409. - pp. 312 - 316.
 160. Moawad M., Schmidt E.L. Occurrence and nature of mixed infections in nodules of field-grown soybeans (*Glycine max*). // Biology and Fertility of Soils. - 1987. - Vol. 5. - pp. 112-114.

161. Mornico D., Miché L., Béna G., Nouwen N., Verméglio A. et al. Comparative genomics of aescynomene symbionts: insights into the ecological lifestyle of nod-independent photosynthetic *Bradyrhizobia*. // *Genes*. - 2012. - 3(1). – pp. 35 - 61. DOI: 10.3390/genes3010035.
162. Muller P., Hynes M., Kapp D., Niehaus K., Puhler A. Two classes of *Rhizobium meliloti* infection mutants differ in exopolysaccharide production and in coinoculation properties with nodulation mutants. // *Molecular Genetics and Genomics*. - 1988. - Vol. 211. Iss. 1. - pp. 11-26. DOI:10.1007/bf00338388
163. Naimuddin M., Nishigaki K. Genome analysis technologies: Towards species identification by genotype // *Briefings in functional genomics and proteomic*. - 2003. - V.1, № 4. - pp. 356–371.
164. Novikova N., Safronova V. Transconjugants of *Agrobacterium radiobacter* harbouring sym genes of *Rhizobium galegae* can form an effective symbiosis with *Medicago sativa*. // *FEMS Microbiology Letters*. - 1992. - 93. - pp. 261-268. DOI: 10.1016/0378-1097(92)90472-Z.
165. Okon Y., Labandera-González C. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years of worldwide field inoculation. // *Soil Biol. Biochem.* - 1994. - V. 26, I.12. - pp.1591-1601. URL: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90311-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90311-5).
166. Okubo T., Fukushima S., Itakura M., Oshima K., Longtonglang A. et al. Genome analysis suggests that the soil oligotrophic bacterium *Agromonas oligotrophica* (*Bradyrhizobium oligotrophicum*) is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2013. - 79. - pp. 2542-2551. DOI: 10.1128/aem.00009-13.
167. Perret X., Staehelin C., Broughton W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. // *Microbiol. Mol. Biol.* -2000. - Rev. 64 (1). - pp. 180-201.
168. Preparation of Genomic DNA from Bacteria CTAB. / *Current protocols in molecular biology* edited by Frederick M. Ausubel et al. - 2000. - Chapter 2. DOI: 10.1002/0471142727.mb0203s27.
169. Pulido-Suárez L., Flores-Félix J.D., Socas-Pérez N., Igual J.M., Velázquez E. et al. Endophytic *Bosea spartocytisi* sp. nov. Coexists with rhizobia in root nodules of *Spartocytisus supranubius* growing in soils of Teide National Park (Canary Islands). // *Syst. Appl. Microbiol.* - 2022. - Nov; V.45, Is.6:126374. - 8p. DOI: 10.1016/j.syapm.2022.126374.
170. Qiu F., Huang Y., Sun L., Zhang X., Liu Z., Song W. *Leifsonia ginsengi* sp. nov., isolated from ginseng root. // *Int. J Syst. Evol. Microbiol.* - 2007. - 57(2). - pp. 405-408. DOI: 10.1099/ijs.0.64487-0.

171. Richter M., Rossello-Mora R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2009. - V. 106. - pp. 19126 - 9131. DOI: 10.1073/pnas.0906412106.
172. Ritalahti K.M., Justicia-Leon S.D., Cusick K.D. *Sphaerochaeta globosa* gen. nov., sp. nov. and *Sphaerochaeta pleomorpha* sp. nov., free-living, spherical spirochaetes. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2012. - 62. - pp. 210 - 216. DOI: 10.1099/ijs.0.023986-0.
173. Roche P. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipooligosaccharide signals. / Roche P., Debelle F., Maillet F., Lerouge P., Faucher C., Truchet G., Denarie J., Prome J.C. // Cell. -1991. - 67. - pp. 1131 - 1143.
174. Safronova V.I., Belimov A.A., Sazanova A.L., Kuznetsova I.G., Popova J.P., Andronov E.E. Does the Miocene-Pliocene relict legume *Oxytropis triphylla* form nitrogen-fixing nodules with a combination of bacterial strains? // International Journal of Environmental Studies. - 2017. - Vol. 74, №5. - pp. 706 - 714. <https://doi.org/10.1080/00207233.2017.1283947>.
175. Safronova V.I., Sazanova A.L., Kuznetsova I.G., Belimov A.A., Andronov E.E., Chirak E.R., Popova J.P., Verkhozina A.V., Willems A., Tikhonovich I.A. *Phyllobacterium zundukense* sp. nov., a novel species of rhizobia isolated from root nodules of the legume species *Oxytropis triphylla* (Pall.) Pers. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2018. - May; Vol. 68, Is. 5. - pp. 1644 - 1651. DOI: 10.1099/ijsem.0.002722.
176. Safronova V.I., Belimov A.A., Sazanova A.L., Chirak E.R., Verkhozina A.V., Kuznetsova I.G., Andronov E.E., Puhalsky J.V., Tikhonovich I.A. Taxonomically different co-microsymbionts of a relict legume, *Oxytropis popoviana*, have complementary sets of symbiotic genes and together increase the efficiency of plant nodulation. // Mol. Plant. Microbe. Interact. - 2018. - Aug; Vol. 31, №8. - pp. 833 - 841. DOI: 10.1094/MPMI-01-18-0011-R.
177. Safronova V., Belimov A., Andronov E., Popova J., Tikhomirova N. et al. Method for obtaining root nodules of the Baikal relict legumes in laboratory pot experiments. // International Journal of Environmental Studies. - 2017. - 74, I.5. - pp. 700 - 705. URL: <https://DOI.org/10.1080/00207233.2017.1283948>.
178. Safronova V.I., Kimeklis A.K., Chizhevskaya E.P., Belimov A.A., Andronov E. E. и др. Genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the relic species *Vavilovia formosa* (Stev.) // Fed. Antonie Van Leeuwenhoek. - 2014. - 105. - pp. 389-399. DOI:10.1007/s10482-013-0089-9.
179. Safronova V.I., Kuznetsova I. G., Sazanova A. L., Kimeklis A. K., Belimov A. A. et al. Extra slow-growing *Tardiphaga* strains isolated from nodules of *Vavilovia*

- formosa* (Stev.) Fed. // Arch. Microbiol. - 2015. - 197(7). - pp. 889-898. DOI:10.1007/s00203-015-1122-3.
180. Safronova V.I., Kuznetsova I. G., Sazanova A. L., Kimeklis A. K., Belimov A. A. et al. *Bosea vaviloviae* sp. nov. a new species of slow-growing rhizobia isolated from nodules of the relict species *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. // Antonie Van Leeuwenhoek. - 2015. - 107(4). - pp. 911-920. DOI:10.1007/s10482-015-0383-9.
181. Safronova V., Tikhonovich I. Automated cryobank of microorganisms: Unique possibilities for long-term authorized depositing of commercial microbial strains. // Microbes in applied research. Current Advances and Challenges. Edited by a Mendez-Vilas. - 2012. - pp.331-334. DOI.org/10.1142/9789814405041_0066.
182. Safronova V.I., Guro P.V., Sazanova A.L., Kuznetsova I.G., Belimov A.A., et al. Rhizobial microsymbionts of Kamchatka *Oxytropis* species possess genes of the Type III and VI secretion systems, which can affect the development of symbiosis. // Mol Plant Microbe Interact. - 2020. - Oct; 33(10) - pp. 1232-1241. DOI: 10.1094/MPMI-05-20-0114-R.
183. Safronova V., Belimov A., Sazanova A., Chirak E., Kuznetsova I. et al. Two broad host range rhizobial strains isolated from relict legumes have various complementary effects on symbiotic parameters of co-inoculated plants. // Front. Microbiol. - 2019. - V. 10. - № MAR. - P. 00514. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00514>.
184. Salmela L., Schröder J. Correcting errors in short reads by multiple alignment. // Bioinformatics. - 2011. - Vol. 27, №11. - pp. 1455 - 1461. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr170.
185. Sánchez M., Ramírez-Bahena M.H., Peix A., Lorite M.J., Sanjuán J. et al. *Phyllobacterium loti* sp. nov. isolated from nodules of *Lotus corniculatus*. // Int J Syst Evol Microbiol. - 2014. - 64. - pp. 781 - 786. DOI: 10.1099/ijss.0.052993-0.
186. Sazanova A.L., Safronova V.I., Kuznetsova I.G., Karlov D.S., Belimov A.A., et al. *Bosea caraganae* nov. a new species of slow-growing bacteria isolated from root nodules of the relict species *Caragana jubata* (Pall.) Poir. originating from Mongolia. // Int J Syst Evol Microbiol. – 2019. - 69(9). - pp. 2687-2695. DOI: 10.1099/ijsem.0.003509.
187. Sentausa E., Fournier P.E. Advantages and limitations of genomics in prokaryotic taxonomy. // Clin. Microbiol. Infect. - 2013. - 19(9). - pp. 790-795. DOI: 10.1111/1469-0691.12181.
188. Snoeck C., Verreth C., Hernandez-Lucas I., Martínez-Romero E., Vanderleyden, J. Identification of a third sulfate activation system in *Sinorhizobium* sp. strain BR816: the *CysDN* sulfate activation complex. // Appl. Environ. Microbiol. - 2003. - 69(4). - P.2006 - 2014. DOI: 10.1128/AEM.69.4.2006-2014.2003.

189. Squartini A., Struffi P., Doring H., Selenska-Pobell S., Tola E. et al. *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly *Rhizobium hedysari*), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2002. - 52. - pp. 1267 - 1276. DOI: 10.1099/00207713-52-4-1267.
190. Sui X., Han L., Wang E., Jiang F., Liu Y., Chen W. Novel associations between rhizobial populations and legume species within the genera *Lathyrus* and *Oxytropis* grown in the temperate region of China. // Sci. China C. Life. Sci. - 2009. - 52(2). - pp.182-92. DOI: 10.1007/s11427-008-0132-7.
191. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, evolutionary distance, and Maximum Parsimony methods. // Molecular Biology and Evolution - 2011 – Vol.28, Is. 10. - pp. 2731 - 2739. DOI: 10.1093/molbev/msr121.
192. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P. et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. // Nucleic Acids Res. - 2016. - 44(14). - pp. 6614 - 6624. DOI: 10.1093/nar/gkw569.
193. Teeling H., Meyerdierks A., Bauer M., Amann R., Glöckner F.O. Application of tetranucleotide frequencies for the assignment of genomic fragments. // Environ. Microbiol. - 2004. - 6(9). - pp. 938 - 947. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00624.x>.
194. Turuta O., Ryabtsev V., Novitskaya N., Vakarenko L. Protected microhabitats as a part of Baikal Regional Ecological Network. // Plant microreserves the site-based plant conservation and monitoring network, 2015. - [Электронный ресурс]. - Режим доступа: URL: <http://cretaplant.biol.uoa.gr/docs/Turuta2001.pdf> (дата обращения 22.09.2018).
195. Urwin R., Maiden M. C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology // Trends Microbiol. - 2003. - Vol. 11, № 10. - pp. 479-487. DOI: 10.1016/j.tim.2003.08.006.
196. Valverde A., Velázquez E., Fernández-Santos F., Vizcaíno N., Rivas R. et al. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 2005. – Vol. 55, Is.5 - pp. 1985 - 1989. DOI: 10.1099/ijms.0.63551-0.
197. Van Cauwenberghe J., Verstraete B., Lemaire B., Lievens B., Michiels J., Honnay O. Population structure of root nodulating *Rhizobium leguminosarum* in *Vicia cracca* populations at local to regional geographic scales. // Syst. Appl. Microbiol. - 2014. - 37(8). - pp.613 - 621. DOI: 10.1016/j.syapm.2014.08.002.
198. Vanlaere E., Baldwin A., Gevers D. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans*

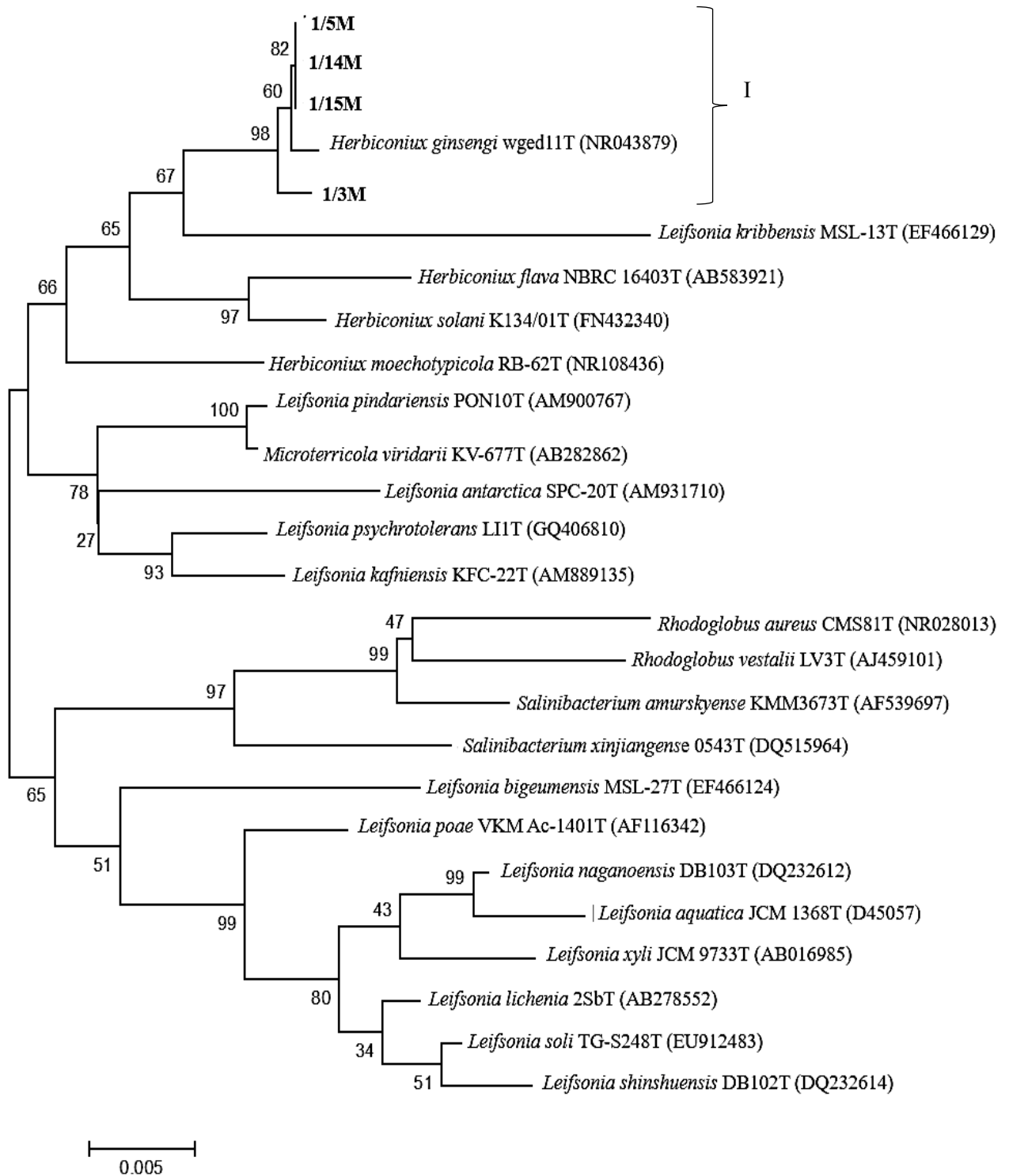
- sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2009. – Vol. 59, Is.1. - pp. 102 - 111. DOI: 10.1099/ijs.0.001123-0.
199. Vincent J.M.A manual for the practical study of root nodule bacteria. // IBP Handbook (Oxford and Edinburgh: Blackwell Scientific Publications). - 1970. - pp. 73 - 97.
200. Vos P., Hogers R., Bleeker M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. // Nucleic Acids Research. - 1995. - 23 (21). - pp. 4407 - 4414. DOI:10.1093/nar/23.21.4407.
201. Wais R.J., Keating D.H., Long S.R. Structure-function analysis of Nod factor-induced root hair calcium spiking in *Rhizobium*-legume symbiosis. // Plant Physiol. - 2002. - 129(1). - pp. 211 - 224. DOI:10.1104/pp.010690.
202. Wdowiak S., Malek W. Numerical analysis of *Astragalus cicer* microsymbionts. // Curr. Microbiol. - 2000. - 41. - pp. 142 - 148. DOI: 10.1007/s002840010108.
203. Wei G.H., Zhang Z.X., Chen C., Chen W.M., Ju W.T. Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the legume genera *Astragalus*, *Lespedeza* and *Hedysarum* in northwestern China. // Microbiological Research. - 2008. - 163(6). - pp. 651 - 662. DOI: 10.1016/j.micres.2006.09.005.
204. Xu L., Zhang Y., Wang L., Chen W., Wei G. Diversity of endophytic bacteria associated with nodules of two indigenous legumes at different altitudes of the Qilian Mountains in China. // Systematic and Applied Microbiology. - 2014. - 37(6). - pp. 457- 465. DOI: 10.1016/j.syapm.2014.05.009.
205. Yoon S.H., Ha S.M., Kwon S., Chun J.A. Large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. // Antonie Van Leeuwenhoek. - 2017. - 110(10). - pp. 1281-1286. DOI: 10.1007/s10482-017-0844-4.
206. Zhang R.J, Hou B.C., Wang E.T., Li Y. Jr.et al. *Rhizobium tubonense* sp. nov., isolated from root nodules of *Oxytropis glabra*. // Int. J Syst. Evol. Microbiol. - 2011. - 61(3). - pp. 512-517. DOI: 10.1099/ijs.0.020156-0.
207. Zhao L., Deng Z., Yang W., Cao Y., Wang E., Wei G. Diverse rhizobia associated with *Sophora alopecuroides* grown in different regions of Loess Plateau in China. // Systematic and Applied Microbiology. - 2010. - 33(8). - pp. 468-477. DOI: 10.1016/j.syapm.2010.08.004.

SUPPLEMENT 1 (Additional information)

Supplement 1. Table 1. PCR primers and conditions used in the identification of strains belonging to the genus *Phyllobacterium*.

