

Кормовые ресурсы

УДК 636.2:631.52:631.461.52

doi: 10.15389/agrobiology.2019.6.1306rus

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЕ ШТАММЫ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ЛЮЦЕРНЫ (*Medicago varia* L.): МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СОПРЯЖЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ*М.Л. РУМЯНЦЕВА¹, М.Е. ВЛАДИМИРОВА¹, В.С. МУНТЯН¹,
Г.В. СТЕПАНОВА², А.С. САКСАГАНСКАЯ¹, А.П. КОЖЕМЯКОВ¹, А.Г. ОРЛОВА³,
А. ВЕКЕР⁴, Б.В. СИМАРОВ¹

В травостоях многолетних кормовых бобовых трав предпочтение отдается люцерне для создания культурных пастбищ и восстановления деградированных почв. Люцерна изменчивая (*Medicago sativa* L. nothosubsp. *varia* (Martyn) Arcang) высокоурожайная и устойчивая к неблагоприятным условиям возделывания культура, что важно для зон рискованного земледелия России. Урожайность люцерны в значительной степени зависит от успешности формирования растительно-микробной симбиотической системы с клубеньковыми бактериями (ризобиями), которая становится способной фиксировать азот атмосферы. Согласно современным исследованиям по симбиогенетике, эффективность симбиотических систем предопределяется комплементарностью взаимодействия геномов растения и его микросимбионта. Исходя из этого и биопрепараты, которые используют для обработки семян бобовых, также должны содержать селекционно подобранные штаммы ризобий с соответствующими генотипическими характеристиками. В представленной работе впервые проведен сравнительный анализ урожайности 73 сорто-микробных систем, сформированных на основе штаммов *Sinorhizobium meliloti*, выделенных из района, подверженного засолению, и производственных штаммов 425а и 4156, которые используют для приготовления биопрепарата Ризоторфин, с сортами люцерны, созданными методами традиционной и сопряженной селекции. Показана перспективность отбора высокоэффективных штаммов, комплементарных хозяйственно-ценным сортам растений-хозяев в модельных опытах. Установлено, что штаммы А1 и А2 активнее формировали симбиотические системы с испытанными сортами люцерны, чем производственные штаммы. Впервые показано, что сорто-микробные системы на основе новых сортов обладают повышенной адаптивностью, а потенциал повышения прибавок урожая для них существенно превышает 50 %. Впервые получены данные, показывающие, что урожайность сорто-микробных систем, сформированных производственным штаммом 425а, преимущественно зависит от неконтролируемых факторов согласно двухфакторному дисперсионному анализу. Вместе с тем, геномные характеристики этого штамма играют более существенную роль, чем сорто-штаммовые взаимодействия, в формировании урожая, что, по-видимому, обуславливает востребованность биопрепаратов на основе этого штамма для разных сортов в различных географических районах Российской Федерации. Высокая комплементарность штаммов А1 и А2 к сорту Агния и функциональная значимость генетических характеристик штамма 425а обусловили интерес к их геномным характеристикам. Сравнительный анализ геномов с использованием ДНК-биочипов выявил существенные различия между высокоэффективными штаммами. Установлено, что гены, обуславливающие симбиотическую активность и стрессоустойчивость ризобий, имели дивергентную структуру преимущественно у штаммов, адаптированных к условиям засоления. Данные первых этапов молекулярно-генетического анализа высокоэффективных штаммов указывают на необходимость продолжения исследований, которые позволят осуществлять направленный подбор штаммов-микросимбионтов для современных сортов люцерны. Впервые представленные результаты оценки урожайности сорто-микробных систем, выращиваемых в различных природно-климатических условиях России, наглядно доказывают необходимость широкого внедрения метода сопряженной симбиотической селекции для создания новых хозяйственно ценных сортов бобовых трав, необходимых для формирования устойчивой кормовой базы.

Ключевые слова: *Medicago varia*, *Sinorhizobium meliloti*, сорта люцерны, метод сопряженной селекции, высокоэффективные штаммы, симбиотические гены и гены стрессоустойчивости ризобий, геномные острова, сорто-микробные системы, урожайность, двухфакторный дисперсионный анализ.

