

doi 10.18699/vjgb-26-47

Производственный штамм клубеньковых бактерий сои RZ300 *Bradyrhizobium japonicum*, устойчивый к высуханию на поверхности семян: культуральные свойства и специфические особенности генома

Ю.В. Косульников , А.А. Крюков , К.Н. Бердышева , А.И. Ковальчук , А.П. Юрков , Ю.В. Лактионов  

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

 laktionov@arriam.ru

Аннотация. Предпосевная обработка семян возделываемых бобовых культур препаратами клубеньковых бактерий является стандартной агрономической практикой, активно используемой при выращивании сои, эффективные микросимбионты которой часто отсутствуют в почве. В то же время, как показали многие исследования, эффект от применения биопрепарата во многом зависит от выживаемости ризобийных клеток на семенах при высухании. В настоящей работе проведен анализ жизнеспособности у трех производственных штаммов *Bradyrhizobium japonicum*, 643Б, 640 и RZ300, на семенах сои *Glycine max* L. разного происхождения (сорта ЭН Аргента, Бара и Пруденс) в опытах, различающихся по разным параметрам: концентрации инокулянта (10 и 100 %), температурам высушивания (5, 15, 25 °С) и составам защитных полимерно-углеводных композиций. В результате экспериментов обнаружено, что сорт сои не оказывал заметного влияния на жизнеспособность изучаемых штаммов ризобий, в то время как штаммы существенно различались по этому признаку. Наибольшую устойчивость к высуханию на семенах сои показал штамм RZ300. Сравнительный анализ генома этого штамма с геномом слабо устойчивого к высуханию штамма *B. japonicum* 634Б позволил выявить наличие у штамма RZ300 гена *orgC* (кодирует белок OrgC, участвующий в биосинтезе осморегулируемых периплазматических гликоканов (OPGs)), который отсутствует у штамма 634Б и, возможно, может определять повышенную устойчивость клубеньковых бактерий к высуханию на семенах. При изучении эффекта различных защитных композиций было отмечено, что лучшими защитными свойствами обладают составы на основе 50 % раствора сахарозы, а наибольшая устойчивость ризобий к высуханию проявляется при температуре +5 °С. Полученные в этой работе результаты могут быть использованы как в селекции эффективных штаммов-инокулянтов, так и в технологическом сопровождении при создании биопрепаратов. Данные, полученные при изучении геномов штаммов, представляют интерес как для разработки систем генетического скрининга при поиске перспективных штаммов, так и для изучения возможности введения генетических конструкций с геном *orgC* в перспективные штаммы ризобий для улучшения их технологичности, т.е. обеспечения возможности эффективной заблаговременной инокуляции семян.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии; соя *Glycine max* L.; *Bradyrhizobium japonicum*; микробные биопрепараты; осмотический стресс; полногеномное секвенирование; гены устойчивости к осмотическому стрессу

Для цитирования: Косульников Ю.В., Крюков А.А., Бердышева К.Н., Ковальчук А.И., Юрков А.П., Лактионов Ю.В. Производственный штамм клубеньковых бактерий сои RZ300 *Bradyrhizobium japonicum*, устойчивый к высуханию на поверхности семян: культуральные свойства и специфические особенности генома. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(3):435-443. doi 10.18699/vjgb-26-47


Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 25-26-00242.

Благодарности. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ВНИИСХМ.

A production strain of soybean nodule bacteria RZ300 *Bradyrhizobium japonicum* resistant to drying on the seed surface: cultural properties and genomic features

Yu.V. Kosulnikov , A.A. Kryukov , K.N. Berdysheva , A.I. Kovalchuk , A.P. Yurkov , Yu.V. Laktionov  

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia

 laktionov@arriam.ru

Abstract. Pre-sowing treatment of cultivated legume seeds with nodule bacteria preparations is a standard agronomic practice. This is particularly important in soybean cultivation, as effective microsymbionts of soybeans are often absent from the soil. However, as many studies have shown, the efficacy of biopreparations depends largely on

the survival of rhizobial cells on seeds during drying. In this study, we analyzed the viability of three production strains of *Bradyrhizobium japonicum* Kirchner (634b, 640 and RZ300) on soybean (*Glycine max* L.) seeds of various origins (varieties: EN Argenta, Bara and Prudence). The experiments evaluated several parameters: inoculant concentrations (10 and 100 %), drying temperatures (5, 15, and 25 °C), and protective polymer-carbohydrate formulations. The experiments revealed that the soybean variety had no noticeable effect on the viability of the studied rhizobial strains, while the strains themselves differed significantly in this regard. The RZ300 strain demonstrated the highest resistance to drying on soybean seeds. A comparative genomic analysis of this strain and the less resistant *B. japonicum* strain 634b revealed the presence of the *opgC* gene in the RZ300 strain (encodes the OpgC protein involved in the biosynthesis of osmoregulated periplasmic glucans (OPGs)). This gene is absent in strain 634b and may potentially determine the increased resistance of nodule bacteria to drying on seeds. An evaluation of various protective formulations demonstrated that formulations based on 50 % sucrose provide the best protection, with rhizobia showing the highest resistance to drying at +5 °C. The results obtained in this study can be used both in the selection of effective inoculant strains and for providing technological support in the development of biological products. The genomic data support the development of genetic screening systems to identify promising strains and the potential introduction of the *opgC* gene into promising rhizobial strains to improve their manufacturability, i.e. to enable effective early seed inoculation.