Locus	Primer	Sequence (5'-3')	Fragment length	PCR conditions	Recommendation
ITS	FGPS149 0-72	TGCGGCTGGATCCCCTCCTT	1280	3 min. 30 sec.95°C, 35x (1 min. 10 sec.94°C, 1 min. 50°C, 2 min. 72°C) 7 min. 72°C	Normand et al. 1996
	FGPL132' -38	CGGGTTTCCCATTTCGG			
<i>atpD</i>	atpD-273F	CTGGGSCGYATCMTGAACGT	498	3 min 30 sec.95°C, 35x (40 sec.94°C, 40 sec.50°C, 1 min. 30 sec.72°C) 5 min 10 sec. 72°C	Weir et al., 2004
	atpD-771R	GCCGACACTTCCGAACCNGC CTG			
<i>glnII</i>	GSII-1	ACGCAGATCAAGGAATTCG	617	3 min 30 sec.95°C, 35x (40 sec.94°C, 40 sec.55°C, 1 min. 30 sec.72°C) 5 min. 72°C	Weir et al., 2004
	GSII-2	TGCCCAGCCGTTCCAGTC			
	GSII-3	GRTYTTTCGGCAAGGGYTC	438	3 min 30 sec.95°C, 35x (40 sec.94°C, 40 sec.49°C, 1 min. 30 sec.72°C) 5 min. 72°C	Weir et al., 2004
	GSII-4	CGAACGATCTGGTAGGGGT			
<i>recA</i>	recA-6F	CGKCTSGTAGAGGAYAAATC GGTGGA	549	3 min 30 sec.95°C, 35x (40 sec.94°C, 40 sec.50°C, 1 min. 30 sec.72°C) 5 min. 72°C	Weir et al., 2004
	recA-555R	CGRATCTGGTTGATGAAGATC ACCAT			

Supplement 1. Figure 1. *Rrs*-phylogram reflecting the taxonomic position of *Herbiconiux* isolates isolated from *Lathyrus humilis* nodules. Type strains are marked with "T". Numbers of isolates are shown in bold type. I - statistically significantly different cluster. The scale corresponds to 0.005 substitutions per 100 bp (evolutionary distances). Numbers indicate the statistical significance of clustering (in %) determined by bootstrap analysis of 1000 alternative trees.



Supplement 1. Table 2. Similarity (%) of *rrs* genes in fast-growing isolates isolated from *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum* nodules in the Baikal region and type strains of genera *Phyllobacterium* and *Rhizobium*. Designations. Type strains: 1 - *P. myrsinacearum* STM 948T, 2 - *P. trifolii* PETP02T, 3 - *P. ifriqiyense* STM 370T, 4 - *P. catacumbae* CSC19T, 5 - *P. endophyticum* PEPV15T, 6 - *P. brassicacearum* STM 196T, 7 - *P. loti* S658T, 8 - *Rhizobium giardinii* NBRC 107135T, 9 - *Rhizobium alarii* GBV016T.

Type strain	Isolate										
	<i>Rhizobium sp.</i>	<i>Phyllobacterium loti</i>			<i>Phyllobacterium endophyticum</i>		<i>Phyllobacterium sp.</i>				
	Hse-26	Hse-9	Hse-19	Hse-30	Hse-10	Hse-24	Hse-13	Hse-14	Hse-17	Hse-20	Hse-29
1	95.7	98.3	98.3	98.2	97.4	97.1	99.9	96.9	98.6	98.3	98.7
2	94.5	99.6	99.6	99.5	97.9	97.7	99.6	97.4	98.9	99.7	98.9
3	94.9	99.1	99.1	99.0	97.1	96.8	99.9	96.6	98.1	99.2	98.1
4	94.6	98.6	98.6	98.6	96.6	97.1	99.2	96.1	97.7	98.6	97.7
5	94.3	98.6	98.1	98.6	99.9	99.6	99.4	99.3	98.8	98.6	98.9
6	95.1	98.5	98.6	98.4	98.5	98.2	99.6	98.0	99.3	98.6	99.3
7	95.1	99.8	99.8	99.8	98.5	98.3	99.6	98.0	99.0	99.8	99.1
8	98.9	94.4	94.4	94.3	93.5	93.3	95.0	93.1	94.8	94.4	94.8
9	96.4	93.5	93.5	93.5	92.5	92.3	93.4	92.2	93.8	93.6	93.8

Supplement 1. Table 3. Similarity (%) of *rrs* genes in slow-growing isolates isolated from *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum* nodules in the Baikal region and the closest type strains of the genus *Bosea*.

Type strain	Isolate <i>Bosea</i> sp.		
	Hse-21	Hse-22	Hse-32
<i>Bosea vaviloviae</i> Vaf-18T	98.5	98.0	98.5
<i>Bosea massiliensis</i> 63287T	98.4	97.5	98.4
<i>Bosea eneae</i> 34614T	98.6	97.7	98.6
<i>Bosea vestrisii</i> 34635T	98.6	97.7	98.6

Supplement 1. Table 4. Fatty acid profile of *Phyllobacterium* strains isolated from *Oxytropis triphylla* nodules and type strains of closely related species. All values are given as a percentage of the total composition. Strains: 1 - Tri-36; 2 - Tri-38; 3 - Tri-48T; 4 - Tri-53; 5 - *P. endophyticum* LMG 26470T; 6 - *P. brassicacearum* LMG 22836T; 7 - *P. sophorae* LMG 27899T.

Fatty acid	Isolates from <i>Oxytropis triphylla</i>				Reference type strains		
	1	2	3	4	5	6	7
11- метил-18:1 ω7c	5.4	1.6	5.5	8.2	1.8	2.2	3.5
12:00	9.7	13.1	9.7	14.9	12.8	12.6	11.3
15:0 ANTEISO	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0
16:00	9.4	6.8	7.2	9.5	4.7	8.6	7.9
16:0 3OH	3.8	2.0	2.5	3.4	0.0	3.5	2.7
16:0 ANTEISO	0.0	0.0	1.1	0.0	1.3	0.0	0.0
17:0 ANTEISO	6.0	3.3	8.7	2.4	9.9	0.0	0.0
18:00	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9
18:1 2OH	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
18:1 ω7c	20.5	46.4	18.6	23.2	23.0	44.0	53.1
19:0 cyclo ω8c	6.6	0.0	3.6	7.8	0.0	0.0	0.0
20:00	14.4	9.3	8.7	15.7	3.3	20.5	13.4
Summed Feature 2 ^a	4.2	5.3	3.5	6.2	1.7	6.1	4.6
Summed Feature 3 ^b	2.0	2.1	1.3	2.0	0.0	2.4	2.6
Summed Feature 5 ^c	2.7	1.3	3.8	1.2	5.0	0.0	0.0
unidentified 16.582 ^d	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	0.0	0.0
unidentified 18.814 ^e	14.4	8.9	22.6	5.6	28.1	0.0	0.0

a- Summed Feature 2 is composed of fatty acids 14:0 3-OH and/or 16:1 ISO I and/or an unidentified fatty acid of equivalent chain length 10.928 that could not be separated.

b- Summed Feature 3 is composed of fatty acids 16:1 ω7c and/or 15:0 ISO 2-OH that could not be separated.

c- Summed Feature 5 is composed of fatty acids 18:2 ω6.9c and/or 18:0 ANTEISO that could not be separated.

d- Unidentified 16.582 is a fatty acid of equivalent chain length 16.582.

e- Unidentified 18.814 is a fatty acid of equivalent chain length 18.814.

Supplement 1. Table 5. Phenotypic properties of strains of the genus *Phyllobacterium* isolated from *Oxytropis triphylla* nodules and type strains of closely related species. Strains: 1 - Tri-36; 2 - Tri-38; 3 - Tri-48T; 4 - Tri-53; 5 - *P. sophorae* LMG 27899T; 6 - *P. brassicacearum* LMG 22836T; 7- *P. endophyticum* LM26470T. Примечание: - отрицательная реакция; +, положительная реакция; ±, неопределенная реакция.

Phenotypic property	Isolates from <i>O. triphylla</i>				Reference type strains		
	1	2	3	4	5	6	7
Isolation source	Root nodules				Root nodules	Rhizoplane	Root nodule
Nitrate reduction	-	-	-	-	+	+	-
Urease hydrolysis	+	+	+	+	+	+	-
Growth at:							
pH 6	-	-	-	-	+	±	+
pH 5	-	-	-	-	-	-	+
1% NaCl	+	+	-	-	-	-	+
Utilization of:							
Dextrin	-	-	-	-	±	-	-
D-maltose	+	+	+	+	+	+	-
D-trehalose	+	+	+	+	+	+	-
Saccharose	+	+	+	+	+	+	-
D-turanose	+	+	+	+	+	+	-
D-raffinose	-	-	-	-	±	-	-
D-melibiose	-	-	-	-	+	-	+
β-methyl -D-glucoside	-	-	-	-	-	±	±
N-acetyl-β-D-mannosamine	+	+	+	+	-	-	+
N-acetyl -D-galactosamine	-	-	-	-	±	+	-
N-acetylneuraminic acid	+	+	+	+	-	-	+
α-D-glucose	+	+	+	+	+	+	-
1% sodium lactate	-	-	-	-	-	+	+
D-fructose-6-PO4	+	+	+	+	+	±	±
Glycyl-L-proline	±	±	±	±	+	+	-
L-alanine	-	-	-	-	+	+	+
L-arginine	+	±	+	±	-	-	-
L-histidine	-	±	-	-	+	+	+
L-serine	-	-	-	-	-	±	+
Pectin	+	±	+	-	±	±	-
D-galacturonic acid	-	±	-	±	+	±	+
L-galactonic acid lactone	-	-	-	-	+	±	±

D-glucuronic acid	±	-	±	-	-	+	+
D-glucuronic acid	+	+	+	+	+	±	+
Mucinic acid	-	-	-	-	±	-	-
Quinic acid	±	±	±	-	±	+	-
D-glucuronic acid	-	-	-	-	+	-	-
Methylpyruvate	±	±	-	±	+	+	+
D-lactic acid methyl ester	-	±	-	±	-	-	-
α-keto-glutaric acid	±	-	±	-	+	+	+
D-appletic acid	+	±	+	±	+	+	+
Bromo-anthraic acid	-	-	-	-	+	+	+
Tween 40	+	+	±	+	-	-	-
γ-aminobutyric acid	±	-	±	±	-	±	+
α-hydroxybutyric acid	+	+	+	+	+	±	-
α-ketobutyric acid	+	+	±	±	+	+	+
Propionic acid	±	+	±	±	-	±	-
Acetic acid	+	+	+	+	-	+	+
Formic acid	+	+	+	+	-	+	-
Resistance to:							
Troleandomycin	-	-	-	-	-	±	±
Rifampicin	-	-	-	-	+	+	+
Lincomycin	-	-	-	-	+	+	+
Vancomycin	-	-	-	-	-	-	+
Nalidixic acid	-	-	-	-	+	-	+

Supplement 1. Table 6. Similarity of *rrs* gene sequences between isolates from *O. popoviana* nodules belonging to the genus *Mesorhizobium* and type strains of the most similar species: 1 – *M. japonicum* MAFF 303099T, 2 – *M. erdmanii* USDA 3471T, 3 – *M. opportunistum* WSM2075T, 4 – *M. kowhaii* ICMP 19512T.

Isolate	Similarity of <i>rrs</i> gene sequences (%)			
	1	2	3	4
Opo-224	99.89	99.89	99.66	97.12
Opo-225	99.86	99.85	99.64	97.85
Opo-228	100	100	99.79	98.00
Opo-229	99.92	99.93	99.71	97.92
Opo-235	100	100	99.78	98.00
Opo-239	99.61	99.68	99.38	97.59
Opo-240	99.85	99.85	99.64	97.91
Opo-242	100	100	99.80	98.00
Opo-245	99.71	99.71	99.50	97.77
Opo-248	99.85	99.86	99.64	97.85
Opo-249	100	100	99.77	97.91
Opo-324	98.11	98.06	98.18	100

SUPPLEMENT 2 (Sequences)

Supplement 2.1. Partial gene sequences of 16s RNA isolates isolated from *Lathyrus humilis* nodules.

Isolate 1/3M (*Herbiconiux* sp.)

CATGCAAGTCGAACGCGTGAAGAGGAGCTTGCTCCTCTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTGACTCTGGGATAAGCGTTGGAACGACGTCTAATACCGGATAC
GACAACCGATGGCATCATCTGGTTGTGGAAGAATTTCCGGTCAAGGATGGACTCGCGGCTATCAGCTAGTTGGTGGAGTAAATGGCCCAAGCGGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTG
ACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATTTGACAAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACCGCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGT
AAACCTCTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCACGGGTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTGCCGGAATTTGGGCGTAA
AGAGCTCGTAGGGGTTTTCGCGCTCTGCTGTGAAAAGTGGAGGCTCAACCTCCAGCTGCAAGTGGGTACGGGACAGACTAGAGTCCGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAAT
GCGCAGATATCAGGAGGAACCAATGGCGAAGGACAGATCTCTGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGTAGTCCACGCCGTAACAGTT
GGGAAGTGTGGGGACCATCCACGGTCTCCGTGTCGAGCTAACGCATTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAGTCAAAGGAATTTGACGGGGGCCGCCACAAGCGG
CGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACGAGAACGGCCAGAAATAGTCAACTCTTGGACACTCGTAAACAGGTGGTGCATGGTTGCTGCTCAG
CTCGTGTCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTAATGGTGGAACTCATAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCTTATGCTTGGGCTTACGCTGCTCAATGGCCGTAACAAGGGCTGCAATACCGTAAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCCGATTGAGGCTGCA
ACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGTGGATCAGCAACGCCAGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCAGTCAAGTCAAGAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGC
CCAACC

Isolate 1/5M (*Herbiconiux* sp.)

CATGCAAGTCGAACGCGTGAAGAGGAGCTTGCTCCTCTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTGACTCTGGGATAAGCGTTGGAACGACGTCTAATACCGGATAC
GACAACCGATGGCATCATCTGGTTGTGGAAGAATTTCCGGTCAAGGATGGACTCGCGGCTATCAGCTAGTTGGTGGAGTAAATGGCCCAAGCGGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTG
ACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATTTGACAAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACCGCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGT
AAACCTCTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCACGGGTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTGCCGGAATTTGGGCGTAA
AGAGCTCGTAGGGGTTTTCGCGCTCTGCTGTGAAAAGTGGAGGCTCAACCTCCAGCTGCAAGTGGGTACGGGACAGACTAGAGTCCGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAAT
GCGCAGATATCAGGAGGAACCAATGGCGAAGGACAGATCTCTGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGTAGTCCACGCCGTAACAGTT
GGGAAGTGTGGGGACCATCCACGGTCTCCGTGTCGAGCTAACGCATTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAGTCAAAGGAATTTGACGGGGGCCGCCACAAGCGG
CGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACGAGAACGGCCAGAAATAGTCAACTCTTGGACACTCGTAAACAGGTGGTGCATGGTTGCTGCTCAG
CTCGTGTCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTAATGGTGGAACTCATAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCTTATGCTTGGGCTTACGCTGCTCAATGGCCGTAACAAGGGCTGCAATACCGTAAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCCGATTGAGGCTGCA
ACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGTGGATCAGCAACGCCAGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCAGTCAAGTCAAGAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGC
CCAACCTTGTGGAGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGTGATTAGGACTAAGTC

Isolate 1/9M (*Mucilaginitracter* sp.)

CATGCAAGTCGAACGCGTGAAGAGGAGCTTGCTCCTCTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTGACTCTGGGATAAGCGTTGGAACGACGTCTAATACCGGATAC
TGCAATGTGGCATCACAAGCAATCAATATTTATAGGATTAAGATGGGCATGCGGAACATTAGCTAGTTGGTGGAGTAACTGCTCACAAGGCTACGATGTTAGGGGATCTGAGAGGATGACC
CCCCACACTGGTACTGAGACACGGACAGACTCTACGGGAGGAGCAGTAAGGAATTTGGTCAATGGGCGCAAGCCTGAAACGACCTGCCGCGTGCAGGAAGACGGCCCTACGGGTTGTA
ACTGCTTTTATACCGGAATAAACCCCTTTACGAGTAGAGGGTTGAATGACGTAAGAAATAGGATCGCTCAACTCCGTGCAAGCGGTAATACGAGGATCCAAAGCGTTATCCGATTTA
TTGGGTTAAAGGGTGCAGTGGGTTTTAAGTCAAGGGTGAAGAGCGGTAACTATCGCAGTCCCTTGACTGAAGAGCTTGAATACACTAGAGGTAGGGGATGAGCAAGTGTAG
CGGTGAAATGCATAGATATGTGACAGAACCAATTGCGAAGGAGCAGTACTATGGTGTCAATTGACACTGAGGACGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCTCGTAGTCCACGCCCT
AAACGATGAATACTCGATGTTGGCGATATACGGTACGCTAAGCGAAAGCGTAAAGTATCCACTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTTGACGGGGGCCGCCACAAGC
GGAGGAGCATGTTGGTTAATTCGATGACCGGAGAACCTTACCGGGCTTGAAGATTAGTGAATAAAGCAGAGACGCTTTAGTCTTCCGGACAGAAACTAGGTGCTGATGGTGTGCTGCA
GCTCGTCCGTGAGGTGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATGTTAGTTGCCAGCAGTAAAGTGGGGACTCTAAACAGACTCCCTATGCAATAGAGAGGAAGGAGGGGACG
ACGTCAGTCAATGACGCTTACGTCGGGGCTACACAGCTGCTCAATGGGAGTACAGAGGGGCTGCTACTGGCAACAGGATGCAATCTCTCAAAGCTGTTACAGTTCGGATCGGGTCTG
CAACTCGACCCGTAAGTGGATTGAGTAAATCGCTATCAGCAATGACGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCAGGATGGAAGTGGAGTGCCTGAAGTGCCTG
ACCGCAAGGAGCGTCTAGGGTAAAGTCGGTAACCTGGGCTAAGTC

Isolate 1/10K (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*)