Формирование устойчивой кормовой базы для животноводства и птицеводства, в том числе повышение качества кормов, — необходимое условие для эффективного развития современных агропромышленных комплексов.

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 14.607.21.0178, RFMEFI60717X0178).

сов. Выращивание многолетних кормовых трав как пастбищных культур и включение их в зерновые и пропашные севообороты позволяет значительно удовлетворять потребности луговодства в азоте и существенно снижать экологические риски, связанные с применением минеральных удобрений.

Люцерна — кормовая культура, которая дает высокобелковый корм для скота и птицы, который богат всеми необходимыми витаминами, углеводами, минеральными солями и микроэлементами, а его перевариваемость достигает 70-80 % (1, 2). Люцерну издавна выращивали практически во всех основных почвенно-климатических зонах России. В настоящее время к использованию допущено 125 сортов люцерны, относящихся к трем видам: *Medicago sativa* L. nothosubsp. *varia* (Martyn) Arcang (люцерна изменчивая), *Medicago sativa* L. subsp. *sativa* (люцерна синяя) и *Medicago sativa* L. subsp. *falcata* (L.) Arcang (люцерна желтая) (3). Практическое предпочтение получила люцерна изменчивая (гибрид люцерны посевной и желтой), в которой успешно сочетается высокая урожайность, характерная для люцерны посевной, с высоким качеством сухого вещества и устойчивостью к неблагоприятным условиям возделывания, присущим люцерне желтой (1). Современные зимостойкие сорта этого вида можно выращивать в условиях холодного гумидного климата Нечерноземной зоны России. Люцерна изменчивая широко используется как сидерат для восстановления плодородия почв, в том числе деградированных. Выращивание этой кормовой культуры позволяет получать до 200 кг/га экологически безопасного биологического азота, а содержание азота в корневых и пожнивных остатках может достигать 120-200 кг/га (4).

Накапливаемый люцерной азот, который находится в биологически доступной форме, — это результат симбиотического взаимодействия растений с почвенными микроорганизмами ризобиями. Известно, что сорта бобовых значительно различаются по отзывчивости на инокуляцию разными штаммами и даже одним и тем же штаммом (5-8). Штаммы ризобий, которые используют для обработки семян растений, неодинаковы по способности формировать симбиоз на одном/нескольких сортах/видах растений-хозяев (хозяйская специфичность) (7, 9). Во многих исследованиях, направленных на повышение урожайности бобовых, приоритет отдается штаммам-микросимбионтам (10, 11). При этом авторы отмечают, что штаммы должны успешно конкурировать с местными штаммами в ризоплане корня растения-хозяина как в типовых условиях выращивания люцерны, так и при воздействиях различных абиотических факторов (засушливость, засоленность, низкие или высокие значения pH почвы) (8, 12-17). В ряде исследований показано, что штаммы, устойчивые к абиотическим факторам, чаще формируют эффективные симбиозы с растениями-хозяевами (15, 18-20). Однако вплоть до настоящего времени работы по селекции растений и штаммов-микросимбионтов ведутся отдельно (11, 21), хотя публикации, в которых обсуждается необходимость совместных исследований, также имеются (7, 14, 21).

Согласно последним достижениям симбиогенетики, в процессе формирования растительно-микробной системы происходит интеграция генетических ресурсов растений и микроорганизмов в единую систему (23). Факт того, что растительный и микробный компоненты, а также их взаимодействие играют ключевую роль при формировании симбиотических систем, рассмотрен в ряде работ (23-25). Следовательно, при направленном получении симбиотических систем, обладающих высокой урожайностью, следует учитывать хозяйскую специфичность штаммов по отношению к сорту растения-хозяина, однако в настоящее время такие иссле-

дования немногочисленны (7, 21, 26, 27). На практике, несмотря на то, что экономическая целесообразность применения биопрепаратов под бобовые доказана (28-32) и под определенные виды бобовых используют соответствующие биопрепараты, сорто-штаммовая специфичность при этом не учитывается. В результате обработки посевов разных сортов одного вида бобовых штаммом, входящим в состав биопрепарата, происходит формирование «случайных» сорто-микробных систем, в которых может иметь место значительное варьирование симбиотрофных показателей, таких как густота посевов, накопление растительной массы, содержание белка (протеиновая питательность корма), развитие корневой системы, размер и количество клубеньков на корнях. Это приводит к снижению показателей продуктивности, что согласуется с имеющимися данными (6, 15, 33-35).