Key words: nodule bacteria; soy *Glycine max* L.; *Bradyrhizobium japonicum*; microbial biologics; osmotic stress; genome-wide sequencing; osmotic stress resistance genes

For citation: Kosulnikov Yu.V., Kryukov A.A., Berdysheva K.N., Kovalchuk A.I., Yurkov A.P., Laktionov Yu.V. A production strain of soybean nodule bacteria RZ300 *Bradyrhizobium japonicum* resistant to drying on the seed surface: cultural properties and genomic features. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(3):435-443. doi 10.18699/vjgb-26-47

Введение

Важная агробиологическая особенность сои заключается в способности к формированию азотфиксирующего бобово-ризобиального симбиоза с клубеньковыми бактериями (Вавилов, Посыпанов, 1983; Regar et al., 2017). При этом эффективный симбиоз образуется только при наличии в почве активных вирулентных бактерий-симбионтов сои в достаточном количестве, что редко встречается в полевых условиях и, таким образом, снижает урожайность бобовой культуры (Lamprey et al., 2014). Соответственно, для наиболее полной реализации потенциала бобово-ризобиального симбиоза необходимо искусственное внесение симбиотически эффективных штаммов клубеньковых бактерий в ризосферу бобовой агрокультуры, что в сельскохозяйственной практике осуществляется посредством предпосевной инокуляции семян сои биопрепаратами, созданными на основе клубеньковых бактерий-инокулянтов (Bashan et al., 2014). В отечественном сельском хозяйстве активно применяется биопрепарат на основе штамма *Bradyrhizobium japonicum* 634b под торговой маркой Ризоторфин, обеспечивающий высокие прибавки урожайности на различных сортах сои (Васильчиков, Гурьев, 2018; Volobueva et al., 2023). Во многих работах по изучению эффективности новых штаммов он выступает в качестве референсного штамма, в частности при оценке эффективности штамма 640 (Магомедов и др., 2011).

При анализе эффективности ризобиальных штаммов инокуляцию семян осуществляют в день посева, так как известно, что клубеньковые бактерии чувствительны к высушиванию. Однако в сельскохозяйственной практике по технологическим и экономическим причинам предпосевную обработку семян проводят заблаговременно, что может приводить к гибели нанесенных ризобий еще до момента заделки семени. Обзор этой проблемы осуществлен J. Vriezen с коллегами (2007). Еще в 1932 г. E.B. Fred с коллегами сообщили о снижении численности жизне-

способных клеток клубеньковых бактерий на семенах и предположили, что состав питательной среды, pH и температура являются факторами, определяющими устойчивость клеток к высушиванию.

Позже J.M. Vincent с коллегами (1961) изучали культуру *Rhizobium trifolii* во время ее сушки на стеклянных шариках и предположили, что снижение числа жизнеспособных ризобий обусловлено «факторами семян» и фактором собственно высушивания. В их работе показано, что отрицательный эффект сушки может быть частично компенсирован добавлением сахаридов, в частности мальтозы, что указывает на то, что доступность питательных веществ, а возможно, и других растворенных веществ, влияет на выживаемость бактериальных клеток.

В ряде исследовательских работ продемонстрировано различие динамик жизнеспособности клубеньковых бактерий на матриксах разного состава (стеклянные шарики, семена, почва, нитроцеллюлозные фильтры и т. д.) (Vriezen et al., 2006). Одна из возможных причин наблюдаемых различий – сухие инокулированные семена имеют активность воды от 0.45 до 0.6 (Smith, 1992) и, таким образом, все еще содержат относительно большое ее количество, в отличие от абсолютно сухих поверхностей стеклянных бусин или нитроцеллюлозных фильтров.

С практической точки зрения, учитывая высокую чувствительность клубеньковых бактерий к высушиванию, важно либо обеспечить высева семян в день обработки (Васильчиков, Гурьев, 2018), либо использовать специальные полимерные и углеводные протекторы, повышающие устойчивость бактерий к осмотическому стрессу (Skorupska et al., 2006; Deaker et al., 2007; Reina-Bueno et al., 2012). В частности, нами ранее показано, что водорастворимый полимер поливинилпирролидон в композиции с активированным углем существенно повышает выживаемость ризобий на инокулированных семенах. Эффективность такой композиции выше, чем при использовании

поливинилпирролидона без угля, и на 20–30 % уменьшает гибель бактерий на инокулированных семенах после первых 5–7 суток хранения семян (Лактионов и др., 2019).

Наконец, следует отметить, что исследования выживаемости ризобий при предпосевной инокуляции должны стать важным элементом селекции эффективных штаммов-инокулянтов. Ключевой элемент при этом – изучение механизмов устойчивости ризобий к высушиванию. В мировой литературе ряд работ посвящен исследованию молекулярно-генетических аспектов осмотической устойчивости клубеньковых бактерий (Vriezen et al., 2007), особенно в рамках проблемы изменения климата (Zhang et al., 2024). Но относительно мало исследований по оценке жизнеспособности коллекционных штаммов микроорганизмов на семенах зернобобовых культур, а также по способам, с помощью которых можно повысить устойчивость клеток к осмотическому стрессу (Лактионов и др., 2019).

Цель нашей работы заключалась в оценке устойчивости трех производственных штаммов клубеньковых бактерий сои: штамма 6346 (используется для получения инокулянтов марки Ризоторфин), штамма 640 (в ряде работ определен как более эффективный по сравнению со штаммом 6346) и нового перспективного штамма RZ300 на семенах сои различных сортов, при различных температурных режимах хранения и использовании протекторных полимерно-угольных композиций различного состава, а также в выяснении механизмов устойчивости штаммов к высушиванию с применением методов сравнительной геномики.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы 6346, 640 и RZ300 *B. japonicum* из сетевой биоресурсной коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства.

Штамм 6346 выделен из клубеньков сои сорта Колхида 4 в Грузии на Цхакайской станции. Он применяется для производства инокулянта под сою под торговой маркой Ризоторфин (Васильчиков, Гурьев, 2018; Volobueva et al., 2023). Штамм 640 получен из клубеньков сои сорта Смена на лугово-черноземной почве Амурской области в 1976 г. во Всероссийском НИИ сои. В ряде работ штамм определен как более эффективный по сравнению со штаммом 6346 (Магомедов и др., 2011). Штамм RZ300 выделен в Краснодарском крае из клубеньков сои сорта Бара в 2022 г. и до настоящего времени почти не изучен. Этот штамм отличается стабильностью образования клубеньков в вегетационных и полевых опытах при нормальных и экстремальных условиях (наличие химических пестицидов, недостаток влаги). По штамму RZ300 получен патент № 2806593 «Способ культивирования клубеньковых бактерий сои *Bradyrhizobium japonicum* RZ300».