CATGCAAGTCGAACGCGTGAAGAGGAGCGGACAGCGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCTTGACTACGGAATAACGAGGGAACCTTGTAATAACCGTATGTCTTCGGGAGAA
GATTTATCGGTCAAGGATGAGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCTACCAAGGCGAGCATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC
AAACTCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCGCGGTGAGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTACCGGAGAGATAATGACG
GTATCCGGAGAAAGACCCCGGTAACCTCTGCGCAGCAGCCGTAATACGAAAGGGGCTAGCGTTGTTCCGAATTAAGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGTCAGGGTGA
ATCCAGGGCTCAACCTGGAACTCCCTTGTACTGTCATCTGGAGTATGGAAGAGTGAAGTGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGC
GGCTCACTGTGCTTACTGACGCTGAGGTGCGAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTGTAGTCCAGCCGTAACAGTGAATGTTAGCCGTCGGGAGTACTGTTCCGTGGCG
CAGTAAACGATTAACATTCGCTGGGAGTACGGTGCAGGATTAAGTCAAAGGAATTTGACGGGGGCCGCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTA
CCAGCCCTGACATGCGCGCTACTGCAAGATGCAAGGTTCCCTTCCGGGACCGGGAACACAGGTTGCTCATGGCTGTCTGAGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCTCGCCCTTAGTGGCAGCATTAAAGTGGGACTCTAAGGGGACTGCCGTTGATAAGCCGAGAGGAAGTGGGGATGACGTCAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGTACACAGCTG
CTACAATGTTGGTGAAGTGGGAGCAGCAGCGAGTGTAGCTAATTCAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTGGAAATCGCTAGTAATCGCGGATC
AGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTACCGAAGGTAGTGCCTAACCGCAAGGAGGACGCTAACACCGTAGGGTACGCA

Isolate 1/11M (*Tardiphaga robiniae*)

CATGCAAGTCGAACGCGTGAAGAGGAGCGGACAGCGGTGAGTAACGCGTGGGAACATACCTCTTGTTGGAACAACACAGGGAACCTTGTAATAACCGGATAAGCCCTTACGGG
GAAAGATTTATCGCCGAGAGATTGGCCCGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCTACCAAGGCGAGCATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACG
GCCAAACTCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCGCGGTGAGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTTTGTACGGGAGAGATAAT
GACGGTACCGTAAGAATAAGCCCGGTAACCTCTGCGCAGCAGCCGCGTAATACGAAAGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGTGCATAGGCGGGTTTTAAGTCAAGG
TGAAATCTGGAGCTCAACTCGAACTGCCCTTGTACTGAAAGTCTTGAGTATGGGAGAGTGAAGTGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACACCAAGTGGCGAA
GGCGGCTACTGGCCATAACTGACGCTGAGGCAGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTGTAGTCCAGCCGTAACAGTGAATGCCAGCCGTTAGTGGTTACTACTAGTGT
GCGCAGTCAACTTTAAGCATTCCGCTGGGAGTACGGTGCAGAAATTAAGTCAAAGGAATTTGACGGGGGCCGCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGACGCAACGCGCAGAAC
CTTACAGCCCTGATGCTTACTGACCGTACAGAGATGGAACCTTCCCTTCCGGGATAGAGCAGAGGTGCTGATGGTGTGCTGAGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAAC
GAGCGCAACCCCGTCTTGTGCTACCAATTTAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGTTGATAAGCCGCGAGGAAGTGGGGATGACGTCAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGTACAC
ACGTCATCAATGGCGGTGCAATGGGATGCAAAGGGGCGACCCCTCGAAATCTCAAAGCCGCTCAGTTCCGATTGGGCTCTGCAACTCGAGCCATGAAGTGGAAATCGCTAGTAACTG

GGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTCTACTGAAAGGCGAGTGCCTAACCCGAAGGGGGCAGCTGACCACGGTAGGGTCA
GCGACTGGGGTGAAGTC

Isolate 1/14M (*Herbiconiux sp.*)

CATGCAAGTCGAACGGTGAAGAGGAGCTTGTCTCTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTACTCTGGGATAAGCGTTGGAAACGACGTCTAATACCGGATAC
GACAACCGATGGCATCATCTGGTTGTGGAAAGAAATTCGGTCAAGGATGGACTCGCGGCTATCAGCTAGTTGGTGGAGTAAATGGCCCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGT
ACCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATTTGACAATGGCGCAAGCTGATGACGCAACCGCGTGGGATGACGCGCTCGGGTGT
AAACCTCTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTGTCCGGAATTTGGGGCTAA
AGAGCTCGTAGGCGGTTGTCTGCTGTGAAAACTGGAGGCTCAACCTCAGCTCAGTGGGTACGGCAGACTAGAGTGGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAAT
GCGCAGATATCAGAGGAACCCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTGTAGTCCACCGCTAAACGTT
GGGAACTAGATGTGGGGACATTCACCGTCTCCGTGTCCGAGCTAACGCTTAAGTTCCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTCACGGGGGCCGCAAGCGG
CGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACGAGAAGCGCCAGAAATGGTCAACTTTTGGACACTGTAACAGAGTGTGATGTTGTCTGCTCAG
CTCTGTCTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTAAATGGTGGAACTCATAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCTTATGCTTGGGCTTACGCTATGCTACAATGGCCGCTACAAGGGCTGCAATACCGTAAGGTGGAGCGAAATCCCAAAAGCGCGGTCTCAGTTCCGATTGAGGTTGCA
ACTGACCTCATGAAGTCGGAGTCTAGTAACTGTTGGATCAGAACCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCAGTCAAGAGTCGGTAACACCCGAAGCGGGTGG
CCAACCTTGTGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGATCGGTGATTAGGACTAAGTC

Isolate 1/15M (*Herbiconiux sp.*)

CATGCAAGTCAGGGTGAAGAGGAGCTTGTCTCTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTACTCTGGGATAAGCGTTGGAAACGACGTCTAATACCGGATACGA
CAACCGATGGCATCATCTGGTTGTGGAAAGAATTCGGTCAAGGATGGACTCGCGGCTATCAGCTAGTTGGTGGAGTAAATGGCCCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTACG
CGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATTTGACAATGGCGCAAGCTGATGACGCAACCGCGGTGAGGATGACGGCCTCGGGTGTGA
AACCTCTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGAACGCGTTTCCGGAATTTGGGGCTAA
GAGCTCGTAGGGCGTTGTCCGCTGTCTGTGAAAACTGGAGGCTCAACCTCAGCTGCGTGGTACGGGCGAGACTAGAGTGGCGTAAAGGGGAGATTGGAATTCGTTGGTGGAGGGAAATG
GC

Isolate 2/5-1 (*Rhizobium sp.*)

CATGCAAGTCGAGCGCCCTCACGGGAGCGGACAGCGGTGANTAAACGCTGGGAATCTACCAACTCTACGGAATAACTCAGGAAACTTGTGCTAATACCGTATACGCCCTTCGGGGGAA
GATTTATCGGAGTTGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTTTGGGACTGAGACACGGCC
AAACTCTACGGGAGGCGAGTGGGGAATTTGGACAATGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCGCGTGTGTGATGAAGGCTTAGGGTTGAAAGCACTTTCACCGGAGAAGATAATGACG
GTATCCGGAGAAGAAGCCCGGTAACCTGTCGACGAGCCGCGTAATCAAGAGGGGCTAGCGTGTTCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCACGTAGGGGATCGATCAGTACGGGGTAA
ATCCAGAGCTCAACTCTGAAACTGCCTTTGATACCTGTCTAGAGTATGGAAGAGTGGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTAATGTAAGATTTCCGGAGAACACCGATGGCGAAGCGG
GCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTGTAGTCCAGCTGTAACAGTGAATGTTAGCCGTGGCAAGTTTACTTGTCTGGTGGCC
AGCTAACGCAATAAACTTCCGCTGGGAGTACGCTGCGCAAGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCGCAACGCGGTGGAGCATGTTGGTTAATTCGAAGCAACCGCGAGAATCTTAC
CAGCTTTCAGATCCCGATCGCGGACAGTGGAGACATTGCTCTTCAAGTGGTGGATCGGTGACAGGTTGCTCATGCTGTCTGTCAGCTGTCTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGA
GCGAACCTCGCCCTTAGTTCGACGATTCAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCGGGTGAAGCCGAGAGGAAGTGGGGATGACGCTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACG
TGCTACAATGGTGGTACAGTGGGAGCGAGACCGCGAGGTCGAGCTAATCTCAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTCTCAACTCGAGTGCATGAAGTGGAAATCGCTAGTAAATCGCAGA
TCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGTGTTCACCGAAGTGTGCGCTAACCCGAAGGAGGCGACTAACCCAGGTAGGGTACG
ACTGGGTGAAGT

Isolate 2/5(3) (*Aeromicrobium sp.*)

CATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCTCCTTCGGGAGTACAGAGCGGCAAGCGGTGAGTAACACGTGAGCAATCTGCCCTTCTCATCGGAATAACCAATTGGAAACGATGGCTAATGCGAATATGAC
CTCGGATCATGTTCTGAGGTGGAAGCTCCGCGGAGAAAGATGAGTCCGCGCTATCAGCTTGTGGTGGAGTAAATGGCTCACAAGGCTTACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTACG
GGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCTGATCCAGCAACCGCGGTGAGGATGACGGCTTCGGGTTGTA
ACCTCTTTCAGCAGGACGAAGCGAAAGTACGCTGACCTGAGGAGGAGGACCGCCACTCAGTCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCGAGCGTTGTCCGGAATTTGGGCGTAAAG
GGCTCGTAGGCGGTTGTCTGCTGGGAGTGAAGTCAAGGCTCAACCTGAGCGTCTCCGATACGGGCGAGACTAGAGGTATGACGGGGAGAAGCGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGC
GCAGATACAGGAGGAACCGGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGGCAATTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGAGCGAACAGGATTAAGATACCTGGTGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGG
CGTAGGTGTGGGACCTTCCACGCTCTCCGTGCGGACGTAACGCTAAGCGCCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCAACGCGCGGA
GCATGCTGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTGACATATACCGGAAAGCTGAGAGTGTAGCCCCCTTTGGTCCGTTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGACGCTGTG
CTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGTCTATGTTCCAGCAGCTAATGGTGGGACTCATAGGAGACTCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTTGGGATGACGCTCAAG
TCTTCATGCCCTTATGTCAGGGCTTCAAGCATGCTACAATGGCCGCTACAAGGGCTGCGAAACCGCAAGGTGGAGCGAATCCCAAAAGCGGTTCTCAGTTCCGATTGGGGTCTGCAACTCGA
CCCCATGAAGTCGGAGTCTGATAGTAAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACGTCATGAAAGTCGGCAACCCGAAGCCAGTGGCCCAAC
GTTTACGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGGCTGGCGATTGGGACGAAGTC

Isolate 2/5(4) (*Aeromicrobium sp.*)

TGCAAGTCGAGCGGTAAGGCTCCTTCGGGAGTACAGAGCGGCAAGCGGTGAGTAACACGTGAGCAATCTGCCCTTCTCATCGGAATAACCAATTGGAAACGATGGCTAATGCGAATATGACCT
CGGATCATGTTCTGAGGTGGAAGCTCCGCGGAGAAAGATGAGTCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGAGTAAATGGCTCACAAGGCTTACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTACCGG
CCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCTGATCCAGCAACCGCGGTGAGGATGACGGCTTCGGGTTGTA
TCTTTCAGCAGGACGAAGCGAAAGTACGCTGACCTGAGGAGGAGGACCGCCACTCAGTCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCGAGCGTTGTCCGGAATTTGGGCGTAAAGGGC
TCGTAGGCGGTTGTCTGCTGGGAGTGAAGTCAAGGCTCAACCTGAGCGTCTCCGATACGGGCGAGACTAGAGGTATGACGGGGAGAAGCGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCA
GATATCAGGAGGAACCGGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGGCAATTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCG
TAGGTGTGGGACCTTCCACGCTCTCCGTGCGGACGTAACGCTAAGCGCCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCAACGCGCGGAGCA
TGCTGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTGACATATACCGGAAAGCTGAGAGTGTAGCCCCCTTTGGTCCGTTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGACGCTGTCTG
GAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGTCTATGTTCCAGCAGCTAATGGTGGGACTCATAGGAGACTCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTTGGGATGACGCTCAAGTCT
TCATGCCCTTATGTCAGGGCTTCAAGCATGCTACAATGGCCGCTACAAGGGCTGCGAAACCGCAAGGTGGAGCGAATCCCAAAAGCGGTTCTCAGTTCCGATTGGGGTCTGCAACTCGAC
CCATGAAGTCGGAGTCTGATAGTAAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACGTCATGAAAGTCGGCAACCCGAAGCCAGTGGCCCAACCT
TTACGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGGCTGGCGATTGGGACGAAGTC

Isolate 2/10K (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*)

ATGCAAGTCGAGCGCCCGCAAGGGAGCGGCGAGCGGGTGAAGTAAACGCTGGGAAATCTACCTTGTACTACGGAATAACGCAAGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTCTCTCGGAGAAAG
ATTTATCGTCAAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTTTGGGACTGAGACACGGCCCAA
ACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCTGATCCAGCCTATCCCGCTGAGTGTGATGAAGGCTTAGGGTTGTAAGGCTTTTACCAGGAGAAGATAATGACGCT
ATCCGAGAAAGAACCCCGGCTAACTCTGTCGACGAGCCGCGTAAATCAAGAGGGGCTAGCTGTTGTTCCGGAATTAAGTGGGCTAAACGACGCTAGGCGGATGATCAGTACGGGGTGAAT
CCAGGGCTCAACCTGGAATCCGCTTGTGATCTGTGATCTGGAGTATGGAAGAGGTTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGATGATATTCGAGGAAGGTTGGGATGACGCTCAAGTCT
CTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGTTGATGTCACGCGTAAACGATGAATGTTAGCCGTGGGCGATATACTGTTCCGTTGGCGCA
GCTAACGCATTAACATTCGCTGGGAGTACGGTGCAGAAATTAATAACTCAAAGGAATGACGGGGGCCGCAACGCGGTGGAGCATGTTGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACC
AGCCCTTACATGCCCGCTCTGACAGATGCAAGGTTCCCTGGGAGCCGCGACAGGTTGCTGATGGGCTGACTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA

ACCCCTGCCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTTAAGGGGACTGCCGGTATAAGCCGAGAGGAAGTGGGGATGACGTCAGTCCATCGCCCTACGGGCTGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGTGGTACAGTGGGCGAGCAGCAGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCATCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAG
CATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGTGTTTTACCCGAAGGTAGTGCCTAACCCGAAGGAGGCGAGTAACACCGGTAGGGTCAGCGACTG
GGTGAAGTC

Isolate 2/12M (*Rhizobium sp.*)

CTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCGCAAGGGGAGCGGAGCGGGTGTAGTAACGCGTGGGAATCTACCTTACTACGGAATAACCGAGGAACTTGTGCTAATACCGTA TGTGCTCTCGG
GAGAAAGATTATTCGGTTCGAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGTACTGTTGGTGGGTAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCGGCCGCTTGGGACTGAGACA
CGGCCAAACTCATACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCGCGTGAAGTGAAGGCCCTAGGGTTGAAAGCTCTTCCACCGGAGAAGATA
ATGACGGTATCCGGAGAAGAGCCCGGCTAACTTCTGTCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGCTAGCGTGTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGTCAGG
GGTGAATCCAGGGCTCAACCTGGAACTGCCTTTGATACTGTGATGTGAGATGTGAAGAGGTGAGTGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCACTGGCG
AAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGAAATGTTAGCCGCTGGGCGATATACTGTT
GGTGGCGAGTAAACCAATTCCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAATAAAGTAAAGGAAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGCA
GAACCTTACCAGCCTTGACATGCCCGGCTACTTGCAGAGATGCAAGTTCCTTTCGGGACCGGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTGTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTTAAGGGGACTGCCGGTATAAGCCGAGAGGAAGTGGGGATGACGTCAGTCCATCGCCCTACGGGCTGGGCTAC
ACAGGTGTACAATGGTGTGACAGTGGGCGAGCAGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCATCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATC
GCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGTGTTTTACCCGAAGGTAGTGCCTAACCCGAAGGAGGCGAGTAACACCGGTAGGGT
CAGCGACTGGGTGAAGTCTGAACA

Isolate 2/13K (*Mesorhizobium ciceri*)

CATGCAAGTCGAGCGCTCGAAGAGGAGCGGAGCGGGTGTAGTAACGCGTGGGAATCTACCCATCTCTACGGAACAACCTCCGGGAACTGGAGCTAATCCGTATACGCTCTCGGGAGAAA
GATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGACTGAGACACGGCC
AACTCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCGCGTGAAGTGAAGGCCCTAGGGTTGAAAGCTCTTCAACCGTGAAGATAATGACG
GTAACCGTAGAAGAGCCCGGCTAACTTCTGTCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGCTAGCGTGTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATTGTAAGTT AGGGGTGAA
ATCCCGGGCTCAACCCCGGAACTGCCTTAACTGGAATCTCGAGTCCGAGAGGAGTGAAGTGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCACTGGCGAAGGC
GGCTCACTGGCTCGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACATGAGAGCTAGCCGTGGCAAGTTTACTTGTGCGTGG CG
CAGCTAACGCTAAGCTCCCGCTGGGAGTACGGTGCAGGATTAATAAAGTAAAGGAAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGCGAGAACCTTA
CCAGCCCTGACATCCCGGTCGGGTTCCAGAGATGGATCCCTCAGTTCGGCTGGACCGGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTGTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACG A
GCGCAACCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTTAAGGGGACTGCCGGTATAAGCCGAGAGGAAGTGGGGATGACGTCAGTCCATCGCCCTACGGGCTGGGCTACACAC
GTGCTACAATGGTGTGACAGTGGGCGAGCAGCGAGGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCATCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGG
ATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGTGTTTTACCCGAAGGCGCTGTGCTAACCCGAAGGAGGCGAGGACACCGGTAGGGTCAAG
GACTGGGTGAAGTC

Supplement 2.2. Partial gene sequences of 16s RNA isolates isolated from *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum* nodules.