Именно принцип комплементарности геномов бобово-ризобияльных компонентов составляет основу современного биотехнологического метода создания сортов бобовых культур, учитывающего их симбиотрофные показатели. Впервые положительные результаты получены при селекции новых сортов клевера (36). Работы по созданию современных сортов люцерны, таких как Агния и Таисия (37), были начаты относительно недавно. Однако указанные сорта уже включены в Государственный реестр селекционных достижений и допущены к использованию в РФ соответственно в 2012 и 2015 году (3). Это стало возможным только благодаря тому, что новый биотехнологический подход позволяет сократить продолжительность селекционного процесса на 5-7 лет и создавать сорта нового поколения с повышенными показателями продуктивности (повышение кормовой массы и урожайности семян) (37).

В представляемой работе по результатам деляночных опытов, проведенных в рамках Географической сети опытов Всероссийского НИИ сельскохозяйственной микробиологии (ГСО ВНИИСХМ), выявлены высокопродуктивные сорто-микробные системы, обладающие узкой и широкой адаптивностью. Приведены первые результаты сравнительного анализа полногеномных последовательностей двух высокоэффективных и одного производственного штамма (425а), которые показывают перспективность дальнейших исследований геномов штаммов, направленных на создание высокопродуктивных сорто-микробных систем.

Цель настоящего исследования заключалась в оценке вкладов растительного и микробного компонентов и их взаимодействия в повышение продуктивности сорто-микробных систем, сформированных на основе сортов люцерны, полученных методами традиционной и сопряженной селекции, в симбиозе с высокоэффективными штаммами *Sinorhizobium meliloti* из экосистемы Приаралья и штаммами 425а и 415б, используемыми при производстве биопрепарата Ризоторфин для люцерны.

Методика. Штаммы 425а и 415б *Sinorhizobium meliloti*, на основе которых готовят Ризоторфин (разработка ВНИИСХМ), рассматривали как производственные; 141 природный штамм (изолят) *S. meliloti* изначально был выделен из клубеньков дикорастущих растений люцерны, произраставших на почвах с сульфатно-хлоридным типом засоления (38). Солеустойчивость штаммов *S. meliloti* определяли по увеличению концентрации клеток штамма относительно начальной ($OD_{600} = 0,005$) при выращивании культуры в жидкой полной среде ТУ (39), содержащей 3,5 % NaCl (w/v), в течение 96 ч при 28 °С и 180 об/мин, согласно описанию (38, 40). Штамм Rm1021 *S. meliloti* использовали в качестве референсного.

Молекулярно-генетический анализ штаммов. Общую ДНК бактерий выделяли из штаммов с использованием набора NucleoSpin

Tissue Kit («Macherey-Nagel GmbH», Германия). Мечение ДНК проводили с использованием набора Bio Prime с фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I, случайными октамерами и аминоаллил-dUTP и флуорофорами Cy3 и Cy5 («Thermo Fisher Scientific», США). ДНК-пробы очищали на колонках Microcon («Millipore, США), количественно включившуюся метку определяли с использованием спектрофотометра Nanodrop («Thermo Fisher Scientific», США).

Геномы штаммов A1, A2 и 425a секвенировали методом MiSeq («Illumina», США). Для каждого штамма было получено от 7 до 15 контигов. Поиск последовательностей геномных островов в контигах проводили с использованием Mauve (<http://darlinglab.org/mauve/mauve.html>). Наличие геномных островов (ГО) в геномах проверяли методом ПЦР с оригинальными парами праймеров для внешних пограничных участков (41). ДНК-биочипы для гибридизации на основе полной геномной нуклеотидной последовательности референс-штамма Rm1021 (NC_003037, NC_003047, NC_003078) были предоставлены Центром биотехнологии университета г. Билефельд (Center for Biotechnology, Bielefeld University, Германия). Каждый чип содержал 6205 геноспецифичных 70-мерных олигонуклеотидных зондов в трех повторностях. Чипы гибридизовали в соответствии со стандартными условиями (42), сканирование проводили с использованием Tecan HS 4800 Pro («Tecan», Швейцария), сканы анализировали с помощью программ Genepix («Molecular Devices», США) и EMMA (Bielefeld University, Германия). Вероятности присутствия/отсутствия генов и динамический порог отсека для каждого из экспериментов вычисляли с применением программ GASC (43) и Statistica 6.0 («Dell Software Company», США).