Выращивание штаммов 6346, 640 и RZ300 *B. japonicum* для инокуляции осуществляли в жидкой полусинтетической среде следующего состава (Yadav et al., 2011): маннит – 10.0 г/л; дрожжевой экстракт – 1 г/л; K_2HPO_4 – 0.5 г/л; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.2 г/л; NaCl – 0.1 г/л; $CaCO_3$ – следы, в течение 7 суток при 28 °C в стеклянных колбах с ватной

пробкой объемом 250 мл на орбитальном шейкере при 180 об./мин. По окончании культивирования колбы снимали с качалки и помещали в холодильник на хранение при +5 °C. Для получения опытных жидких культур посевной материал из колб асептически переносили в лабораторный ферментер BIORUS. Объем инокулома составлял 2 % от объема среды. Состав питательной среды инокулома соответствовал ранее указанному (Yadav et al., 2011).

Культивирование микроорганизмов производили до стационарной фазы, в которой клетки наиболее устойчивы к осмотическому стрессу (Soria et al., 2006), в периодическом режиме в течение 7 суток при +28 °C при скорости механического перемешивания 150 об./мин и интенсивности аэрации 1 л возд./1 л среды в мин. Полученные опытные препараты асептически разливали по предварительно простерилизованным стеклянным колбам с ватной пробкой и помещали в холодильник на хранение. Для определения титра полученных бактериальных суспензий готовили серию их последовательных 10-кратных разведений с последующим посевом на чашки Петри с агаризованной питательной средой указанного ранее состава (Yadav et al., 2011), инкубировали в течение 10 суток при +28 °C и подсчитывали число образовавшихся колоний.

Для изучения устойчивости штаммов к высушиванию использовали стеклянные шарики и семена сои *Glycine max* L. трех перспективных сортов: ЭН Аргента (Дериглазова, Морозов, 2022), Бара (Парахин и др., 2017), Пруденс (Бобкова, 2020), различающихся по происхождению.

Динамику жизнеспособности клубеньковых бактерий при высушивании изучали при обработке семян и стеклянных шариков сходного размера (для определения влияния «фактора семян») препаратами ризобий в течение 24 ч после инокуляции. Препараты наносили в концентрациях: 10 % (водный раствор) и 100 % (неразведенный инокулянт) из расчета 10 л на 1 т семян, принятых в сельскохозяйственной практике возделывания полевых культур (Кинчарова, Матвиенко, 2021). Избыток инокулянта в виде неразведенного препарата наносили для оценки влияния вносимых с ним экзополисахаридов и остатков среды, а также более высокой плотности клеток на их устойчивость к высушиванию на семенах. Обработку семян и шариков вариантами баковых растворов с последующей оценкой динамики жизнеспособности бактерий с течением времени проводили по авторской методике (Лактионов и др., 2019), повторность опыта – трехкратная.

Для оценки эффективности полимерно-углеводных композиций в качестве протекторов бактерий на семенах, высушающихся при различных температурах, готовили следующие составы: 1 % раствор карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ); 50 % раствор сахарозы; смесь 1 % раствора КМЦ, 50 % раствора сахарозы; смесь 1 % раствора КМЦ, 50 % раствора сахарозы и 1 % активированного угля.

Чистоту микробных культур в процессе работы определяли как по морфологическим признакам (морфология колоний на чашках и клеток ризобий в фиксированном мазке), так и с помощью молекулярно-генетической идентификации (анализ последовательностей гена 16S рРНК).

ДНК ризобий выделяли методом СТАВ (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987, 1990). Секвенирование общей ДНК штаммов RZ300 (BioProject PRJNA1266151) и 6346 (BioProject PRJNA1334995) осуществляли методом 3-го поколения (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Сборку и аннотацию полногеномных данных выполняли с применением современных биоинформатических методов: flye, SPAdes, mauveAligner, GeneMark, Prokka, EggNOG-mapper. По результатам биоинформатического анализа произвели аннотирование в Генбанк полногеномных последовательностей штаммов.

Статистическую обработку данных проводили с использованием библиотеки SciPy, а визуализацию результатов – с помощью библиотеки matplotlib языка Python.

Результаты

На первом этапе исследований был определен титр клеток изучаемых штаммов в соответствующих бактериальных суспензиях на момент приготовления рабочих растворов. Он составлял: 1.8 ± 0.24 млрд КОЕ/мл для штамма 6346; 1.77 ± 0.29 млрд КОЕ/мл для штамма 640; 2.0 ± 0.19 млрд КОЕ/мл для штамма RZ300.

Для демонстрации специфического влияния на выживаемость изучаемых штаммов в процессе их высыхания проведена оценка жизнеспособности ризобий на семенах сои сорта ЭН Аргента и на стеклянных шариках (результаты представлены на рис. 1). Показано, что на стеклянных шариках жизнеспособные клетки сохраняются в количестве нескольких тысяч КОЕ на один шарик лишь в течение 3 ч после инокуляции и почти полностью погибают уже через сутки после обработки. В то же время на семенах сохраняются десятки тысяч жизнеспособных клеток спустя сутки после обработки. При этом разница в жизнеспособности клеток разных штаммов не является статистически значимой; рассчитанная F-статистика (2.67) < критического значения F (3.89) при 5 % уровне значимости.

На втором этапе исследований изучали возможное влияние семян трех сортов сои на динамику жизнеспособности клубеньковых бактерий без добавления защитных композиций (рис. 2). При обработке семян 10 % раствором инокулянта в норме 10 л/т спустя 168 ч после инокуляции клетки штамма RZ300 сохраняются на семенах сои сортов ЭН Аргента, Бара и Пруденс в количестве 16, 14 и 21 тыс. КОЕ на одно семя соответственно. В то же время для штаммов 6346 и 640 этот показатель не превышал (соответственно) 3, 6 и 2 тыс. КОЕ на одно семя.