Isolate Hse-15 (*Stenotrophomonas sp.*)

GCTGGCGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGTAAGCAGAGGAGCTTGTCTTGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTTTTTCGTGGGGGATAACGTAGG
GAAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAGGCCGGGAACTTCGGCCTGGCGGATTAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTGGCGGGTAATGGCCACCAAGGCGACGA
TCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACCTGGAATGAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGT
GGTGAAGAGGCTTGGGTTGTAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAGCAGCGGTTAATACCCGGTTGTTCTGACGTTACCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCTGTCAGCAGCCCGGT
AATACGAAGGGTGAAGCGTACTCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGTGGTGGTGTGTTAAGTCTGTCGTAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATGGAATCGCTAAGTAACTAGAA
TGTGGTAGAGGGTACGGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGATATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCGACTACCTGGGCCAATTCGATGAGGCGCAAGCGTGGGGAGC
AAACAGGATTAGATCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAAGTGGATG

Isolate Hse-16 (*Mycobacterium sp.*)

TCGACGAAAGGCCCTTGGGGTGTCTGAGTGGCGAAGCGGTGAGTAACAGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGAATAGGACCGCTCTTCA
TGGGTTGGTGGAAAGCTTTTGGGTTGGGATGGGCGCCGCGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGCTGAGAGGGTACCGGCCACACTG
GGACTGAGATACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCGCGTGGGGATGACGGCCTTGGGTTGTAACCTCTTTTCA
TACCAGCAAGCGCAAGTGAAGTGTAGTACAGAAAGAGACCGCCAACTACGTCAGCAGCGCGGTAATACGTAAGGTTCCGAGCGTGTCCGGAACTACTGGGCGTAAAGAGCTGATAGT
GGTTTGTCCGCTGTTCTGTAAGAACTCAGCTTAACTGTGGCGTGGGCGGATACGGGCGAGCTGGAGTACTGCAGGGAGACTGGAATCTCTGTTGAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAG
GAGGAAACCGGTGGCGAAGGCGGCTCTGGGCACTAAGTACGCTGACGCTGAGCGGAAAGCGAGGCGAAGCAGGATAAGTAACTCCGTTGATCCAGCCGTAACCGGTTGGGTACTAGGTG
AGGGTTTCTTCTGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAGGAATGACGGGGCCCGCACAAAGCGGCGAGCATGTG

Isolate Hse-18 (*Agromyces*)

CCCTCTTCTAAGGAGCAACTCGGATGCTTCGGATGTTTCGAGTGCAGACAGATCGGGTCTTTGTGGCTCGTGGTGTGCTATGGGTGGAACATTGACATAGGTGCTGGTTGATTTCTGCTCT
ACTTAGTACGCTCCGTTTGGGGTGGAAAGGTTGGGTTGGGATGGGCGCCGCGCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGCTGAGAGGGTACCGGCCACACTG
TCAGGCCCTTACTGTTGCCGATGGTTTGAATCGGTTGGTGGGGTTCGGCGTCTGTTGAGAATACATAGTGACGCGAGCATTTAGAATAGCCTTTCAGGGCTGTTTCAAAAAGGTTG
AATCGCAAGGGGATCCTTCCGGGTTGTTTGGTGTGTTCACTGTCAATTTCCGACGACCTTCCGGGTTGTCAGCATTCGATCTCATGTGATTTCAAGTTTTAAGAGCAAAACCGTGGATGCT
TGGCATCTGGAGCGAAGAGGACGTGTAATCTGCGATAAGCCTCGGGAGCTGATAAACGAGCTGTGATCCGAGGATTTCCGAATGGGAAAAACCCCGGA

Isolate Hse-25 (*Sphingomonas*)

AGCGCTTTGATCTTCGGATCGAAGAAGAGCTTCTCCATTCCAAAAGAACATATGCCCGCTCTCATGTCCCTTCACTGGATATCGTCTTTCGGAAGCGATTAGCCTGAGCTGGCTCTCGCGC
CTGGCCCTAATGGGCTGGCCAGGATATGGCATGGGGCCGGTGTAGTCAAGTGGTGTAGAGCGCACGCTGATAAGCGTGAAGTCTGATAGTTCACTCTCGGCCACCATTCGCCAGTTTT
CGAGACGATTTAGCGGAGCTAAATCGCACGAAACAGGACGGCCAGCGCTGCAAGCGCGCCACAAGGCGCAGCTTTGCTGCGACTGACGGCGCAGCGGACCGTCCCAACAAGGTCGCGG
CAGTGCACCTTGGTGTGACCTTTGCTGGGTACGGGCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGGTTGCTTTGCAAGCATCAGGTCATCGGTTGATCCCGATAGGCTCCCAATCCGACGCGGACGAG
ACGCAATTAGCGAAGCTAATTCGACGACCGCAAGGACGGCAGCGCTGCATAGCGCGCCACAAGGCGCGGCTTTGCTGCGACTGACGGCGCAAGCGTGCACAACCTAGCCAAATATCCAGATG
ATGAAGCACCGAGATCTGCTGATACGAGCAGTACGGTCTTACGGACCGTGCTTTTTGACATTTGTAATGGGTTTTTAAATCGATGCCGTGACGGCGTGGGTTTACGGGCAACCGCTGTA
CTGACCGGAAACATGGGTGTGCGATCGAGTTTACCCTCCGATCTGCGCCGCAATAAGCTGAGATTTAAATCATCCGATCAAGAGGACGGGTTGAAGCATGCTTCCGTTCCGCTGTGT A
AAACCAGCATCACTGCTGCGGATTTCTGTGGGTTTGGACCATCCAGTGTGCTGTTGGTGGTGGACTCTAAGCGTGAAGTAAATCATCCGATCAAGAGGACGGGCTTGAAGCATT
GCTTCCGTTCCGTTGTTAAACACGACATCACTGCTGCGGAGTTTCTGTGGGTTTGGACCATCCAGTGTGCTGTTGGTGGTGGACTCTAAGCGTGAAGTAAATCATCCGATCAAGAGGACGGGCTTGAAGCATT
GCCTTGGCATGTACAGCGATGAAGGACGTGGCAGCTGCGATAAGCGTGGAGCC

Isolate Hse-27 (*Acinetobacter sp.*)

GCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGGTAGCTTGTACTGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCTATTAGTGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCGC
 ATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTTGGCCTTGCCTAATAGATAGCCTAAGTCGGAATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGG
 ATGATCCGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCTGATCCAGCCATGCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGT
 TGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACCTAGATTAATACTTTAGGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCAGGCTAATCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAGCG
 TTAATCGGATTTACTGGCGTAAAGCGTGCAGTGGCGGCAATTAAGTCAATGTGAATCCCCGAGCTTAACCTGGGAATTGCATTGATAGTGGTGGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGA
 ATTCAGGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCGACCTTCTGGCTAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAAACAGGATTAGATAACCTG
 GTAGTCCATGCCGTAACGATGCTACTAGCCGTTGGGGCCCTTGGGCTTGTAGTGGCGAGTAAAGTACGCGATAAGTACGCGCTGGGAGTACGCTGCAAGACTAAAACCTAAAATGAATTGAC
 GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACTTACCTGGCTTACATACAGAAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGGCTTCGGGAACTCTGATACAGGT
 GCTGCATGGCTGTGCTGAGCTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTTTCTTATTGGCAGCAGCTCGGGTGGAACTTAAGGATACTGCCAGTGAACAACTGGA
 GGAAGGCGGGGACGAGCTCAAGTCAATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGTTACAAAGGGTGTACACAGCGATGTGATGCTAATCTAAAAGCCGATCGTAGT
 CCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCAAGTCAAGTCCGAAATCGTAGTAATCGCGGATCAGAATGCGCGGTAAGTCCCGGCTGAATACGTTCCCGGGCTGTACACACCAGCCGCTCACACCTGGGAGTTTGGT
 ACCAGAAGTAGGTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGCTTACCAGGTGTGGCCGATGACTGGGTGAAGTCTGAACAA

Supplement 2.3. Partial gene sequences of 16s RNA isolates isolated from *Oxytropis triphylla* nodules.

Isolate Tri-34 (*Phyllobacterium* sp.)

GCTACACATGCAAGTCGAGCGCCCGCAGGGGAGCGGCGAGCGGGTGTAGTAAACGCTGGGAATCTACCTTTTCTACGGAACAACGAGGAACTCAGCTAATACCGTATACGGCCTTTGGGC
 GAAAGATTTATCGGAGAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGTGTGAGAGGATGATACGCCACTGGGACTGAGACAG
 GCCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTAGTGTGAAGGTTTAAAGGCTTTTACCAGGTGAAGATAATG
 ACGGTAACCGGAGAAAGCCCGCTAATCTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGCTAGCCTTGTTCGGATTACTGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTTAAAGTCAAGGGT
 GAAATCCCGGGGCTAACCCCGAACTGCCTTTGATACTGGTAGTCTTGTAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCAAGTGGCGAA
 GGCGCTCACTGGCTCGATGACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATAACCTGTGTAGTCCACGCCGTAACATATGAGAGCTAGCCGTCGGGCGAGTACTGTTCCGT
 GGCGCAGTAAACGCTAAGCTCTCCGCTGGGAGTACGGTGCAGGATTAACCTCAAGGAATGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAA
 CCTTACCAGCCCTGACATCCCGATCGCGGTTACCAGAGATGGTATCCTTCAGTTAGGCTGGATCGGTGACAGGTGCTGATGGCTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
 AACGAGCGCAACCTCGCCCTTGTGTCATCATTAGTTGGCACTTAAGGGGACTCGCGGTGATAAGCGGAGAGGAAGTGGGGATGACGCTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTA
 CACACGTGCTACAATGGTGGTACAGTGGGCGAGGACCCGAGGCTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATC
 GTGGATCAGAATGCCACGTTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTGCTGTGTAACCCGAAGGAGGCGAGCAACCCAGGTAGGGT
 CAGCGACTGGGGTGAAGTCTGA

Isolate Tri-35 (*Phyllobacterium ifriqiense*)

GCTTACACATGCAAGTCGAGCGCCCGCAGGGGAGTGGCAGACGGGTGAGTAAACGCTGGGAATCTACCAATTTCTCGGAACAACACATGGAACGCTGTGCTAATACCGAATGAGCCCTTGGGG
 GAAAGATTTATCGGAATTGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGTGTGAGAGGATGATACGCCACTGGGACTGAGACAG
 GCCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTAGTGTGAAGGTTTAAAGGCTTTTACCAGGTGAAGATAATG
 ACGGTAACCGGAGAAAGCCCGCTAATCTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGCTAGCCTTGTTCGGATTACTGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTTTAAGTCAAGGGT
 GAAATCCCGGGGCTAACCCCGAACTGCCTTTGATACTGGAAGTCTTGTAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCAAGTGGCGAA
 GGCGCTCACTGGCTCGATGACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATAACCTGTGTAGTCCACGCCGTAACATATGAGAGCTAGCCGTCGGGCGAGTACTGTTCCGT
 GGCGCAGCAACGCATTAAGCTCTCCGCTGGGAGTACGGTGCAGGATTAACCTCAAGGAATGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAA
 CCTTACCAGCCCTGACATCCCGATCGCGGTTACCAGAGATGGTTCCTTCAGTTAGGCTGGATCGGTGACAGGTGCTGATGGCTGTGCTGAGCTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
 ACGAGCGCAACCTCGCCCTTGTGCTCATTTCAGTTGGGCACTTAAGGGGACTCGCGGTGATAAGCGGAGAGGAAGTGGGGATGACGCTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTAC
 ACACGTGCTACAATGGTGGTACAGTGGGCGAGGACCCGAGGCTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATC
 GTGGATCAGAATGCCACGTTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTGCTGTGTAACCCGAAGGAGGCGAGCAACCCAGGTAGGGT
 CAGCGACTGGGGTGAAGTCTGA

Isolate Tri-40 (*Phyllobacterium ifriqiense*)

GCTTAAACACATGCAAGTCGAAAGCCCGCAGGGGAGTGGCAGACGGGTGAGTAAACGCTGGGAATCTACCAATTTCTCGGAACAACACATGGAACGCTGTGCTAATACCGAATGAGCCCTTGG
 GGGAAAGATTTATCGGAATTGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGTGTGAGAGGATGATACGCCACTGGGACTGAGAC
 ACGGCGCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTAGTGTGAAGGTTTAAAGGCTTTTACCAGGTGAAGATAATG
 AATGACGGTAACCGGAGAAAGCCCGCTAATCTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGCTAGCCTTGTTCGGATTACTGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTTTAAGTCAAG
 GGGTGAATCCCGGGGCTAACCCCGAACTGCCTTTGATACTGGAAGTCTTGTAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCAAGTGG
 CGAAGCGGCTCACTGGCTCGATGACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATAACCTGTGTAGTCCACGCCGTAACATATGAGAGCTAGCCGTCGGGCGAGTACTGTT
 GGTGGCGCAGCAACGCATTAAGCTCTCCGCTGGGAGTACGGTGCAGGATTAACCTCAAGGAATGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCA
 GAACTTACCAGCCCTGACATCCCGATCGCGGTTACCAGAGATGGTTCCTTCAGTTAGGCTGGATCGGTGACAGGTGCTGATGAGGCTGCTGATGAGGCTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
 GCAACGAGCGCAACCTCGCC

Isolate Tri-41 (*Sphingomonas* sp.)

CTCCTTTAAGGATATCGGCGAAAGCGCTCGAGCCTCGGCTCGGGGAGAGCTTCTCCATTTCAAAGAACAATTTGCCCGCTCTCATGTCCCTTCATCTGGATACTGCCTCGGGGCTGGA
 TCGAAAGATCTGGCCTTTTCGGGCGATAGCTGAGCTGCTCGCCGCTCGCGCCCTTTGGGGTACGCGGGTATGGCGATGGGCGGTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACGCTGATAAGCGT
 GAGGTGATAGTTCACTCTACTCGGCCACCATGACTTCTTATGCGCAACAAGCGGATGTTGAGAAAGTTTGGAAAGTTGGTTGGGGGCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGGTTGCTTTGC
 AAGCATCAGTTCATCGGTTCCGATCCGATAGGCTCCACCAATCCGCAATTTGCGAGACGAAATAGCGGAAGCAATTCGACGCAAAACAAGGACGCGCAAGCGGCAAGCGCCACAAGGCG
 CAGTTTTGCTGCGACTGACGCGCGGCTGCGCAACCACTAGCCAATATCAGATGATTAAGGACCGAGATCTGTTGCTAACGCAAGCAGTATTGGCGCTCGCAAGAGCCTGCTTTTTGACATT
 GTGAATGGGTTTTCAAATCGATGCCGTTGACGGCTTGGTTTTGCGGCGCAACGCTGAAGCAGGAGCCGGAACATGGGTGCTGCTACCAAGTTTACCCTCTGTTGGCGCGCCGGAATACAGCTG
 AGATTTAAATCATCGCATCAAGAGGGTTTTACCCGCGCATTGCTGAGTGGAAAGCCTGGTAAAACACGATCAGTCTGCTGCGAGTTTCTGTGGGTTTGGACCCATCCAGTGTGCTGTT
 GGTGGTGTGACTCTCAAGCGTGAAGGCAATTCGTTGATGCTTGGCATGTACAGGCGATGAAGGACGTGGCAGCTGCGATAAGCGTGGGGGAGCCGTGAGCAGGACTGATCCGA
 CGATTTCCGATG

Isolate Tri-42 (*Bradyrhizobium* sp.)

CTTAAACACATGCAAGTCGAGCGCGTAGCAATACGAGCGGCGAGCGGGTGTAGTAAACGCTGGGAACGTAACCTTTTGGTTCCGGAACAACACAGGAAACTTGTGCTAATACCGGATAAGCCCTTA
 CGGGGAAAGATTTATCGCGAAAGATCGGCCCGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTGTGCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGAG
 CACGGCCGAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTAGTGTGAAGGCTTAAAGGCTTTTGGTGGGGAAGA
 TAATGACTGTACCGCAAGAATAAGCCCGGCTAATCTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGCTAGCCTGCTCGGAATCTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTTAAAGTCCG
 TGGTGAATCCTGGAGCTCACTCCAGACTGCCTTGCATGACTGGGAGTCTCGAGTTCGGGAGAGGTGAGTGGAACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAAGAACACCAAGTGGC
 GAAGGCGGCTCACTGGCCGTAAGTCACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATAACCTGTTAGTCCAGCCGTAACAGATGAATGTAGCCGTTGGTGGTTCACCTTCA
 GTGGCGCAGTAAACGCTTAACTTCCGCTGGGGAGTACGGTGGGCAAGATTAACCTCAAGGATTAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCT
 AGAACCTTACCAGCCCTGACATGCTCAGGACCGGTCGAGAGATGTGACCTTCTNTTCGAGCCTGGAACACAGGTGCTGATGGCTG

Isolate Tri-43 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*)

TCGAGCGCCCGCAAGGGGAGCGCAGACGGGTGAGTAACCGTGGGAATCTACCTTACTACCGGAATAACCGAGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGCTCTCGGGAGAAAGATTATCG
GTCAAGGATGAGCCCGTGTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA TTGGGACTGAAACACGGCCAACTCCTAC
GGGAGGCGAGTGGGAATATTGGACAATGGGCCCAAGCTGATCAACCATGCGCGTGTAGTATGAAGGCCTAGGGTTGTAAGCTCTTCCACGGAGAAAGATAATGACGGTATCCGGA
GAAGAAGCCCGGCTAATCTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGTACGCTTTCGGAATTAAGCTGGGCTAAAGCGCACGTAGGCGGATGATCAGTCAAGGGGTGAAATCCGAGG
CTCAACCTGGAAGTCCCTTGTACTGTGATCTGGAGTATGGAAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCCAGTGGCGAAGGCGGCTACTGG
TCCATTACTGACGTGAGGTGCGAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCCGCTAAACGATGAATGTTAGCCCGTGGGGCAGTACTGTTTGGTGGCGAGCTAACG
CATTAACATTCGCTGGGAGTACGCTGCGAAGATTAATACTCAAAGAAATTGACGGGGCCGCAACAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGCAGAACCTTACGACCCCTT
GACATGCCCGGCTACTTGACAGATGCAAGGTTCCCTTCGGGGACCGGGACAGGTTGCTGATGGCTGCTGTCAGCTCGTGC

Isolate Tri-44 (*Bosea vestrisii*)

GCTACACATGCAAGTGAAGCGGCACTTCGGTGTAGTGGCAGACGGGTGAGTAACCGTGGGAACGTACCTTTCGGTTTCGGAATAATTAGGGAACTTGGACTAATACCGGATACGCCCTTCG
GGGAAAGATTTATCGCCGATAGATCGGCCCGCTGTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTTGGGACTGAGAC
ACGGCCAACTCTACGGGAGGCAAGTGGGGAATTTGGACAATGGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCGCGTGTAGTGTGAAAGCCCTTAGGGTTTAAAGCTCTTTTGTCCGGGAAGAT
AATGACTGTACCGGAAGAATAAGCCCGGCTAATCTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGTACGCTTGTGCGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGGTAGGCGGACTCTTAAGTCGG
GGGTGAAAGCCAGGGCTCAACCTGGAATTCCTGATCTGAGAGTCTTGTAGTTCGGAAGAGGTTGGTGGAACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACACCAAGTGG
CGAAGGCGGCAACTGGTCCGATGACGCTGAGGCGCGAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATGCAAGCCGTTGGGGTGCATGCAC
TTCAGTGGCGAGCTAACGCTTAAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGATTAATACTCAAAGAAATTGACGGGGCCGCAACGCGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCG
CAGAACCTTACGAGCTTTTACATGTCGGGTTTATCGACAGAGATGCTTTCTTCAAGTTCGGCTGGCGGAACACAGGTGCTGATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCTCGCCCTAGTTGCCATCATTAGTTGGGAAGTCTAGGGGACTCCCGGTGATAAGCCCGGAGGAGGTTGGGGATGACGTCGAAGTCTCATGGCCCTTACAGGCTGG
GCTACACAGCTCAATGCGGAGTACGATGGGCAAGGAGGCGACCTCGAGTAACTCCCAAAAAGCCGTCAGTTTCAAGTTGACTCTGCAACTCGAGTACATGAAGGTGAAGTGAACGCTAG
TAATCGTGGATCAGATGCCAGGTTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGGTTTACCGAAGGCGTCCGCTAACCGCAAGGAGGCGAGGACACCGT
AGGCTCAGCGACTGGGGTGAAGT

Isolate Tri-45 (*Phyllobacterium* sp.)