Оценка симбиотической активности штаммов. В микроvegetационных опытах растения люцерны сорта Вега вида *M. varia* инокулировали испытуемыми штаммами и выращивали на вермикулите без добавления азота (типовые условия) в пробирках объемом 85 см³ или на 0,7 % агаризованной среде Красильникова-Кореняко с добавлением 0,6 % NaCl (условия засоления) в пробирках объемом 60 см³ в 8-кратных повторностях согласно описанию (13). Симбиотическую эффективность штаммов оценивали по прибавке сухой массы инокулированных растений (СМР), рассчитанной по воздушно-сухой массе (высушивание растений каждого образца при 37 °С в течение 7 сут до постоянной массы) по отношению к массе неинокулированных растений (контроль без инокуляции, КБИ).

Деляночные опыты проводили в ГСО ВНИИСХМ в четырех географических районах на делянках с учетной площадью от 1,8 до 24 м² в период с 2003 по 2018 год. Всего выращивали 10 сортов люцерны изменчивой (*M. varia*), полученных методами традиционной и современной селекции, и сорт Мира люцерны хмелевидной (*M. lupulina*). К сортам люцерны изменчивой, полученным традиционным методом селекции, относились Вега 87, Лада, Луговая 67, Пастбищная 88, Селена, Марусинская 425, Сюлинская и Кузбасская, к полученным современным методом сопряженной селекции — Агния и Таисия, а также сортообразец Л10/2. Сорта люцерны Марусинская 425 (оригинатор ОНО «Моршанская селекционная станция») и Кузбасская (оригинатор ФГБУН Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН) получены методом отбора дикорастущих экотипов люцерны, дальнейший отбор проводили по высокой урожайности на плодородной почве; внесены в Государственный реестр селекционных достижений соответственно в 1938 и 1957 году (3). Сорт Сюлинская адаптирован к условиям Центральной Якутии, обладает высокой зимостойкостью, в Государственный реестр не внесен. Сорта интенсивного типа Вега

87, Лада, Луговая 67 созданы для возделывания на агрофонах с внесением высоких доз минеральных удобрений (3, 44). Сорта Пастбищная 88 и Селена получены от скрещивания генотипов люцерны с высокой адаптивной способностью для возделывания на слабокислых и средне окультуренных почвах (3, 44). Эти сорта включены в Государственный реестр в 1998 и 2000 году. Сорта Агния и Таисия созданы с использованием биотехнологии сопряженной симбиотической селекции для возделывания на средне окультуренных и неокультуренных почвах; включены в Государственный реестр соответственно в 2012 и 2015 году (3, 44). Сорт Мира люцерны хмелевидной (*M. lupulina*) создан с применением химического мутагенеза на основе местной дикорастущей люцерны из Московской области (3, 44).

Предпосевную обработку семян проводили методом опудривания или рабочим раствором препарата; посев широкорядный, с шириной междурядий 0,3-0,7 м, на глубину 2-3 см; повторность делянок 3- или 4-кратная; норма высева 2,4 млн семян/га; удобрения не применяли (данные ГСО) (29). Обязательная отчетность по каждому опыту включала значения сухого вещества (СВ; высушивание растений при 105 °С до постоянной массы) и/или зеленой массы растений (ЗМР), полученных по отдельным укосам или суммарные величины укоса травостоя за вегетационный период. Опыты по выращиванию разных сортов люцерны могли существенно различаться по схемам, но, как правило, продолжались не менее 2-3 лет, а число независимых экспериментов могло варьировать от 2 до 6. Величину СВ и/или ЗМР для каждой повторности опыта и контроля без инокуляции, а также среднее и ошибки среднего значения СВ и/или ЗМР рассчитывали, исходя из значений СВ и/или ЗМР, полученных для каждой повторности опыта и для КБИ. Кроме того, по каждому деляночному опыту предоставляли значения НСР₀₅, показывающие достоверность различий между опытом и КБИ (45). При проведении многолетних (5-6-летних) исследований на сортах Агния, Таисия, Селена, Луговая Л110/2, Марусинская 465, Вега 87, Лада и Пастбищная 88 массу растений, ее средние значения, ошибки средних и НСР₀₅ получали отдельно для каждого года.