Анализ жизнеспособности трех штаммов *B. japonicum* на разных сортах сои через 168 ч после обработки показал, что для сорта ЭН Аргента количество жизнеспособных клеток штамма RZ300 ($\bar{X} = 15.67$ тыс. КОЕ/семя) статистически значимо превышает ($HSP = 5.19$; $p < 0.05$) таковое у штаммов 6346 ($\bar{X} = 2.00$ тыс. КОЕ/семя) и 640 ($\bar{X} = 2.67$ тыс. КОЕ/семя). Аналогичные закономерности наблюдались для сортов Бара и Пруденс. Штамм RZ300 продемонстрировал статистически значимо более высокую жизнеспособность клеток на сортах Бара ($\bar{X} = 14.00$ тыс. КОЕ/семя; $HSP = 4.85$) и Пруденс ($\bar{X} = 21.33$ тыс. КОЕ/

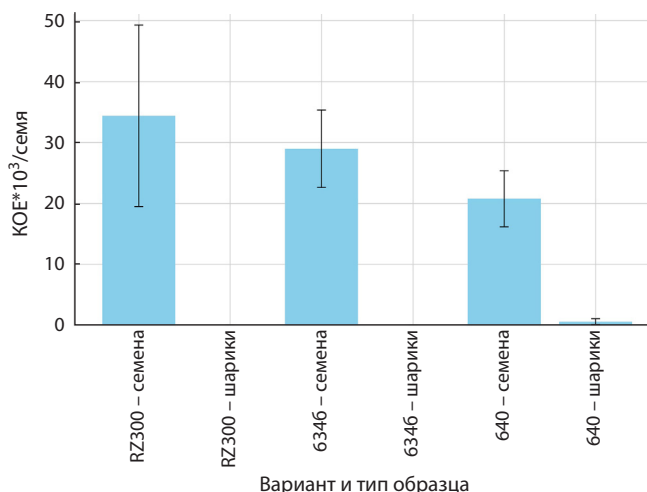


Рис. 1. Жизнеспособность клеток изучаемых штаммов на семенах сои сорта ЭН Аргента и стеклянных шариках спустя 24 ч после инокуляции.

семя; $HSP = 3.20$) по сравнению со штаммами 6346 и 640, между которыми существенных различий не обнаружено. Через 336 ч число бактерий штамма RZ300 на семенах всех сортов исчислялось тысячами КОЕ/семя, в то время как жизнеспособные клетки штаммов 6346 и 640 выделить с семян не удавалось. Схожая закономерность наблюдалась и для 100 % растворов инокулянтов изучаемых штаммов, с поправкой на изначально большее количество нанесенных клеток.

На третьем этапе исследования было изучено влияние различных защитных композиций и температурного режима на жизнеспособность клеток штамма RZ300, продемонстрировавшего лучшие показатели выживаемости на инокулированных семенах. На рис. 3 показано, что с ростом температуры увеличивается скорость гибели клеток. При этом карбоксиметилцеллюлоза является относительно малоэффективным протектором клеток, в то время как сахароза и композиции на ее основе существенно увеличивают устойчивость бактерий к высыханию на семенах. Для температуры +5 °C, демонстрирующей наименьший контраст между средними значениями по вариантам протектора, показано, что варианты с сахарозой обеспечивают жизнеспособность клеток достоверно выше (при 5 % уровне значимости) по сравнению с 1 % карбоксиметилцеллюлозой, при этом разница между различными вариантами с сахарозой была незначима. Таким образом, можно предположить, что именно сахароза оказывает наибольший защитный эффект в отношении бактерий, подвергающихся высыханию на семенах. Соответственно, посредством композиций на основе сахарозы можно еще больше повысить устойчивость штамма RZ300 к высыханию на семенах.

Наконец, с целью выявления особенностей генома штамма RZ300, которые могут быть ответственны за его устойчивость к высыханию, был выполнен сравнительный

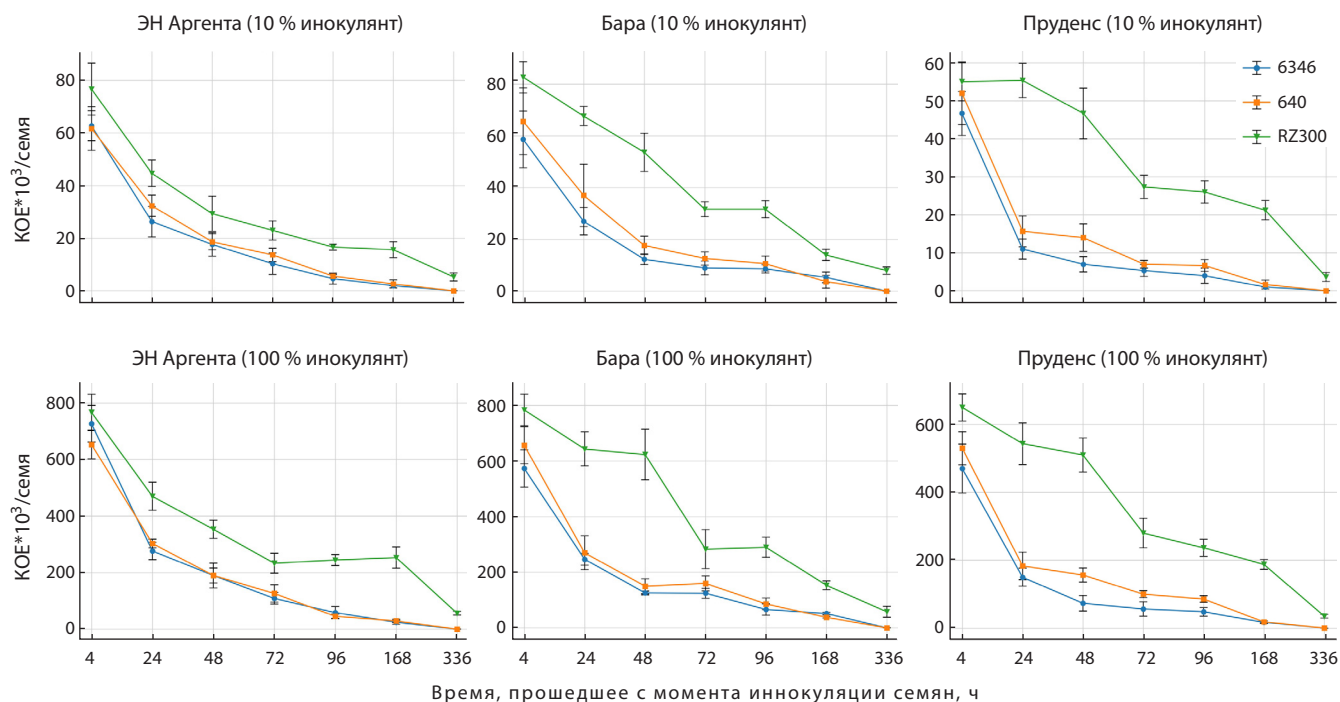


Рис. 2. Динамика жизнеспособных клеток на семенах сои сортов ЭН Аргента, Бара, Пруденс, инокулированных 10 и 100 % растворами препаратов без добавления защитных композиций.