TACACATGCAAGTGAAGCGCCCGCAAGGGGAGCGGCGAGACGGGTGAGTAACCGTGGGAATCTACCTTTCACGGAACACTGAGGGAACTTACGCTAATACCGTATACGGCCTTTGGGGCA
AAGATTTATCGGAGAAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCTACGGGAGGCGAGCTGGGGAATATTGGACAATGGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCGCGTGTAGTGTGAAAGCTCTTTCACCGGTGAAGATAATGAC
GGTAACGGGAGAAAGTAACTCTGTCGACGACGCGCGGTAATACGAAGGGGGTACGCTTGTTCGGAATTAAGCTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTCTTAAGTCAGGGGTGA
AATCCCGGGGCTCAACCCCGGAAGTGCCTTGTACTGTTAGTCTTGTAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGG
GGCTCACTGGCTGATGACGCTGAGGTGCGAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACATGAGAGCTAGCCGTGGGCGAGTACTGTTGCGTGGC
GCAGCTAACGCATTAAGCTCTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGATTAATACTCAAAGAAATTGACGGGGCCGCAACGCGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGCAGAACCTT
ACCAGCCCTTACATCCCGATCGCGGTTACCAGAGATGGTATCCTTCAAGTGGGAGTGGTGGTACAGAGGTGCTGATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCTCGCCCTAGTTGCCATCATTAGTTGGGACTCTAAGGGGACTCCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAAGTGGGGATGACGTCGAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACA
CGTGCTACAATGTTGTTGACAGTGGGCGAGGACCGGAGGTCGAGTAACTCCCAAAAAGCCATCTCAGTTTCGGAATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTG
GATCAGAATGCCAGGTTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGGTTTACCGAAGGCTGCTGTCTAACCGCAAGGAGGCGAGGCAACCGTAGGGTACG
CGACTGGGGTGAAGTGAACA

Isolate Tri-46 (*Sphingomonas* sp.)

CCCCCTTTCTAAGGATTCGCGGAAAGCGCTCTGGTTTCGACCAAGGAGAAGAGCTTCTCCATTCCAAAGAATACAGCCCGCTCCTCATGTCCCTTCACTGGATACCAACCGCCGAGGT
AATTGGCCGGTTGGTTAGCTGAGCTGGCTACGCGCTGCTCGGCCCTTTGGTTCGCTGAGCATGGCATGGGGCCGGTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACGCTGATAAGCGTGAAGTGTG
AGGTTCAACTCTACTCGGCCCACTGCGCAGGCGGGCTTTCAGCCAAAGCGCGCCAGACGGGGCCTTAGCTCAGTTGGGAGAGCGCTAGCTTTGCAAGCTTGAAGTCTGCGGTTGATCCCG
ACAGGCTCCACAGCGCTCAGCGCGCAGGATGTTGCGGGGGCGCGCCCAAGATACAGGGATGAAGATCAGATCCGCTGCGTGTAGTGTAGCGGTAGCGGATCGCTATGGCGGTGCG
TTGCGTCTTGTGATGTAATGGGTTTTTCAAACTGATGCGGTGAGGTGTTGCTTTTCAAGTTCGAGTGCAGAAAGTGAATATCGGCACCGAACATCAAGGCTGAGATAATCAACACACAAAACCA
ACGCTGCTGCTGCTGCGGAGTTTCTGTCAGTCTTCGAGTATCCAGGATGATCCAGGATGATCCGATGCTGCTGTTGGTGGTGTGATGTCAGGCTGAGGTAAGGGCTTGGTGGATGCTACAGGCGATG
AGGACGTGGCAGCTGCGATAAGCGTGGTGTGAGTGTGAGCAAACTTGGACCGACGATTTCCGAATGGG

Isolate Tri-47 (*Lysobacter* sp.)

CCCCCTTTAGAGACTAAAGACAGCAAATGCTGGCCGGACGTCGCGACAAGTAACTGCATGTAGTCCGGGACATCCCAAGGGGGTGTGTCGGGGAGCGTCCCGTTCAAAGTTTGAACATG
GGGCTTTAGCTCAGCTGGGAGAGCACTGCTTTGCAAGCAGGGGGTGTGCGGTTGATCCCGACAAGCTCCCAAAACAGCCGTCACGACTTTTGGGCTGTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCA
CCCCTGATAAGGGTGAGGCCGGTGTTCGAGTCTCCAGACCCACCATCCCCGACGACGAAGTATGGCGCACATCAAGAAATGAAGCGTTTTGGGCTTGGAGCCAGGGCGGCTCTTT
GAAAATTGGAATAAGTAGCGAGCGTTTTGAGACGAATGTCATGAGCTGTGAGGCTAAGGGCAGTGTCTTCGGACACTTATTAAATGAGTCGTTATTCGAGTCCGGGCTTTGACCCCTG
GACCCAAACGCCCTGAGGCAACTGGGGTTATATGTCGAAGCAATAAGCGCACACGGTGGATGCTTGGCGGTGAGGCGGATGAAGGACGTGGCAGCCTCGAAAAAGTGGGGGGAGCTG
GCAACAAGCATTTGATCCGAAATTCGGAATGGGGAAACCCCGA

Isolate Tri-51 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*)

CGCAAGGGGAGCGGACAGCGGTGAGTAACCGTGGGAATCTACCTTACTACCGGAATAACCGAGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGCTCTCGGGAGAAAGATTATCGGTCAAGGAT
GAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTTGGGACTGAAACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCA
GCAATGGGGAATATTGGACAATGGGCCCAAGCCTGATCCAAACATGCGCGTGTAGTGTGAAAGGCGCTAGGTTGTAAGCTCTTTCCACGGAGAAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAAGG
CCCGGCTAATCTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGTACGCTTGTTCGGAATTAAGCTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATGATCAGTCAAGGGTGAATCCAGGGCTCAACCC
TGAAATGCTTTGATACTGTGATCTGGAAGTATGGAAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTAC
TGACGCTGAGGTGCGAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATGTTAGCCCGTGGGCAAGTACTGTTCCGTTGGCGCAGCTAACGCAATTAAC
ATTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGATTAATACTCAAAGAAATTGACGGGGCCGCAACGCGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTACATGCC
CGGCTACTGCGAGATGCAAGGTTCCCTTCGGGGACCGGGACACAGGTTGCTGATGGCTGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCCTTGT
GCCAGCATCAGTTGGGACTTAAAGGGACTGCGGTGATAAGCGGAGAGGAGGTTGGGGATGACGTCGAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTACAATGGTGGTGA
GTGGGACGCGA

Isolate Tri-52 (*Bosea vestrisii*)

GCTACACATGCAAGTGAAGCGGCACTTCGGTGTAGTGGCAGACGGGTGAGTAACCGTGGGAACGTACCTTTCGGTTTCGGAATAATTAGGGAACTTGGACTAATACCGGATACGCCCTTCGGG
GGAAAGATTTATCGCCGATAGATCGGCCCGCTGTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTTGGGACTGAGACACG
GCCAACTCTACGGGAGGCAAGTGGGGAATTTGGACAATGGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCGCGTGTAGTGTGAAAGCCCTTAGGGTTTAAAGCTCTTTTGTCCGGGAAGATAAT
GACTGTACCGGAAGAATAAGCCCGGCTAATCTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGTACGCTTGTTCGGAATTAAGCTGGGCGTAAAGGGCGGTAGGCGGACTCTTAAGTCGGGG
TGAAAGCCAGGGCTCAACCTGGAATTCCTGATCTGAGAGTCTTGTAGTTCGGAAGAGGTTGGTGGAACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACACCAAGTGGCGAA
GGCGCCAACTGTTCCGATACTGACGTGAGGCGGCAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATGCGAGCCGTTGGGTTGATGACTTCACTGAGT
GGCGCAGCTAACGCTTTAAGCTTCCGCTGGGAGTACGGTGCAGAGATTAAACTCAAAGAAATTGACGGGGCCGCAACAGCGGTTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACCGCGAGAA
CCTTACCAGCTTTGACATGTCGGGTTTATCGACAGAGATGCTTTTCAAGTTCGGCTGGGCGGAAACAGGTTGCTGATGGCTGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG

ATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCGAGTTCTTGGGCCGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAAGGATAGATACCTGTTAGTCCACGCCGTAACCTGTGGCGTAGATGTGGGGACCTTTCCACGGTTCCGTGTCTGATAGTAACCGCAATAAGCGCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCCGACAAGCGGGAGCATCGCGAATTAATTCATGCA

Isolate Tri-149 (*Neorhizobium* sp.)

TCGAGCGCCCGCAAGGGAGCGCGACAGCGGGTGAATACCGGTAACCGTACCGCAAACTCCGGGAACTGGAGCTAATACCGTATACGCCCTTCGGGGAAAGATTATCGGGGATGGATGAGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGCGACGATCCATAGTGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAAATTTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCTGAGTGATGAAGGCCATTAGGGTTGTAAGGCTCTTCA CCGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGTTCGGAATTACTGGGGCTAAAGCGCAGTAGGG

Isolate Tri-152 (*Rhizobium* sp.)

GCTTAAACACATGCAAGTCGAGCGCCCGCAAGGGAGCGGCAGCAGGGTGAGTAACCGTGGGAACTACCCTTTACTACGGAATAACGACGGGAAACTTTGCTAATACCGTATGTCCTTGGGGAAAGATTATCGGGGAAAGATTATCGGTAAGGGATCGGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGCGACGATCCATAGTGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACACGGCCAACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAAATTTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCTGAGTGATGAAGGCCATTAGGGTTGTAAGGCTCTTTCACGGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGGGTAAATCCAGAGCTCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTGTCTGGAGTATGAAGAGGTGAGTGAATCCGAG

Isolate Tri-155 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*)

TCGAGCGCCCGCAAGGGAGCGCGACAGCGGGTGAATACCGTGGGAACTACCCTTTACTACGGAATAACGACGGGAAACTTTGCTAATACCGTATGTCCTTGGGGAGAAAGATTATCGGTCACAGGATAGCGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGCGACGATCCATAGTGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAAACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCCCAAGCTGATCAACCATGCCGCTGAGTGATGAAGGCCATTAGGGTTGTAAGGCTCTTTCACGGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGTTCGGAATTACTGGGGTAAAGCGCACGATAGGCGGATCGATCAGTCAGGGGTGAAATCCAGGGCTCAACCTGGAACTCTTGTACTCTGAGTATGGAGTATGGAAGTCCGAGTATGAGAGTGAATTCGTAGATATTGGGAGAACACACAGTCGGCAAGGGCGTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCAGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATAGATAACCTGAGTCCACGCCGTAACGATGAATGTTAGCCGTCGGGGCAGTATACTGTTCCGTGGCGCACTAAGCATTAAACATTCCCGCTGGGGAGTAGCGTGCAGAGTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGGCGCAGAACCTTACCAGCCCTGACATGCCCGGCTACTTGACAGATGCAAGTTCCTTCGGGGACCGGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCTCCGCTTGTGGGGAGCCTTTCCACGGTTCGCGTCAAGGGGACTGCCGCTGAATAAGCCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCACGTCCTATGCGCCCTACGGGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGTGACAGTGGGACGCGAGCAGCGAGTGAGCTAATCTCAAAAAGCCATCTCAGTTGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGTTTTACCGAAGGTAGTGCCTAACCGCAAGGAGGACGTAACACCGTAGGGTCAGCGACTGGGGTGAATGCTAACAAGGTA

Isolate Tri-154 (*Agromyces ramosus*)

CATGCGATCGAACGATGATCCGGTCTTGCACCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGGACTCTGGGTAACCCCGAGAAATCGGAGCTAATACCGGATAGGACCTGGAACCGATGTTTTGGGTGGAAAGTTTTTCGGTCTGGGATGGAAGTCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGAGTAATGGCTACCAAGGCGTCGACGGGTAGCGGCTGAGAGGGTGACCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGTGGGAAATTTGGACAATGGGCCAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCTGAGTGATGAAGGCCATTAGGGTTGTAAGGCTCTTTCGCGGAGAAGATAATGACTGTACCGGAAGAAATAAGCCCCGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGTCTGGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGGATAGGCGGACTCTTAAGTCGGGGTGAAAGCCCAAGGCTCGTAGCTGGGGACCTTTCCACGGTTCGCGTGTCTGATAGTAAAGCGCAATAAAGCCGCGGCTGGGGAGTACCGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCCGACAAGCGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATAACCGAGAAGCCCTAGAAAATAGGG

Isolate Tri-471 (*Bosea* sp.)

AGTCGAACGGGCACCTTCGGTGCTAGTGGCAGACGGGTGAGTAACACGTGGGAACGTACCTTTCGGTTCCGGAATAATCCAGGGAACTTGGAATAATACCGGATAAGCCCTTCGGGGAAAGATTATCGCCGATAGCTCGGCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAAATTTGGACAATGGGCCAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCTGAGTGATGAAGGCCATTAGGGTTGTAAGGCTCTTTCGCGGAGAAGATAATGACTGTACCGGAAGAAATAAGCCCCGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGTCTGGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGGATAGGCGGACTCTTAAGTCGGGGTGAAAGCCCAAGGCTCAACCTGGAATTCGCTGATGAGAGTCTGAGTTGGAAAGAGGTGGTGGAACTGCAAGTGTAGAGGTGAATTCGTAGATATTGCAAGAACACACGTTGGCAAGGCGGCCAATGGTCCGATACGCTGAAGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCAGCCGTAAAGCAGTAAGTCCAGCCGTTGGGTTGATGCACCTCAGTGGCGAGCTAA

Isolate Tri-474 (*Sphingomonas* sp.)

CCCCTCCTTTTAAGGATACGCGGAAAGCGCTTCTGGTTTCAGCCAGGAGAAGAGCTTCTCTATTCCAAAGAACATAGCCGCGTCTCATGTCCCTTCATCACTGGATACCAACCGCCGAGGTAACTTGGCCGTTGGTGGAGTAGCGCCGTCTGCGGCCCTTGGGTCGGTCAAGCATGGGAGTGGGAGGTTGGGTCAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTAGGTTCAACTCTACTCGGCCACACTGCCAGCGGGGGCTGCAAGCAAGCGCCAGCAGGGCCCTTAGCTCAGTTGGGAGAGCGTAGCTTTGCAAGCTTGGGTCGTGGTTCGATCCCGACAGGCTCCAGGCTCAGCGGCAGGATGGTGGCGGGGCGCCGCAAGATACGAGGATGAAGTATCAGATCCGCTGCTGTAGTACGCTAGCAGCGTATGAGGTTAGCGGTAGCGGATGAGGTTAGCGGTAGCAGGATTTCAAATCGATGCGGTGAGGTTTCAGTTGACGTGAGCGAAGCATCAAGGCTCAAGGCTGAGGTAAGGGGCTTTGGTGGATGCTTGGCATGTACAGGCGATGAAGGAGTGGCAGCAGTGCAGATAAGCGTGGTGTGAGTGTGAGCAAACTTGACCCGACGATTTCCGAATGGGG

Supplement 2.4.1. Partial gene sequences of 16s RNA isolates isolated from *Oxytropis popoviana* nodules.