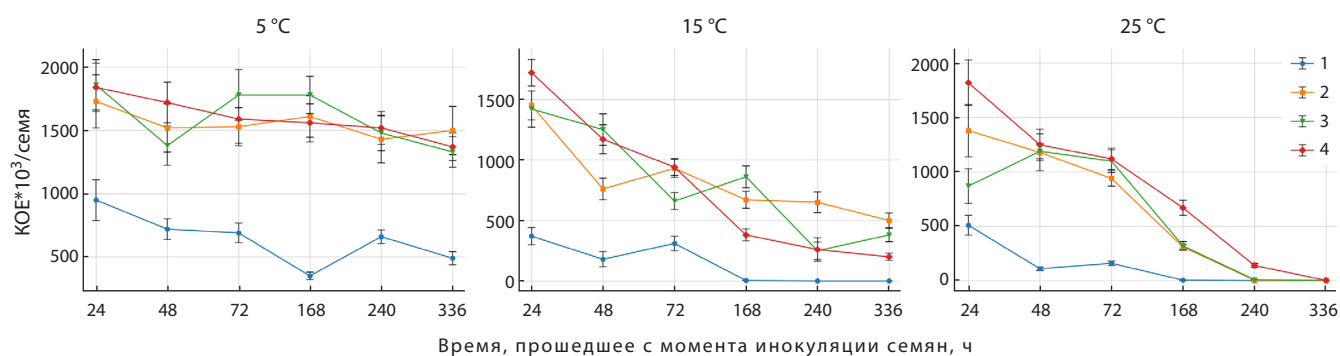


Рис. 3. Динамика жизнеспособности клеток RZ300 на семенах сорта ЭН Аргента в течение двух недель хранения при разных температурных режимах (5, 15, 25 °C) и составе полимерных протекторов (1 – 1 % КМЦ; 2 – 50 % сахара; 3 – 1 % КМЦ + 50 % сахара; 4 – 1 % КМЦ + 50 % сахара + 0.5 % активированный уголь).

анализ его полного генома с геномом менее устойчивого штамма 6346.

Результаты полногеномного секвенирования штамма RZ300 депонированы в NCBI (BioProject PRJNA1266151). Размер кольцевой хромосомы – 9 199 961 п. о. Общее число генов равно 9643, из них кодирующие – 5736, значительная часть – 3842 – относится к псевдогенам. Результаты полногеномного секвенирования штамма 6346 также депонированы NCBI (BioProject PRJNA1334995). Сравнение геномов штаммов RZ300 и 6346 было выполнено с помощью программного обеспечения – RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) server. В таблице приведены дифференциально представленные гены, специфические для изученных штаммов.

Обсуждение

В сельскохозяйственной практике потенциал продуктивности бобово-ризобияльного симбиоза возможно реализовать только при обеспечении высокой выживаемости бактерий на инокулированных семенах до их высева в почву. При этом, несмотря на высокую прикладную значимость вопроса устойчивости клубеньковых бактерий к высушиванию на семенах, это направление исследований остается малоизученным как в отечественной, так и в зарубежной научной литературе.

При использовании стеклянных шариков выявлено, что поверхность семян – более благоприятная среда для клубеньковых бактерий, чем инертная поверхность стекла. Это свидетельствует о том, что эволюционная история

Сравнительный анализ генов по функциональным группам у устойчивого и чувствительного к высушиванию штаммов RZ300 и 6346 *B. japonicum*

Функциональная группа генов	Имеются только	
	у штамма RZ300	у штамма 6346
Реакция на стресс	<i>opgC, opgG2, bphP, hflX</i>	<i>LTC4S, katA, tehA</i>
Углеводы	<i>nagE, nagB, nagA, hatA, livK, malF, thiH, hbd, bdh, ribB, gadh, gcdC, gcd, deoC</i>	<i>bkdA, bkdB, bkdC, bkdD, actP, hpr, ppsA, malK, fixX, xylR</i>
Подсистемы на основе кластеризации	<i>tseT, rny, fixO, trmE, dgkA</i>	<i>aepA, rtxC, minE, rad50, mre11</i>
Метаболизм ДНК	<i>vsr</i>	<i>yieH, yrrC, rep, pcrA, hup</i>
Метаболизм РНК	<i>rpoE, mucD</i>	<i>rpoH3, rnpA, mbl</i>
Азотный обмен	<i>narB, narK, ntrC, norB</i>	<i>nosD, nosF, nosR, nosL, nosY, nosZ, cynD, cynB, cynA</i>
Метаболизм белков	<i>lgt, trnV</i>	<i>hypC, ere</i>
Мембранный транспорт	<i>oppF, oppD, oppA, dppC, livH, livM, livG, livF, nhaA</i>	<i>mgtA, trbB, trbC, trbD, trbE, trbJ, lapB, lapC, lapE, flpA, hrcU</i>
Аминокислоты и производные	<i>potA, potI, urtA, ureJ, tdh</i>	<i>prpA, atzA, arcA, arcD, odc, antA, hmg</i>
Дыхание	<i>cydA, resA</i>	<i>hupV, hupU, hoxX, hoxT, hoxA, hoxJ</i>
Жирные кислоты, липиды, изопреноиды	<i>hbd</i>	–
Метаболизм ароматических соединений	<i>mucl, estA, hbaP, maoA</i>	<i>bkdA</i>
Вирулентность, болезнь и защита	<i>lodB, lodA, czcD, cusA, czcA, nccB, merR, cueO</i>	–
Метаболизм серы	<i>gshT, trkA</i>	–
Метаболизм железа	<i>tonB, fhuA</i>	–
Кофакторы, витамины, простетические группы, пигменты	<i>pdhA, btuB</i>	<i>bcd</i>
Фаги, профаги	<i>terL</i>	–
Подвижность и хемотаксис	<i>cheA</i>	<i>fliS</i>
Разное	<i>cdhA, gpmA</i>	–

Примечание. Жирным шрифтом выделены гены, предположительно имеющие отношение к повышенной устойчивости штамма RZ300 к стрессам.

симбиоза, кроме широко известных функций, связанных с вирулентностью и азотфиксацией, возможно, включала и развитие специфических функций, связанных с сохранением жизнеспособности ризобий на поверхности семян, что, очевидно, имеет большое значение для обеспечения стабильности симбиоза.

Интересно отметить, что по данным, полученным в настоящем исследовании, сорт семян не влияет на динамику снижения числа клеток, тогда как штаммы бактерий значительно различаются по устойчивости к высушиванию. Это указывает, во-первых, на консервативность механизмов (со стороны растения), обеспечивающих сохранность ризобий на поверхности семян, а во-вторых, – на перспективность селекции штаммов инокулянтов по признаку устойчивости к высушиванию как способа повышения их технологичности, т. е. интеграции с существующими агротехнологическими схемами, на что до настоящего времени обращали очень мало внимания.

В настоящем исследовании мы показали, что в обеспечение выживаемости ризобий на инокулированных семенах значительный вклад может внести подбор эффектив-

ных защитных композиций и методов обработки семян. Так, повышение нормы расхода инокулянта в 10 раз приводило к пропорциональному увеличению числа жизнеспособных клеток на семенах на всем протяжении исследуемого периода. Однако общая динамика гибели клеток оставалась схожей с таковой при использовании 10 % растворов. Это позволяет предположить отсутствие выраженного защитного эффекта экзополисахаридов, вносимых с увеличенным объемом инокулянта, на осмотическую устойчивость штаммов.

Обнаружено, что динамика сокращения числа жизнеспособных бактерий на семенах замедляется со снижением температуры, а также при условии добавления защитных полимерно-углеводных композиций, в частности на основе 50 % сахарозы. Таким образом, понижением температуры и добавлением сахарозы при обработке семян сои можно добиться увеличения числа жизнеспособных клеток на семени к моменту его заделки в почву.

При сравнительном анализе геномов штаммов RZ300 и 6346 выявлены следующие различия. По группе генов «реакции на стресс» устойчивый к высушиванию RZ300

обладает генами *opgC* и *opgG2*, отвечающими за синтез осморегулируемых периплазматических глюкозидов, что напрямую объясняет его способность противостоять осмотическому стрессу, в то время как осмочувствительный 6346 лишен этих генов. *OpnC* – белок, участвующий в биосинтезе осморегулируемых периплазматических глюкозидов (OPGs), характерных для ряда бактерий. Эти глюкозиды играют важную роль в адаптации к осмотическому стрессу, а также участвуют в поддержании целостности клеточной оболочки, формировании биопленок и патогенности. Возможно, именно роль этого гена в формировании биопленок и определяет устойчивость бактерий к высушиванию на семенах. Мутации в гене *opnC* могут приводить к изменениям в синтезе *OpnC*, что, в свою очередь, влияет на выживаемость бактерий в условиях осмотического стресса (Bontemps-Gallo, Lacroix, 2015).

Среди других генов, которые потенциально могли бы быть вовлечены в контроль устойчивости к стрессу, у штамма RZ300 присутствует ген, кодирующий ГТФ-связывающий белок, родственник HflX. Результаты последних исследований указывают на роль HflX в определении устойчивости бактерий к макролидам и линкозамидам (Rudra et al., 2020). Обращает на себя внимание наличие у штамма RZ300 гена *dgkA*. Известно, что экспрессия гена *dgkA* связана с ускорением роста и выживаемости бактерий в ответ на воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды (Baker et al., 2021). В контексте мембранного транспорта, устойчивый к высушиванию штамм RZ300 демонстрирует более развитые системы импорта, включая транспортеры для олигопептидов (гены *oppA*, *oppD*, *oppF*), дипептидов (ген *dppC*) и аминокислот (*livH*, *livM*, *livG*, *livF*), а также имеет ген *nhaA* для регуляции Na^+/H^+ -антипорта. Примечательно, что регуляция гена *nhaA* кишечной палочки *Escherichia coli* используется для получения трансгенных растений риса (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) с повышенной устойчивостью к засолению, но пониженной – к засухе (Wu et al., 2005).

Заметной особенностью RZ300 является наличие гена *lgt*, кодирующего фермент, участвующий в биосинтезе липопротеинов, что критически важно для поддержания целостности клеточной оболочки, а следовательно, и для устойчивости к стрессовым факторам. Показано, что снижение уровня *Lgt* в клиническом штамме уропатогенной кишечной палочки приводит к повышению проницаемости внешней мембраны и увеличению чувствительности к сыворотке и антибиотикам (Diao et al., 2021). Наконец, у штамма RZ300 обнаружены ген *cdhA*, кодирующий холиндегидрогеназу, и ген *gpmA*, отвечающий за фосфолипидатмутазу, которые указывают на его способность поддерживать целостность клеточных мембран.

В ряде исследований выявлено, что патогенные бактерии, мутантные по гену *cdhA*, обладают пониженной вирулентностью и устойчивостью к антибиотикам, воздействующим на клеточную стенку (Pancholi et al., 2010). Известно, что делеция в гене *gpmA* у *E. coli* приводит к специфической гиперчувствительности к H_2O_2 , сравнимой с делецией основного гена-поглопителя H_2O_2 *katG*. При воздействии H_2O_2 транскрипция *gpmA* усиливается, что

подчеркивает его роль в защите от окислительного стресса. В соответствии с этим, ген *gpmA* можно определить как элемент механизма защиты бактерий от окислительного стресса (Roth et al., 2022).

Таким образом, по результатам проведенного анализа генетических различий между осмоустойчивым штаммом RZ300 и осмочувствительным 6346 было показано, что среди дифференциально представленных генов можно выделить большую группу, которая предположительно могла бы быть связана с контролем устойчивости. Из этих генов наибольший интерес представляют *opnC* и *opgG2*, отвечающие за синтез осморегулируемых периплазматических глюкозидов, которые могут играть важную роль в определении устойчивости клубеньковых бактерий к высушиванию на инокулированных семенах. Эти данные не только открывают перспективу в исследовании механизмов устойчивости ризобий к высушиванию, но и дают направления для экспериментов с переносом генетических конструкций, содержащих эти гены, в симбиотически эффективные штаммы ризобий для обеспечения их соответствия требованиям современных агротехнологий.