Opo-5 (*Phyllobacterium ifriqiyense*)

CATGCGATCGACCGCCCGCAAGGGAGTGGCAGACGGGTGAGTAACCGTGGGAACTACCGCAATTCCTGGAACAACACATGGAACGTTGTCTAATACCGAATGAGCCCTTCGGGGAAAGATTATCGGAATTGGATGAGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGCGACGATCCATAGTGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTCCTACGGGAGGCGCAGTGGGAAATTTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCTGAGTGATGAAGGTTCTTAGGATTGTAAGGCTCTTTCACCGGTGAAGATAATGACGGTACCGGAGAAGAAGCCCCGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCCGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGTTCGGAATTTACTGGGGTAAAGCGCACGATAGGCGGACTTTTAAAGTTCAGGGGTGAAATCCCGGGCTCAACCCCGGAACTTTGATACTGGAAGTCTTAGTTCGAGAGAGGTGAGTGAATTGCGAGTGTAGAGGTTGAAATTCGTAGATATTTCGAGGAACACAGTGGCGAAGCGGCTCACTGGCTGATACTGACGTCGAGTGGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATAGATAACCTGGTAGTCCAGCCGTAACCTATGAGAGTACGCTGGGCGATACTGTTCCGTGGCGCAGCAAGCATTAAGCTCTCCGCTGGGAGTAGCGGTGCAGAGATTAACCTCAAAGGAATTACGCGGGGGCCGCAAGCGGTTGGAGCATGTGGTTAAATTCGAAGCAACGGCAGAACTTACCGAAGCCCGCTTCCGCTGAGGATGGTTCCCTCAGTGGGCTGATCGGTGACAGGTTGCTGACTGGTGTGAGGTCGCTGAGGTTAGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTGCCTTAGTGGCATCACTAGTTGGGCACTTAAGGGGACTGCCGTTGATAAGCCGAGAGGAAGTGGGGTAGCAGTCAAGTCTCATGGCCTTACGGCTGGGCTACACAGTGTACAATGGTGTGACAGTGGGACGAGACCGGAGGTCAGACTAATCTCAAAAAGCCATCTCAGTTCCGATGTCACTCTCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAACTCGTGA

TCGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCGAAGGTGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGAGGCAACACCGTAGGGTCAGCG
ACTGGGGTGAAGTC

Opo-7 (*Neorhizobium galegae*)

CATGCAAGTCGAGCGCCCCGAAGGGGAGCGGAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCATCCCTACGGAACTCCGGGAACTCGGAGCTAATACCGTTACGCCCTTCGGG GAAA
GATTTATCGGGGATGGATGAGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC
AACTCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATATTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCTGAGTGTAGAGGCTTAGGATTGAAAGCTCTTCCACGGAGAAGATAATGACG
GTATCCGGAGAAAGAGCCCGGCTAATCTGTCGACGAGCCCGGTAATACGAAGGGGGTAGCCTGGTTCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGTAAGGCGGATATTTAAGTACGGGGTAA
ATCCAGAGCTCAACTCTGGAACCTGCTTGTACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGTAAAGTGGAAATTCGCGAGTGTAGAGGTAATAATCGTAGATATTCCGAGGAACACCGTAGGGGAAGCG
GCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATGTTAGCCGTCGGCAAGTTTACTTGTGCGTGGCGC
AGCTAACGCATTAACATTCCGCTGGGAGTACGCTCGCAAGATTAACCTCAAGGAATGACGGGGGCGCCGCAACAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTGCAAGCAACGCGCAGAACCTTAC
CAGCCCTTGACATGCCCGCTAGCTACAGAGATGTAGTGTCCCTCGGGACCGGGACACAGGTGCTGATGGCTGTCGTCAGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCTGCCCTTAGTTGCGCAGATTACGTTGGGCACTTAAGGGGACTGCCGGTATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGCTG
TACAATGGTGGTACAGTGGCGAGCAAGGAGCGATCCGAGCTAATCTCAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAACTCGGGATCA
GCAGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCGAAGGTAGTGCCTAACCGCAAGGAGGACGTAACACCGTAGGGTCAGCGACT
GGGGTGAAGTC

Opo-8 (*Rhizobium sp.*)

TTGTTACGACTTACCCAGTCGCTGACCTACCGTGGTTAGTGCCTCTTGGGTTAGCGCACTACCTCGGGTAAACCACTCCATGGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGT
ATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAACCTCATGCACTCGAGTTGACAGAGTCAATCCGAACTGAGATGGCTTTTGGAGATTAGCTCACACTCGCTGCTGCTGCCACTG
TCACCACATTGTAGCAGTGTGTAGCCAGCCGTAAGGGCCATGAGGACTTACGTCATCCCCACCTTCTCTCGGCTTACACCGGCACTCCCTTAGAGTGGCCAACTAAATGCTGGCACTA
AAGCGAGGGTTCGGCTGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGACAGCACTGTCTGCGCCACCGAGTGGACCCCATATCTACGGGTAACACAGGAT
GTCAAAGGCTGGTAAAGTTCTGCGGTTGCTTGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGCAATCTCTTGAAGTTTAACTCTGCGACCGTACTCCCCAGCGGAATGTTAAT
GCGTTAGCTGCGCCACCGAAGTATACTGCCCCGACGGCTAACATTATCGTTTACGGCGTGGACTACCA

Opo-70 (*Acetobacter sp.*)

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAGCGAACGCTGGCGCATGCTTAACACATGCAAGTCGACGAAAGGTTTCGGCCTTAGTGCGGACGAGGTTGAGTAACCGTAGGAATCTATCCATGGTGGGGGA
TAACTCTGGGAACTGGAGCTAATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAGGGCAAGTCGCTGTGGAGGAGCCTGCGTTGATTAGCTGTGTTGGTGGGGTATGGCTACCAAGGCGATGATCGAT
AGCTGGTGTGAGAGGATGATCAGCCACATGGGACTGAGACACGCGCCAGACTCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCCTGATCCAGCAATGCCGCTGTGTG
AAGAAGKTTTCGATGTAAGGCTTTCGCGGTTGCTTGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGCAATCTCTTGAAGTTTAACTCTGCGACCGTACTCCCCAGCGGAATGTTAAT
GACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTTTGTACAGTCAAGTGTGAATCCCGGGCTAACCTGGGAGTGCATTTGATAGCTGACAGTGTAGAGAGGGTTGTGGAATCCACAGT
TAGAGGTGA

Opo-73 (*Sphingomonas sp.*)

CATTGCAAGTCGAACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGGCGCACGGNGCGTAACCGNGGGAATCTGCCCTNNGGTTCCGAATAACAGTGTAGAATGACTGCTAATACCGGATGA TGTGTAAGACC
AAAGATTTATCGCCCAAGGATGAGCCCGCTAGGATTAGCTAGTTGGTGGTAAAGCTACCAAGGCGACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCTGAGTGTGAAGGCTTAGGGTTGTAAGGCTCTTTACCCGGGATGAT AATGAC
AGTACCGGGAGAATAAGCTCCGCTAATCTGTCGACGACGCGCGGTAATACGAGGGGAGTACGCTTATTCCGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGTAAGGCGGCTTGTAAAGTTAGAGGTGA
AAGCCCCGGGCTCAACTCCGGAATAGCCTTTAAGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGGAAGAACCCAGTGGCGAAGG
CGGCTACTGGACTGTTAGCAGTGTAGGTCGAAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACCGCTAAACGATGATAACTAGCTGTCCGGGCACTTGGTCTGGGTG
GCGCAGTAAACGCATTAAGTTATCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACCTCAAGGAATTGACGGGGCTGCACAAGCG

Opo-74 (*Sphingomonas sp.*)

GCCTAACACATGCAAGTCGAACGAAGGCTTCGGCCTTAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTTGGGTTCCGAATAACAGTGTAGAATTAAGTGTACTGCTAATACCGGATGATGCGC
AAGACCAAGATTTATCGCCGAGGATGAGCCCGCTAGGATTAGCTAGTTGGTGGTAAAGCTACCAAGGCGACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAG
ACACGGCCGAGACTCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCTGAGTGTGAAGGCTTAGGGTTGTAAGGCTCTTTACCCGGGATG
ATAATGACAGTACCGGGAGAATAAGCCCGGCTAATCCGTCGACGACGCGCGGTAATACGAGGGGGTAGCGTATTCCGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGTAAGGCGGCTTGTAAAGT
AGAGGTGAAAGCTTGGAGCTCAACTCCAGAAGTGCCTTGGAGACTCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGGAAGAACCCAGT
GCGAAGGCGGCTACTGGACTGTTAGCAGTGTAGGTCGAAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACCGCTAAACGATGATAACTAGCTGTCCGGGCACTTGGTCTGGGTG
TTAGGTGGCGCAGTAAACGCATTAAGTTATCCGCTGGGGTGTAT

Opo-156 (*Stenotrophomonas sp.*)

CTTGTTACGACTTACCCAGTCACTCGGCCACACCGTGGCAAGCGCCCTCCNAANGTTAAGCTACCTGCTTCTGGTGCACAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAA C
GTATTACCCGACGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTATGGAGTGCAGTGTGACAGTCCAACTCCGACTGAGATAGGGTTTCTGGGATTGGCTTACCGTCGCGGCTTGCAGCCC
TCTGTCCCTACCATTTGATAGTACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTACGCTATCCCACTTCTCTCGGTTTATCACCAGCGGTCTCCTTAGAGTTCACCACTACGTCGTG CA
ACTAAGGACAAGGGTTGCGCTGTTGCGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACGATCCAGCCATGCAAGCCTGTTGCGAGTTCGAGTTCGAGTTCGCAAGGCAACCCATCTCTGGAAGTTCTG
ACATGTCAGGGCCAGTAAAGGTTCTTCCGCTTGCATCGAATTAACCACTACACTCCCGCTTGTGCGGGCCCGTCAATCTTGAATTTAGTTCGAGTTCGAGCAGTACTCCCGGCGGCAACT
AACGGTTAGCTTCGATACTCGGTGCCAAATGACCCCAACATCCAGTTCGATGCTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTCTGCTCATGTAGTGTGG
TCCAGGTAGCTGCTTCCGATGATGTTCTCTGATC

Opo-157 (*Rhizobium lusitanum*)

TTGTTACGACTTACCCAGTCACTCGCTGACCTACCGTGGTTAGTGCCTCTTGGGTTAGCGCACTACCTCGGGTAAACCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGT
ATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAACCTCATGCACTCGAGTTGACAGAGTCAATCCGAACTGAGATGGCTTTTGGAGATTAGCTCACACTCGCTGCTCTGCCACT GT
CACCACCATTTGATGACGCTGTGTAGCCAGCCGTAAGGGCCATGAGGACTTACGCTATCCCCACTTCTCTCGGTTATCACCAGGAGTCCCTTAGAGTGGCCAACTAAATGCTGGCAACTAA
GGGCGAGGGTTGCGGCTGCTTGGCGGACTTAACCCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGCTCTGCGCCACCGAAGTGGACCCCATATCTACGGGTAACACAGGAT
GTCAAAGGCTGGTAAAGTTCTGCGGTTGCTTGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGCAATCTCTTGAAGTTTAACTCTGCGACCGTACTCCCCAGCGGAATGTTAATG
CGTTAGCTGCGCCACCGAAGTATACTGCCCCGACGGCTAACATTATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTCTGCTCATGTAGTGTGG

Opo-160 (*Phyllobacterium trifolii*)

ACATGCAAGTCGAACGCATCGCAAGATGAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCAATCTTCCGAACAACCTGAGGGAACCTCAGCTAATACCGGATGTGCCCTTCGGGGGAA
AGATTTATCGGAATTGGATGAGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCGCGTGTAGTGTGAAGGCTTTAGGATTGTAAGGCTCTTCCACCGTGAAGATAATGACG
GTAACCGGAGAAGAAGCCCGGCTAATCTGTCGACGAGCCCGGTAATACGAAGGGGGTAGCCTGGTTCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGTAAGGCGGACTATTAAGTACGGGGTAA
ATCCCGGGCTCAACCCCGAACTGCCTTTGATAGTGTAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCCAGTGGCGAAGCG
GGCTACTGGCTGATGACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCGTAAACTATGAGAGCTAGCCGTCGGGCACTACTGTTCCGTTGGC
GCAGCTAACGCATTAAGCTTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAACCACTCAAGGAATTTGACGGGGCCCCGCAACGCGTGGAGCATGTGTTTAACTCGAAGCAACGCGCAGAACCTT
ACCAGCCCTTGACATCCGATCGCGGTTACAGAGATGGTATCTTACAGTGGCTGGTGTGACAGGTGCTGATGGCTGCTGTCAGCTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG

AGCGCAACCTCGCCCTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCGGGTATAAGCCGAGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCTATGGCCCTACGGGCTGGGCTACACA
CGTGTACAATGTGTGTGACAGTGGGCAGCGAGCCGCGAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGAGTTCGACCTCGAACCTGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAAATCGTG
GATCAGAATGCCACGTTGAATACGTTCCCGGGCTGTACACACCCGCGCTCACACCATGGGAGTGGTTTTACCCGAAGGTGCTGTGTAACCGCAAGGAGGCGAGCAACACCGGTAGGGTCAG
CGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG

Opo-161 (*Rhizobium lusitanum*)

CTTGTTACGACTTACCCAGTCGCTGACCTACCGTGGTGTAGTGCCTCTTGCGGTATAGCGCACTACTCTCGGGTAAAACCACTCCCATGGTGTGACGGGGGGTGTGTACAAGCCCGGGAAC
TATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAATTCATGCACTCGAGTTCAGAGTGCAGAGTGCAGTCCGAACCTGAGATGGCTTTGGAGATTAGTCCACTCGCGTGTGCTGCCA
CTGTCACCACTTGTAGCAGTGTGTAGCCAGCCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGCAGTCTCCACCTCTCTCGGCTTATACCCGGCAGTCCCCTTAGAGTGGCCAACTAAATGCTGGCACT
AAGGGCGAGGGTTCGCTGTTGCGGGACTTAAACCAACTCTCACGACAGGAGTGCAGCAGCCATGCAGCACCTGTCTCGCCACCCGAAGTGACCCCATATCTCTACGGGTAACACAGG
ATGTCAAGGGCTGTAAAGTTCTGCGCGTTGCTTCAATTAACACCATGTCCACCGCTTGTGCGGGCCCGCTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCAGCCTACTCCCGAGGCGGAATGTTAA
TGCGTTAGTGCGCCACCGAACAGTATACTGCCGACGGCTAACATTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGATCTAATCTGTTTCTCCACCGCTTTCGACCTCAGCGTCAAGTAAATGG
AGTGAGCCGCTTCCGCACTGGTGTCTCCGAAATCTACGAATTTCACTCTCACTCGGAATTCACCTCACTCTCCATCTCCAGATCGACAGATCAAAAGGCAAGTTCAGGGTTGAGCCCTG
GGATTCACCCCTGACTGATCGATCCGCTACGTGCGCTTACGCCAGTAATCCGAACAACGCT

Opo-164 (*Burkholderia sp.*)

CCTTACACATGCAAGTCAAGCGGACGACCGGGGCAACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCTGTAGTGGGGATAGCCCGGCAAGCCGGATTAATACC
GCATACGATCTACGGAAGAAAGCGGGGATCGCAAGACTCGCCCTATAGGGGGCGCCGATGGCAGATTAGCTAGTGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAG
AGGACGACGACCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGGAAACCTGATCCAGCAATGCCGCTGTGTGAAGAAGCCCTCG
GGTTGTAAGGCACTTTTCCGGAAGAAAACCTTCTGCCCTAATACGGCGGGAGGATGACGGTACCAGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTAGTGCAGCAGCCGCGTAACTAGGGTGCGA
CGCTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAGCGTGCAGCGGTTGTTAAGACAGATGTGAATCCCCGGGCTAACCTGGGAAGTGCATTTGTAGTGGCGAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGG
TAGAATTCACGCTGTAGCAGTGAAGTGCAGATGTGGAGAAATACGATGGCGGAAGGCAAGCCCTGGGCAATCTGACGCTCATGCAAGG

Opo-166 (*Acinetobacter sp.*)

CATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGTAGCTTGTACTGGATTACGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATAACG
TCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTTGGCCCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCCGATTAGCTAGTGTAGGGTAAAGGCCCTACCAAGCGCAGATCTGTAGCGGGTGTGAGAGGATGAT
CCGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAACCTGATCCAGCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGCCCTTTGGTTGTA
AGCCTTAAAGCGAGGAGGACTACCTAGATTAATACTTTAGGATAGTGGACTTACTCGAGAATAAGCACCGG

Opo-169 (*Rhizobium sp.*)

CTTGTTACGACTTACCCAGTCGCTGACCTACCGTGGTGTAGTGCCTCTTGCGGTATAGCGCACTACTCTCGGGTAAAACCACTCCCATGGTGTGACGGGGGGTGTGTACAAGCCCGGGAAC
TATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAATTCATGCACTCGAGTTCAGAGTGCAGAGTGCAGTCCGAACCTGAGATGGCTTTGGAGATTAGTCCACTCGCGTGTGCTGCCA
CTGTCACCACTTGTAGCAGTGTGTAGCCAGCCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGCAGTCTCCACCTCTCTCGGCTTATACCCGGCAGTCCCCTTAGAGTGGCCAACTAAATGCTGGCACT
AAGGGCGAGGGTTCGCTGTTGCGGGACTTAAACCAACTCTCACGACAGGAGTGCAGCAGCCATGCAGCACCTGTCTCGCCACCCGAGTGGACCCCATATCTCTACGGGTAAACACAGGA
GTAAGGGCTGGTAAAGTTCTGCGCTTGTTCGAATTAACACCATGTCCACCGCTTGTGCGGGCCCGCTAATCTTTGAGTTTTAATCTTGCAGCCGCTACTCCCCAGCGGAATGTTAAT
GCGTTAGTGCGCCACCGAAGTACTGCCCCGACGGCTAACATTCATGCTTACGGCGTGGACTACCA

Opo-170 (*Bacillus sp.*)

CTCCGGATGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTTGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGAAACCCGAGCTAATACCGGATAGTCTTGAACCCGATGTTCAAGGATGAAA
GACGGTTTCGGGTGTCACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTGTGGTGGGTAATGGCTCAACAGGCGCAGATGCGTAGCCGACTGAGAGGGTGTATGGCCCACTGGGACTGAGA
CACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGAGCAACCGCCGCTGAGTGTGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGA
ACAAGTGCAGAGTAACTGCTCGACCTTACCGGTACCTAACCGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAACTAGTGGCAAGCGTGTCCGGAATATTGGCGTAAAGG
GCTCGAGGGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAGGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATGGAACTGGGAACTTGAAGTGCAGAAAGANGAGAGTGAATTCACCGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATGTGGAGAAACCAAGTGGCGAAGGCACTCTGCTGTAACTGACGTGANAGAGCAAGCGCTGGGGAGGCAACAGGATTAGTACCCTGGTGTAGTCCAGCCGTAACAGATGAG
TGTAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGTGACGTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGTGCAGAACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGC

Opo-224 (*Mesorhizobium sp.*)

GCCTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCGCAAGGGGAGCGGCAGCGGGTGAAGTAAACCGTGGGAATCTACCCATCTACGGAACAACCTCCGGAAACTGGAGCTAATACCGTATACGTCCTTT
GGAGAAAGATTTATCGGAGATGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTGTGGTGGGTAATGGCTCAACAGGCGCAGATCCATAGCTGGTGTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAAGTGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTCAACGGTGAAGAT
AATGACGGTAAACGTAAGAAAGCCCGCTAACTTCTGTCAGCAGCGCGGTAATACGAAGGGGGTACGCTTGTTCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCAGTAGCGGATACTAAGTCAAG
GGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAAGTGCCTTTGATACTGGGTATCTGAGTCCGGAAGAGTGTGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACAGTGG
CGAAGGGGCTCACTGCTGCTGACGCTGAGGTGCGAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGTAACTCCGCTGAGTCCAGCCGTAACAGATGGAAGTACCGCTGGTAAAGCTTTGCAAGTTTACTTTG
CGGTGGCGCAGTAAACGCTTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAAATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGTGCAGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACCGC
AGAA

Opo-223 (*Mesorhizobium sp.*)

GCCCGAGGGAGCGGACAGACGGGTGAGTAAACGCGTGGGAATCTACCCATCTCTACGGAACAACCTCCGGAAACTGGAGCTAATACCGTATACGTCCTTTGGAGAAAGATTTATCGGA
GATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTGTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGCAGATCCATAGCTGGTGTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGCGCAAGCCGATCCAGCCATGCGCGTGAAGTGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTCAACGGTGAAGATAATGACGGTAAACCGTAGAAGAA
GCCCGGCTAACTTCTGTCAGCAGCGCGGTAATACGAAGGGGGTACGCTTGTTCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCAGTAGCGGGATACTAAGTCAAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAAC
CCCCGAACTGCTTTGATACTGGGTATCTCGAGTCCGGAAGAAGTGGAGTGGAAATCCGAGTGGTAGAG

Opo-227 (*Mesorhizobium sp.*)

GCAGGGAGCGGACAGAACGGGTGAGTAAACGCGTGGGAATCTACCCATCTCTACGGAACAACCTCCGGAAACTGGAGCTAATACCGTATACGTCCTTTGGAGAAAGATTTATCGGAGATGGATG
AGCCCGCTTGGATTAGCTAGTGTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGCAGATCCATAGCTGGTGTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAAG
CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCGCAAGCCGATCCAGCCATGCCGCGTGAAGTGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTCAACCGTGAAGATAATGACGGTAAACCGTAGAAGAGCC
CGCTAACTTCTGCGCAGCGCGGTAATACGAAGGGGGTACGCTTGTTCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCAGTAGCGGGATACTAAGTCAAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCG
GAACTGCTTTGATACTGGGTATCTCGAGTCCGGAAGAAGTGGAGTGGAAATCCGAGTGGTAGAG

Opo-229 (*Mesorhizobium sp.*)

GCCTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCGCAAGGGGAGCGGCAGCGGGTGAAGTAAACCGTGGGAATCTACCCATCTCTACGGAACAACCTCCGGAAACTGGAGCTAATACCGTATACGTCCTTT
GGAGAAAGATTTATCGGAGATGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTGTGGTGGGTAATGGCTCAACAGGCGCAGATCCATAGCTGGTGTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAAG
ACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAAGTGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTCAACCGTGAAGATAATGACGGTAAACCGTAGAAGAGCC
CGCTAACTTCTGCGCAGCGCGGTAATACGAAGGGGGTACGCTTGTTCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCAGTAGCGGGATACTAAGTCAAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCG
GAACTGCTTTGATACTGGGTATCTCGAGTCCGGAAGAAGTGGAGTGGAAATCCGAGTGGTAGAG

GGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGAACTGCCTTTGATACTGGGTATCTCGAGTCCGGAAGAGGTGAGTGAATTCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCACTGG
CGAAGGCGCTCACTGTCCGGTACTAGCGCTGAGGTGCGAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGGTAAACGATGGAAGCTAGCCGTGGCAAGTTTACTTTGTC
GGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCTGCTGGGAGTACGGTGCAGGATTAACAAAGGAATGACGGGGGCGCACAAGCGTGGAGCATGTGGTTAATCGAAGCAACCGCGCA
GAACCTTACAGCGTTGACATCCCGGTTCGGGTTCCAGAGATGGATACCTTCAGTTCGGTGGAGCGTGCAGAGGTGCATGGCTGTCTGCTCAGCTGGTGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCC
CGAAGCAGCGCAACCCCTGCCTTGTCCAGCATTCAAGGGTACTTAAGGGGACTGCGCGTATAAGCGGAGGAAGGTGGGGTACGCTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGG
GCTACACAGCTGCTAATGTTGGTGCAGTGGGCGAGCAGCGAGGTGCAAGTATCTCCAAAAGCCTCACTGTTCCGAGTTCGCTCAACTGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAG
TAATCGCGATCAGCATGCGCGGTGAATACCTTCCCGGCTGTACACACCGCCGTACACCATGGAGTTGGTTTTACCGAAGGCGCTGTGTAAACCGAAGGAGGCGAGGCCAGCCGCT
AGGGTCAGCGACTGGGTGAAGTGC

Opo-234 (*Rhizobium lusitanum*)

GCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGAAGGGGAGCGCGACAGCGGTGAGTAACCGGTGGGAATCTACCTTTTTCTACGGAATAACGCAGGAACTTGTGTAATACCCTATGTGCTCTCG
GGAGAAAGATTTACGGGAAAGGATGAGCCCCTGTGGATTAGTCTGGTGGGTTAAAGCCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGAC
ACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCTGTACCGGATGCGCGTGAAGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGTCTTTCCACCGGAGAAGAT
AATGACGGTATCCGGAAGAAGCCCCGTAACTTCGTCACGAGCGCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCAGTAGGCGGATGCATCAGTCAG
GGGTGAAATCCCGGGCTCAACCTTGAAGTCTGTGATGTCGATGTCGAGTATGGAAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCGTGGC
GAAGGCGGCTACTGTTCAATTACAGCTGAGGTGCGAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGTTAGTCCACCGGTAACAGTGAATTAGTCCGCTGGGCGAGTACTGTTGCT
GTGGCGCAGCTAACCATTAACATTTCCCGTGGGAGTACGTCGCAAGTAAATACTCAAAGGAATTGACGGGGCGCACAAGCGGTGGAGCATG

Opo-227 (*Mesorhizobium sp.*)

GGGCGCCAGGGGAGCGGCAACCGGTGAGTAACCGGTGGGAATCTACCATCTCTACGGAACAACCTCCGGGAACTGGAGCTAATACCCTATACCTCTTTGGAGAAAGATTATCGGAGAT
GGATGAGCCCGGTTGGATTAGTCTGGTGGGTAATGGCTACCAAGCGCAGCAGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACACCGCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGAAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGGATCCGCGGTGAGTGAAGAGGCCCTAGGGTTGTAAGTCTTTCAACCGGTGAAGATAAGCGGTAACCGTGAAGA
AGCCCGGCTAACTTCGTCGACAGCAGCGCGGTAATACGAAGGGGGTACGCTTGTTCGGAATTACTGGCGTAAAGCGCAGTAGGCGGATCTAAGTCAGGGGTGAATCCCGGGCTCAA
CCCCGAACTCGCTTTGATACTGGTATCTCGAGTCCGGAAGAAGTGGAGTGAATTCGAGTGGTAGAGGTGA

Opo-230 (*Bosea vaviloviae*)

TGCAAGTCGAACGGGATCTTCGGAATACAGTGGCAGCGGTGAGTAACCGTGGGAACCTACCTTTCGGTTCGGAATAATTACGGGAACTTGGACTAATACCAGTACGCCCTTCGGGGAA
AGATTTATCGCGATAGATCGGCCGCTGTATTAGTCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGCGCAGCATCAGTACTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTTTGGGACTGAGACACCGCCC
AACTCTACGGAGGCGAGCTGGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCTGATCCAGCCTATCGCGTGAAGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGTCTTTTCGGGAAAGATAATGACT
GTACCGGAAAGATAAGCCCGGCTAACTTCGTCGACAGCGCGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTCTCGGAATCACTGGCGTAAAGGGCGTGAAGCGGACTTTAAGTCGGGGGTG
AAAGCCAGGGCTCAACCTTGAATTCGTTGATACTGAGAGTCTGAGTTCGGAAGAGGTTGGTGAAGTGCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACCAGTGGCGAAG
GCGGCAACTGGTCCGATACGCTGAGCGCAGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTGTAGTCCACGCGTAAACGATGAAATCCAGCCGTTGGGTCATGCACCTCAGTG
GCGCAGTAACTGTTAAAGCATTCCCGTGGGAGTACGCTGCGCAAGTAAATACTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCACAAGCGGTGGAGCATGTTGTTAATTGAAAGCAACGCGCAGAA
CTTACCAGTTTTGACATGTCGGGTTTGAAGAAACAGAGATGTAACCTTTCAAGTTCGGCTGGCGGAACAACAGTGTGCATGGTCTGCTCAGCTGCTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCTCGCCCTAGTTGCCATCATCAGTTGGAACTCTAGGGGACTCGCGTATAAGCGCGAGGAAGTGGGATGACGTCAGTCTCATGCGCCCTTACAGGCTGGGCTAC
ACAGCTGCTACAATGGCGTGAACATGGCGCAGAAAGGAGGATCCGCTGATTAATCCAAAAGCCGTCTCAAGTTCAGATTGCACTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAACTCGTAGTAACT
GTGGATCAGATGCGCAGGTAATACCTGTTCCGGGCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCGAAGGCGTCCGCTAACCGAAGGAGGCGAGGCCAGCCAGCTAGG
TTCAGCGACTGGG

Opo-238 (*Mesorhizobium sp.*)

ACGGAACAACTCCGGGAACTGGAGTAAATACCGTATACCTCTTTGGAGAAGATTATCGGAGATGGATGAGCCCGCTTGGATTAGTACTAGTTGGTGGGTAATGGCCCTACCAAGCGCAGCA TC
CATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACACCGCCAGACTCTACGGGAGGCGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATCCCGCTGAG
TGATGAGGCCCTAAGGTTGTAAGGCTTTCAAACCGTGAAGATAATACCCCTGATGAAAGCGCGTGAAGTTCCTCGGCCAGCAGCCTGCGTAATACGAAGGGGTAACCGTGAAGTTCG
GAATTACTGGGCGTAAAGCGCAGTAGGCGGATACTAAGTCAGGGGTGAATCCCGGGCTCAACCCCGAAGTCCCTTTGATACTGGTATCTCGAGTCCGGAAGAAGGTGAGTGAATTC
CGAGTGT

Opo-246 (*Mesorhizobium sp.*)

GACTTACCCACGTCGCTGAACCTACCGTGGGTCGCTCGCTCTTGGGTTAGCAGCAGCGCTTCGGGTAACCAACTCCCATGGTGTGACGGCGGTTGTACAAGGCCGGGAACCTATTCA C
CGGCGATGCTGATCCGGATTACTAGCGATTCACTCATCAGCTGAGTTGACAGATGCAATCCGAACTGAGATGGCTTTGGAGATTAGCTCAGCTCGCGTCTCGTCCCACTGTCAC CA
CATTTGTAGCAGTGTGTAGCCAGCCGTAAGGGCATGAGGACTGACGTCATCCCACTTCTCTCGGCTTATACCGGAGTCCCTTAGAGTGCCCACTGAATGCTGGCAACTAAGGGGCG
AGGTTGCGCTCTGTGCGGACTAAACCAACATCTCACGACAGAGTACGACAGCCATGACAGCTGATCACCCGGCTGACCCCGGTAAGGAGTACCTCTGTGGAACCGCGAGTAAAGTGA
CAAGGGGTGGTAAAGTTCTGCGGCTGCTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTGTCGCGGCGCCCGTCAATTCCTTGTAGTTAATCNTGCGACCCTACTCCAGGCGGGGAAAGTAAATG
CGTTAGCTGGCCACGCAAGTAAACTTGCCAACGGCTAGCTTNCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATTAATCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCACTCAGCTCAGTA

Opo-247 (*Rhizobium sp.*)

ACGGAATAACGCAGGGAACCTTGTGTAATACCCTATGTCCTTCGGGAGAAAGATTATCGGGAAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCCCTACCAAGGCGAGC
ATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTTTGGGACTGAGACACCGCCAACTCCTACGGGAGGCGCAAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCT
GAGTGTAGAAAGCCCTAGGGTTGTAAGTCTTTCCCGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAGCCCGGCTAACTTCGTGCGCAGCAGCCGGTAAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGT
TCGGAATTAGTGGCGTAAAGCGCAGTAGGCGGATGCATGACGAGGGTGAATCCCAAGGCTCAACCCCTGGAACCTGCTTTGATACTGTCGATCTGGAAGTGAAGAGGTGAGTGGAAAT
CCGAGTGTAGAGGTGAATTCGTAGATATTCGAGGAACACCAGTGGCAGGCGGCTACTGTTCCATACTGACGCTGAGTGCAGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCAGCCGTAACAGTGAATGTTAGCGTCGGGCGATATACTGTTGGTGGGCGAGTAACGATTAACACTTCCGCTGGGGAGTAGCGTGCAGATTAACAACTCAAAGGAAATTGACGGGG
CCCGCACAAGCGTGGAGCATGTTGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACTTACGAGCCCTTGACACCCTTGATACCCGTAGAGATATGGGGTCACTTCGGTGGCGAGGACAGGTGCTGC
ATGGCTGCTGTCAGTCTGTGAGATGTTGGTAAAGTCCGCAACGAGCGCAACCTCGCCCTAGTTGGCCAGATTAGTTGGGACTTAAGGGGACTGCCGTTGATAAGCGGAGGAGGA
AGTTGGGATGACCTAAGTCTTACGGCTTCCGCGTCCAGCAGTGTGCTACAATGTTGGTGGAGCAGTGGGAGCAGAGTGCATGGCTGTGAGTGAAGTAACTTCCAAAAGCCATCTGTTGG
ATTGACTGCAACTCGAGTGCATGAAGTGGAACTCGTAGTAACTCGCGGATCAGCATGCGCGTGAATACGTTCCCGGGCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCC
GAAG

Opo-248 (*Mesorhizobium sp.*)

GCTTACATGCAAGTCGAGCGCCCCGAAGGGGAGCGGCGACAGCGGTGAGTAACCGTGGGAATCTACCATCTCTACGGAACAACCTCCGGGAACTGGAGCTAATACCCTATACCTCTTTGG
AGAAAGATTTACGGAGATGGATGAGCCCGCTTTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACAC
GGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCTGTACCGGATGCGCGTGAAGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGTCTTTCAACCGTGAAGATA
ATGACGTTAAGGTGAATTCGTAGATATTCGAGGAACACCAGTGGCAGGCGGCTACTGGTCCATACTGACGCTGAGTGCAGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
AGGGGTGAAATCCCGGGCTCAACCCCGAACTGCCTTTGATACTGGTATCTCGAGTCCGGAAGAAGGTGGAGTGAATTCGAGTGGTAAAGGTGAAATTCGTAGATATTCGAAGGAACCC
AGTGGGCGAAGGCGGCTCACTGTTCCGCTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGGAAACAGGATTAGATACCTGTTAGTCCAGCCGTAAACGATGGAAGCTAGCCGTTGGCAAGTTT
ACTTGTGCGTGGCGAGCTAACGATTAAGCTTCCCGCTGGGAGTACGCTGCGAAGTAAATACTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCACAAGCGGTGGAGCATGTTGTTAATTCGAAGCAA
CGCGCAACCTTACAGCCCTTCCGCGTTCGCGGTTTCCAGAGATGATACCTTCAGTTCGCTGGTGCAGCGTGGGAGCAGAGTGCATGGTGTGAGTGAAGTAACTTCCAAAAGCCATCTGTTGG
AAGTCCGCAACGAGCGCAACCCCTGCCTTGTTCAGCAGATTAGTGGGCGACTTAAGGGGACTGCGCGTATAAGCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAGTCTCATGGCCCTTACGG

GCTGGGCTACACAGTCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCGAGCAGCCGCGAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATC
GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGTCTAACCGCAAGGAGGCGAGCGACC
ACGGTAGGGTCAGCGACTGGGGTGAAGT

Opo-251 (*Mesorhizobium sp.*)

GGAGCGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCATCTACGGAACAACCTCCGGAAACTGGAGCTAATACCGTATACGTCCTTCGGGAGAAAGATTATCGGAGATGGATGAGCCCG
CGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGCCAACTCTACGGGAGGCGAGCAGTGG
GGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTAGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTTCAACCGTGNAGATAATGACGGTAAACCGTAGAAG AAGCCCGGCTA
ACTTCGTCGACGACGCCGCGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATTAAGTGGGCTGTAAGGCGACAGTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCTCGCCCTTAGTTGCCA
CCTTTAATACTGGCAATCTCGAGTCCGAGAGAGGTGAGTGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGTACTGA CGTGT
AGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGCTAGTCCATGCCGTAACCTATGAGAGCTAGCCGTGCGCAAGTTTACTTGTGCGTGGCGAGCTAACGCATTAAGCTCCTCCGCT
GGGGAGTACGGTCCGAAGTAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTTGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGTCCGCG
TTTCCAGAGATGGTAACCTTCAAGTTCGAGTGGACCGGTGACAGGTGCTGATGCCGCTGCTCAGCTGCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCTCGCCCTTAGTTGCCA
GCATTAAGTTGGGCACTAAGGGGACTGCCGTTAAGCCGAGAGGAGGTGGGATGACGTCAAGTCTCATGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTACAATGGTGGTACAGTGG
GCAGCGAGACCGGAGGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTT
CCCGGGCCTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCGAGCGACCCAGGTTAGTTCAGCGACTGG

Opo-252 (*Mesorhizobium sp.*)