Заключение

В настоящем исследовании детально изучена проблема обеспечения устойчивости ризобияльных штаммов-инокулянтов к высушиванию на поверхности инокулированных семян сои. Показано, что выживаемость штаммов ризобий на семенах сои, во-первых, существенно выше, чем на нейтральном носителе (стеклянных шариках), а во-вторых, не зависит от сорта сои. Выявлено, что главные различия по выживаемости связаны с самими штаммами, что указывает на важность селекции перспективных штаммов-инокулянтов именно по этому признаку. Разработаны оптимальные технологии применения защитных композиций, повышающих устойчивость штаммов к высушиванию на семенах. Для выяснения механизмов устойчивости штаммов к высушиванию проведен сравнительный анализ полных геномов устойчивого и менее устойчивого штаммов. Обнаружены гены-кандидаты, которые потенциально могут быть вовлечены в контроль данного признака.

Особый интерес представляет наличие у устойчивого штамма RZ300 гена *opnC*, который отсутствует у менее устойчивого штамма 6346 и, вероятно, играет роль в формировании устойчивости бактерий к высушиванию на семенах. Предполагается, что ген *opnC* может служить молекулярным маркером устойчивости к высушиванию бактерий на семенах и быть использован в будущем для целенаправленной селекции или генной модификации ризобияльных штаммов, применяемых в составе микробных препаратов.

Список литературы / References

- Бобкова Ю.А. Реакция сои сорта ОАК Пруденс на некорневую подкормку макро- и микроудобрениями в условиях Орловской области. *Вестник аграрной науки*. 2020;5(86):11-18. doi 10.17238/issn2587-666X.2020.5.11
[Bobkova Yu.A. Reaction of OAK Prudence soybeans to foliar fertilization with macro- and micro fertilizers in the conditions of the

- Orel region. *Vestnik Agrarnoy Nauki = Bulletin of Agrarian Science*. 2020;5(86):11-18. doi 10.17238/issn2587-666X.2020.5.11 (in Russian)]
- Вавилов П.П., Посыпанов Г.С. Бобовые культуры и проблема растительного белка. М., 1983
[Vavilov P.P., Posypanov G.S. Legumes and the Issue of Vegetable Protein. Moscow, 1983 (in Russian)]
- Васильчиков А.Г., Гурьев Г.П. Адаптация сортов сои с разным вегетационным периодом к почвенно-климатическим условиям Орловской области. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2018; 4(28):49-53. doi 10.24411/2309-348X-2018-00001
[Vasilchikov A.G., Gurev G.P. Adaptation of soybean varieties with different growing seasons to the soil and climatic conditions of the Oryol region. *Zernobobovye i Krupnyanye Kultury = Legumes Groat Crops*. 2018;4(28):49-53. doi 10.24411/2309-348X-2018-00001 (in Russian)]
- Дериглазова Г.М., Морозов А.Н. Конкурентоспособность отечественного сорта сои ЭН Аргента по сравнению с сортом канадской селекции ОАК Пруденс в условиях Центрального Черноземья. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2022;4(44):49-57. doi 10.24412/2309-348X-2022-4-49-57
[Deriglazova G.M., Morozov A.N. Competitiveness of the domestic soybean variety EN Argenta compared with the Canadian breeding variety of OAK Prudence in the conditions of the Central Black Earth region. *Zernobobovye i Krupnyanye Kultury = Legumes Groat Crops*. 2022;4(44):49-57. doi 10.24412/2309-348X-2022-4-49-57 (in Russian)]
- Кинчарова М.Н., Матвиенко Е.В. Эффективность предпосевной обработки семян в борьбе с болезнями зернового сорго. *Аграрный вестник Урала*. 2021;9(212):2-10. doi 10.32417/1997-4868-2021-212-09-2-10
[Kincharova M.N., Matvienko E.V. The effectiveness of pre-sowing seed treatment in the fight against diseases of grain sorghum. *Agrarnyy Vestnik Urala = Agrarian Bulletin of the Urals*. 2021; 9(212):2-10. doi 10.32417/1997-4868-2021-212-09-2-10 (in Russian)]
- Лактионов Ю.В., Косульников Ю.В., Дудникова Д.В., Яхно В.В., Кожемяков А.П. Протекторные свойства водорастворимых полимерных композиций и их твердофазной модификации при предпосевной обработке инокулированных семян сои *Glycine max* (L.) Merr. *Сельскохозяйственная биология*. 2019;54(5):1052-1059. doi 10.15389/agrobiology.2019.5.1052rus
[Laktionov Yu.V., Kosulnikov Yu.V., Dudnikova D.V., Yahno V.V., Kojemyakov A.P. Pre-sowing protection of inoculated soybean *Glycine max* (L.) Merr. seeds by water-soluble polymer compositions and their solid-phase modification. *Sel'skokhozyajstvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2019;54(5):1052-1059. doi 10.15389/agrobiology.2019.5.1052rus (in Russian)]
- Магомедов Р.Д., Цехмейструк Н.Г., Шелякин В.А., Рябуха С.С., Дидович С.В. Влияние различных штаммов *Rhizobium japonicum* (Kircher) Buchanan на урожайность сои. *Масличные культуры*. 2011;2(148-149):159-162
[Magomedov R.D., Tsekhmeistruk N.G., Shelyakin V.A., Ryabukha S.S., Didovich S.V. The influence of various strains *Rhizobium japonicum* (Kircher) Buchanan on soybean yield. *Maslichnyye Kultury = Oil Crops*. 2011;2(148-149):159-162 (in Russian)]
- Парахин Н.В., Лысенко Н.Н., Петрова С.Н., Кузмичева Ю.В., Рыжов И.А. Оценка эффективности систем гербицидов в агроценозах различных сортов сои в зависимости от способа основной обработки почвы. *Земледелие*. 2017;2:39-43
[Parakhin N.V., Lysenko N.N., Petrova S.N., Kuzmicheva Yu.V., Ryzhov I.A. Evaluation of herbicide system efficacy in agroecosis of different soybean varieties depending on tillage method. *Zemledeliye*. 2017;2:39-43 (in Russian)]
- Baker B.R., Ives C.M., Bray A., Caffrey M., Cochrane S.A. Undecaprenol kinase: function, mechanism and substrate specificity of a potential antibiotic target. *Eur J Med Chem*. 2021;210:113062. doi 10.1016/j.ejmech.2020.113062
- Bashan Y., de-Bashan L., Prabhu S.R., Hernandez J. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant Soil*. 2014;378:1-33. doi 10.1007/s11104-013-1956-x
- Bontemps-Gallo S., Lacroix J.M. New insights into the biological role of the osmoregulated periplasmic glucans in pathogenic and symbiotic bacteria. *Environ Microbiol Rep*. 2015;7(5):690-697. doi 10.1111/1758-2229.12325
- Deaker R., Roughley R.J., Kennedy I.R. Desiccation tolerance of rhizobia when protected by synthetic polymers. *Soil Biol Biochem*. 2007; 39(2):573-580. doi 10.1016/j.soilbio.2006.09.005
- Diao J., Komura R., Sano T., Pantua H., Storek K.M., Inaba H., Ogasawa H., ... Yanagida H., Nishikawa J., Reid P.C., Cunningham C.N., Kapadia S.B. Inhibition of *Escherichia coli* lipoprotein diacylglycerol transferase is insensitive to resistance caused by deletion of Braun's lipoprotein. *J Bacteriol*. 2021;203(13):e00149-21. doi 10.1128/JB.00149-21
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*. 1987;19(1):11-15
- Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 1990;12(1):13-15
- Fred E.B. Some factors which influence the growth and longevity of the nodule bacteria. In: Fred E.B., Baldwin I.L., McCoy E. (Eds) *Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants*. Madison; Wisconsin: University of Wisconsin, 1932;104-117
- Lampety S., Ahiabor B.D.K., Yeboah S., Asamoah C. Response of soybean (*Glycine max*) to rhizobial inoculation and phosphorus application. *J Exp Biol Agric Sci*. 2014;2(1):72-77
- Pancholi V., Boël G., Jin H. *Streptococcus pyogenes* Ser/Thr kinase-regulated cell wall hydrolase is a cell division plane-recognizing and chain-forming virulence factor. *J Biol Chem*. 2010;285(40):30861-30874. doi 10.1074/jbc.M110.153825
- Regar M.K., Meena R.H., Jat G., Mundra S.L. Effect of different rhizobial strains on growth and yield of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2017;6(11):3653-3659. doi 10.20546/ijcmas.2017.6.11.427
- Reina-Bueno M., Argandoña M., Nieto J.J., Hidalgo-García A., Iglesias-Guerra F., Delgado M.J., Vargas C. Role of trehalose in heat and desiccation tolerance in the soil bacterium *Rhizobium etli*. *BMC Microbiol*. 2012;12(1):207. doi 10.1186/1471-2180-12-207
- Roth M., Goodall E.C.A., Pullera K., Jaquet V., François P., Henderson I.R., Krause K.-H. Transposon-directed insertion-site sequencing reveals glycolysis gene *gpmA* as part of the H₂O₂ defense mechanisms in *Escherichia coli*. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(10):2053. doi 10.3390/antiox11102053
- Rudra P., Hurst-Hess K.R., Cotten K.L., Partida-Miranda A., Ghosh P. Mycobacterial HflX is a ribosome splitting factor that mediates antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117(1):629-634. doi 10.1073/pnas.1906748117
- Skorupska A., Janczarek M., Marczak M., Mazur A., Król J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb Cell Fact*. 2006;5(1):7. doi 10.1186/1475-2859-5-7
- Smith R.S. Legume inoculant formulation and application. *Can J Microbiol*. 1992;38(6):485-492. doi 10.1139/m92-080
- Soria M.A., Pagliero F.E., Correa O.S., Kerber N.L., Garcia A.F. Tolerance of *Bradyrhizobium japonicum* E109 to osmotic stress and the stability of liquid inoculants depend on growth phase. *World J Microbiol Biotechnol*. 2006;22(1):1235-1241. doi 10.1007/s11274-006-9166-9
- Vincent J.M., Thompson J.A., Donovan K.O. Death of root nodule bacteria on drying. *Aust J Agric Res*. 1961;13(2):258-270. doi 10.1071/AR9620258
- Volobueva O.G., Trukhachev S., Belopukhov C., Seregina I. Comparative study of symbiotic activity of legumes when using Risotorphin

- and Epin-extra. *Braz J Biol.* 2023;83(3):e264218. doi 10.1590/1519-6984.264218
- Vriezen J.A., de Bruijn F.J., Nüsslein K. Desiccation responses and survival of *Sinorhizobium meliloti* USDA 1021 in relation to growth phase, temperature, chloride and sulfate availability. *Lett Appl Microbiol.* 2006;42(2):172-178. doi 10.1111/j.1472-765X.2005.01808.x
- Vriezen J., Bruijn F., Nüsslein K. Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(11):3451-3459. doi 10.1128/AEM.02991-06
- Wu L., Fan Z., Guo L., Li Y., Chen Z., Qu L. Over-expression of the bacterial *nhaA* gene in rice enhances salt and drought tolerance. *Plant Sci.* 2005;168(2):297-302. doi 10.1016/j.plantsci.2004.05.033
- Yadav J., Verma J.P., Rajak V.K., Tiwari K.N. Selection of effective indigenous *Rhizobium* strain for seed inoculation of chickpea (*Cicer aritenium* L.) production. *Bacteriol J.* 2011;1(1):24-30. doi 10.3923/bj.2011.24.30
- Zhang Y., Ku Y.S., Cheung T.Y., Cheng S.S., Xin D., Gombeau K., Cai Y., Lam H.M., Chan T.F. Challenges to rhizobial adaptability in a changing climate: genetic engineering solutions for stress tolerance. *Microbiol Res.* 2024;288:127886. doi 10.1016/j.micres.2024.127886

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 11.07.2025. После доработки 04.12.2025. Принята к публикации 04.12.2025.