AGCGCCTCGAAGAGGAGCGGAGCGGAGTAAACGCGTGGGAATCTACCCATCTACGGAACAACCTCCGGAAACTGGAGCTAATACCGTATACGTCCTTCGGGAGAAAGATTATCGGA
GATGGATGAGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGCCAACTCTACG
GGAGGCGAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTAGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTTCAACCGTG RAGATAATGACGGTAAACCGTAGA
AGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATTAAGTGGGCTAAAAGCGCAGTGGCGGATTGTTAAGTTAGGGGTGAAATCCCGGGCT
CAACCCCGAACTGCCTTAATACTGGCAATCTCGAGTCCGAGAGAGGTGAGTGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCT
CGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGCTAGTCCATGCCGTAACCTATGAGAGCTAGCCGTGCGCAAGTTTACTTGTGCGTGGCGAGCTAACGCAT
TAAGCTCCTCCGCTGGGAGTCCGAAGATTAATACTCAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTTGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTAC
ATCCCGTCCGCTTCCAGAGATGGTAACCTTCAAGTTCGCTGGACCGGTGACAGGTGCTGATGGTGTGCTGAGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCG
CCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTAAGGGGACTGCCGTTAAGCCGAGAGGAGGTGGGATGACGTCAAGTCTCATGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTACAATGG
TGGTACAGTGGGCGAGACCGGAGGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCC
CGGTGAATACGTTCCCGGGCTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCGAGCGACCCAGGTTAGTTCAGCGACT

Opo-254 (*Mesorhizobium sp.*)

TCGAGCGCTCGCAGAGGAGCGGAGCGGAGTAAACGCGTGGGAATCTACCCATCTACGGAACAACCTCCGGAAACTGGAGCTAATACCGTATACGTCCTTCGGGAGAAAGATTATCGG
GATGGATGAGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGCCAACTCTACG
GGAGGCGAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTAGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTTCAACCGTGNAGATAATGACGGTAAACCGTAGA
AGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATTAAGTGGGCTAAAAGCGCAGTGGCGGATTGTTAAGTTAGGGGTGAAATCCCGGGCT
CAACCCCGAACTGCCTTAATACTGGCAATCTCGAGTCCGAGAGAGGTGAGTGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCT
CGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGCTAGTCCATGCCGTAACCTATGAGAGCTAGCCGTGCGCAAGTTTACTTGTGCGTGGCGAGCTAACGCAT
TAAGCTCCTCCGCTGGGAGTCCGAAGATTAATACTCAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTTGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTAC
ATCCCGTCCGCTTCCAGAGATGGTAACCTTCAAGTTCGCTGGACCGGTGACAGGTGCTGATGGTGTGCTGAGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCG
CCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTAAGGGGACTGCCGTTAAGCCGAGAGGAGGTGGGATGACGTCAAGTCTCATGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTACAATGG
TGGTACAGTGGGCGAGACCGGAGGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCC
CGGTGAATACGTTCCCGGGCTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCGAGCGACCCAGGTTAGTTCAGCGACT

Opo-325 (*Mesorhizobium sp.*)

GCCAGCCCGCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTCGGAATTAAGTGGGCTAAAAGCGASGTAGCGGATTGTTAAGTTAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCGGAAGTGCCTTTAATA
CTGGCAATCTCGAGTCCGAGAGAGGTGAGTGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGAGATATTCCGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGGACTGACGCTGAGGTGCGA
AAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCANGCCGTAACCTATGAGAGCTAGCCGTGCGCAAGTTTACTTGTGCGTGGCGAGCTAACGCATTAAGCTCTCCGCTGGGAGTA
CGGTGCAAGATTAATACTCAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTTGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGTCCGCGTTTCCAGAG
ATGGTAACTTCAGTTCCGCTGGACCGGTGACAGGTGCTGATGGCTGTGCTGAGCTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTACCTAGTTGCCAGCATTAAAGT
TGGGCACTAAGGGGACTGCCGTTAAGCCGAGAGGAGGTGGGATGACGTCAAGTCTCATGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTACAATGGTGGTACAGTGGGCGAGCGAG
ACCGCGAGGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTAATACGTTCCCGGGC
TTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCGAGCGACCCAGGTTAGGTTAGGCTGAGGCTGGGTTAAGTTCGTAACA

Opo-326 (*Mesorhizobium sp.*)

CATGCAAGTGCAGCGCTCGCAGAGGAGCGGACGAGCGGTTGAGTAAACGCGTGGGAATCTACCCATCTACGGAACAACCTCCGGAAACTGGAGCTAATACCGTATACGTCCTTCGGGAGAAAG
ATTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGCCAACT
ACTCCTACGGAGGCGAGCAGTGGGAAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTAGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTTCAACCGTG RAGATAATGACGGT
AACCTGAGAAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATTAAGTGGGCTAAAAGCGCAGTGGCGGATTGTTAAGTTAGGGGTGAAAT
CCCGGGGCTCAACCCCGAACTGCCTTAATACTGGCAATCTCGAGTCCGAGAGAGGTGAGTGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGG
CTACTGGCTCGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAACCTATGAGAGCTAGCCGTGCGCAAGTTTACTTGTGCGTGGCGCA
GCTAACGCTTAAGCTCCTCCGCTGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAATACTCAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTTGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACC
AGCCCTTGACATCCCGTCCGCTTCCAGAGATGGTAACCTTCAAGTTCGCTGGACCGGTGACAGGTGCTGATGGTGTGCTGAGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG C
GCAACCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTTCAAGGGGACTGCCGTTAAGCCGAGAGGAAAGTTGGGATGACGTCAAGTCTCATGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGT
GCTACAATGGTGGTACAGTGGGCGAGACCGGAGGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCGGAT
CAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCGAGCGACCCAGGTTAGTTCAGCGACT

Opo-327 (*Bacillus sp.*)

AGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGACTGAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTTGAGCATGTGNTTAAATTCGAAGCAACCGGAAGA
ACCTTACCAGGCTTACAGCTCTGACACTAGAGATAGAGCGTCCCTTCGGGGACAGAGTACAGGTGGTGCATGGTTGCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCTTATCTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCAAGGTGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAAGTTGGGATGACGTCAAACTCATGCCCCCTTACGCTGGGCTACA C
ACGTGCTACAATGGATGGTACAAGGGGCTGCAAGACCGGAGGTCAAGCCAACTCCATAAAACCTTCTCAGTTCCGATTGAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTGGAAATCGCTAGTAATCGC
GGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCCGCCGTACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCGAGCGACCCAGGTTAGTTCAGCGACT

Opo-340 (*Sphingomonas sp.*)

CCCACCGTGGTCCGGCCCTCTCTGCGAGTTAGCGCAACGCTTCGGGTGAATCCAACCTCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTAAGGCGTGGGAACGTAATCACCGCGGATGCTGATCCG C
GATTACTAGCGATTCCGCTTCTGCACTCGAGTTGACAGAGTGAATCCGAAGTACGAGACTTTGGAGATTAGCTCACCTCGCGAGATTGCTGCCACTGATGCTCCATTGTAGCAGTGT GT

AGCCACGCGCTAAGGGCCATGAGGACTGACGTCATCCACCTTCTCCGGCTTACACCGCGGTTCTTTAGAGTACCAACTGAATGATGGTAACTAAAGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCG
GGACTAACCACATCTCAGCAGCAGAGCTGACGACAGCCATGACAGCCTGTGTCCAGTCCCGAAGGGAAGATCCATCTCGAAATCGTCCGGACATGTCAAACGCTGGTAAGGTTCCG
GCGCGTTGCTCGAATTAACCCACATGCTCCACCGCTGTGCGAGGCCCGCTCAATTCATTTAGTTTTAACCTTGCGCCGCTACTCCACAGGCGGATAACTAATGCGTTAGTGCGCCACCAAG
ACTAAGTCCCGGACAGCTAGTTATCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGACCTCAGCGTCATA

Supplement 2.4.2. Sequences of the partial ITS region of isolates isolated from *Oxytropis popoviana* nodules.

Оро-69 частичный итс регион (*Microbacterium sp.*)

TTTGGGGCTGGATCCCTCTTTCTAAGGAGCATCTGGCGCTTCCGGGGTGTCCAGGCGCGTGTGCGAGCAATGTCCTGTCGGTGTCTATGGTGGAACTTTGACGAGGTGCGAGG
ATGGGGTCTCACTTAGTACGCTGTGTCAGTTGGAACGGTGGGGTGTTCGGTCTTGCACGTGACGCTGTGGGTCTGAGGACCGGGGACGAGGATTTGTTTCCGTTCTTCTGGGCT
CATCTCCGTTTGTGCTGTGCTGGTGGTGGGGTGGTACCGCCCTACTTTGAGAATACACAGTGGACGCGAGCATCTTTGAACCGACCTCCGGTGGTTCGAAAGATGATCTTAA
GATCATTAGTCAATTTGACGACATGCCCTTCCGGGGTGTGTTTTGATTCGATTCGATTTTGAATCATGTTTCAAGCTTTAAGAGCAACGGTGGATGCTTGGCATCTGGAGCCGAAGAAGGA
TAGCAATCTGCGATAAGCTCGGGAACTGATAAGCAAGTTTTGATCGAGGGTGTCCGAATGGGAAACCCGGA

Оро-72 частичный итс регион (*Sphingobacterium sp.*)

CCCTCTTTTCTAGAGGACGGGTGATCGGGCTGTTACGCCATGAAGATTTCTAATGAAAGAAAAGAAAAAAGAAAGATAGTACCCGCACACCTACAGGGGGTACCGGAGCAGAAAGAGA
GAGAGTGCAGTCCCGTAGCTGAGTTGTTAGAGCACTACTGATAATGTAGGGTCAGCATCAAACTCTGCTCGGACTCCGTAAGGGGGTATAGCTCAGCTCAGCTGAGACCTGCCT
GCACGAGGGGTTCAACGGTTTCAATCCGTTTATCTCCAGCTCATCCCTGGATGGAACCCGAAAGCCTGAAAGCAAAGGGGATTTATATGATGATAAAAAAGTTCTTTGACATATTGAAAGAAA
AAAAACAAAGAGAAGACAACAGTAGAGACGTTTTCTTCTACGGGGAAAGGACAATATACAAAAAGCATCCCTGTACAGCAAAAGGGTACAGGGAGAAAGTAAAGAAAGGCACACGGGG
ATGCTAGGCTCTCAGAGGCGAAGAAGGACGTGATAAGTGCAGATAAGCACCAGGGATCTGCAATGAGACTCGATCCGGTATTCCGAATGGGAAACCCGGA

Supplement 2.5. Partial gene sequences of 16s RNA isolates isolated from *Astragalus chorinensis* nodules.

Ach-280 (*Mesorhizobium sp.*)

CATGCAAGTCGAGCGCTCGCAGAGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACCGTGGGAATCTACCCATCTACGGAACAACCTCCGGAAACTGGAGCTAATACCGTATACGTCCTTCCGGGAGAAAG
TTTATCGGAGATGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACAGGCCCAA
ACTCCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTCAACGGTG RAGATAATGACGGT
AACCGTAGAAGAACCCCGCTCAACTCGTCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGTACGCTTGTTCGAAATTAAGTGGCGTAAAGCGCAGTAGGGGATTGTTAAGTTAGGGGTGAAAT
CCCGGGCTCAACCCGGAACCTTAACTAGTGGCAATCTCAGTCCGAGAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGTGAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGG
CTACTGGCTCGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTGTGCTTCCGTAACCTATGAGAGCTAGCCGTCGGCAAGTTTACTTGTGCTGGCGCA
GCTAACGCATTAAGCTCTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAGATTAATAACTCAAAGGAATTTAGCGGGGGCCCGCAACGCGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGCGAGAACCTTACC
AGCCCTTGACATCCCGTCCGGTTCAGAGATGGTAACCTCAGTTCGGTGGACCGGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGACGCTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCTCCGCTTAGTTGACGACATTAAGTTGGGCACTTAAGGGACTGCGCGTATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCTCATGGCCCTACGGGCTGGGCTACACAGT
GCTACAATGGTGGTACAGTGGGCGAGACCGGAGTGCAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCGGAT
CAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGCTGTGTAACCCGAAGGAGGCGAGCCGACCGGTAGGTACGCGAG
TGGTGAAGT

Ach-301 (*Rhizobium lusitanum*)

TCGAGGCGCCGCAAGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACCGTGGGAATCTACCTTTTCTACGGAATAACCGAGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTGCTTCCGGGAGAAAGATTTATCG
GGAAAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACAGGCCAAACTCTTA
CGGGAGGACAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTCCAGCGAGAAAGATAATGACGGTATCCGGA
GAAGAAGCCCGGCTCAACTCGTCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGTACGCTTGTTCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCACGTAAGCGGATCGATCAGTACGGGTGAAATCCAGGG
CTAACCCCTGAACTGCTTTGATACTGTGATCTGAGATGATGGAAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGCTCACTGG
TCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGTAGTCCAGCCGTAACGATGAATGTTAGCCGTGGGCGAGTACTGTTGCTGGCGAGCTAACGC
ATTAACATTTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAGATTAATAACTCAAAGGAATTTAGCGGGGGCCCGCAACGCGTGGAGCATGTGGTTTAAACGAAGCAACCGCGAGAACCTAACCGCCCT
GACATC

Ach-307 (*Bosea vaviloviae*)

TGCAAGTCGAACGGGATCTTCGGATACTAGTGGCAGACGGGTGAGTAACCGTGGGAACCTACCTTTCCGGTTCGGAATAATTCAGGAAACTTGGACTAATACCGGATACGCCCTTCCGGGGAA
AGATTTATCGCGATAGATCGGCCCGCTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACAGGCCAAACTCTTA
AACTCCTACGGAGGACAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTTTCCGGGAAAGATAATGACT
GTACCCGGAAGAAATAAGCCCGGCTCAACTTCGTCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGTACGCTTGTTCGGAATTAAGTGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGACTCTTAAGTCCGGGGGTG
AAAGCCAGGGCTCAACCTTGAATTCGCTTCTGATACTGAGAGTCTTGAAGTTCGGAAGAGGTTGGTGGAACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAAGAACACCAGTGGCGAAG
GCGGCCAACTGGTCCGATACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTGTGCTCCAGCCGTAACCGATGAATGCCAGCCGTTGGGGTGCATGCACCTCAGTG
GCGCAGCTAACGCTTTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAGATTAATAACTCAAAGGAATTTAGCGGGGGCCCGCAACGCGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGCGAAGAAC
CTTACCAGCTTTTACATGTCGGTTTGGAGAACAGAGATGTAACCTTTCAGTTCGGCTGGCCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGACGCTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCTCGCCCTAGTTGCCATCATTGATTTGGAACTCTAGGGGGACTGCCGTTGATAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCTCATGGCCCTTACAGGCTGGGCTAC
ACAGTGTCAATGGCGGTGACAATGGCGAGCAGCAAGGAGCATCCGGTGTCTAATCCAAAAGCCGCTCAGTTTCAGATTCGCAACTCGAAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATC
GTGGATCAGCATGCCAGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGCGTGCAGTAAACCGCAAGGAGGCGAGCCGACCGGTAGGTAGG
TTCAGGACTGGGTGAAGT

Ach-309 (*Mesorhizobium sp.*)

CCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGCTACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTCGGTA
GTCCACGCCGTAACGATGGAAGCTAGCCGTTGGCAAGTTTACTTGTGCTGGCGCAGCTAACGCATTAAGCTTCCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGAGATTAATAACTCAAAGGAATTTAGCGGG
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTGACATCCCGTTCGCGGTTTCCAGAGATGGATACCTCAGTTGCGCTGGACCGGTGACAGG
TGCTGCATGGCTGTGTCAGCTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTAAGGGGACTGCCGGTGTAAAGCCGA
GAGGAAGGTGGGATGACGTCGAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACAGTGTGTTGAGTGGGCGAGACCGGAGTGCAGCTAATCCAAAAGCCATCTCA

GTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTTGGTT
TACCCGAAGGCGCTGTGCTACCGCAAGGAGGACGGCGACCCACGGTAGGTTACGCG

Ach-314 (*Mesorhizobium sp.*)

ACGTTCTTCGGGAGAAGATTATCGGAGATGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGG
GACTGAGACACGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAAGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTCAAC
GGTGAAGATAATGACGGTAACCGTAGAAGAAGCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGTAGCGTTGTTCCGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATA
TTAAGTCAGGGGTGAAAATCCCGGGCTCAACCCGGAACCTGCCTTGTACTGGGTATCTCGAGTCCGGAAGANGTGAAGTGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCCTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGTAGTCCACGCCGTAACGATGGAAGTAGCCGTTGGCAAG
TTTACTTGTCCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGCTTCCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAA
GCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGGTCCGGTTCCAGAGATGGATACCTTCAGTTCCGGTGGACCGGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAAGGGGACTGCGGGTATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTT
ACGGGCTGGGCTACACACGTGTACAATGGTGGTACAGTGGGACGAGACCGCAGGTCGAGCTAATCTCAAAGCCATCTCAGTTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGG
AATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTTGGTTTACCCGAAGGCGCTGTGCTACCGCAAGGAGGCAGGCGA
CCCACGGTAGGTTACGCG

Ach-315 (*Mesorhizobium sp.*)

CAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCCTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCTATGAGAGTACCGCTCGGCAAGTTT
ACTTGTCCGGTGGCGAGCTAACGCATTAAGCTCTCCGCTGGGGAGTACGGTCCGCAAGATTAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAA
CGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGGTCCGGTTCCAGAGATGGTAACCTTCAGTTCCGGTGGACCGGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTTAAGGGGACTGCGGGTATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGG
GCTGGGCTACACACGTGTACAATGGTGGTACAGTGGGACGAGACCGCAGGTCGAGCTAATCTCAAAGCCATCTCAGTTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATC
GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTTGGTTTACCCGAAGGCGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCAGGCGACC
ACGGTAGGTCAGCGACTGGGGTGAAGT

Ach-330 (*Mesorhizobium sp.*)

CCGTGGGTGCGCTGCCTCCTTCCGGTAGCACAGCCCTTCGGGTAACCAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTAATCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTA
GGGATTCCAACCTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGAATCCGAACTGAGATGGCTTTTGGAGATTAGCTCGACCTCGCGTCTCGCTGCCACTGTACCACCATTGTAGCACGTGTAGCCAGC
CCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCTCGGCTTATCACGGGACGTCCCTTAGAGTCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA
ACCCAACATCTCACGACAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTACCGGTCAGCCGAACTGAAGGTATCCATCTCTGAAACCCGACCCGGATGTCAAGGGCTGGTAAGGTTCTGCGCG
TTGCTTCAATTAACCATGCTCCACCCTGTGCGGGCCCGCTCAATCTTTGAGTTTAACTTTCGACCGTACTCCCGAGGGGAAGCTAATGCGTTAGCTGCGCCACCACAAGTAAAC
TTGCCAACGGTAGTCTCCATCGTT