Статистическая обработка данных. Оценку урожайности сорто-микробных систем, сформированных на основе указанных выше сортов и штаммов клубеньковых бактерий, оценивали по прибавке урожая зеленой (ЗМР) или сухой массы растений (СМР) либо сухого вещества (СВ) в случае деляночных опытов, согласно следующей формуле:

$$ПМ_i = [(MР_i - M_{КБИ})/M_{КБИ}] \times 100 \%,$$

где ПМ_{*i*} — прибавка урожая в *i*-м эксперименте, МР_{*i*} — масса растений в *i*-м эксперименте, М_{КБИ_{*i*}} — масса КБИ в *i*-м эксперименте согласно данным ГСО. Среднюю прибавку урожая (СП) вычисляли по ЗМР и СВ как

$$СП = (\sum ПМ_i/n),$$

где *i* — номер опыта, *n* — число опытов. При расчете СП не учитывали резко выделяющиеся значения прибавок, которые определяли на основании их относительных отклонений (45). Ошибку СП вычисляли по формуле:

$$x = S/\sqrt{n},$$

где *x* — ошибка СП, *S* — стандартное отклонение, рассчитанное для значений ПМ, *n* — число опытов. В том случае, когда имелось только одно значение ПМ (результат одного опыта), то определяли ошибку в 5 %.

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) использовали для оценки достоверности величин прибавок сухой массы растений, получаемых в результате их инокуляции штаммами клубеньковых бактерий, при $\alpha = 0,05$ (46). Двухфакторный дисперсионный анализ (46) проводили для количественной оценки вкладов генотипов растений-хозяев и генотипов

изучаемых штаммов в формирование прибавки урожая, оцениваемого по ЗМР или СВ.

Коэффициент корреляции определяли согласно описанию (47), критерий χ^2 — в программном пакете PAST (48).

Результаты. Оценка симбиотических свойств штаммов в микровегетационных опытах. При изучении симбиоза 141 штамма *S. meliloti* с сортом Вега 87 вида *M. varia* в стандартизированных условиях стерильных микровегетационных опытов мы выявили 36 штаммов, которые формировали высокоэффективный симбиоз с растениями (средний разброс прибавок СМР у инокулированных растений находился в пределах от 77,0 до 157,9 % относительно референса). Наиболее перспективными были признаны шесть штаммов (А1-А6), различавшихся по солеустойчивости (табл. 1). Прибавки по СМР от инокуляции штаммами А2, А4 и А5, имевшими разный фенотип, составили в среднем 317 %, штаммами А3 и А6 (солечувствительный фенотип) — более 180 % по отношению к контролю без инокуляции. Наибольшее значение прибавки установили при использовании штамма А1 солеустойчивого фенотипа — соответственно > 500 и 360 % относительно КБИ и референса (см. табл. 1). Величины прибавок относительно штамма-референса были сходными в случае штамма А6, превышали на 70 % в случае штамма А3 и были более чем в 2 раза выше последней при инокуляции штаммами А2, А4 и А5 (см. табл. 1). В условиях модельного засоления инокуляция испытуемыми штаммами также способствовала увеличению сухой массы растений. Статистически значимые прибавки по отношению к референсу получили только в случае штаммов А2, А4 и А5 (в среднем более 180 %; $p < 0,05$). Исключение составил штамм А1, который формировал высокоэффективный симбиоз в незасоленных условиях, тогда как при засолении оцениваемая прибавка СМР была более чем на 20 % ниже величин, полученных для штаммов А3 и А6, но сходной с таковой для референса (см. табл. 1).

1. Оценка симбиотической активности штаммов *Sinorhizobium meliloti* с люцерной сорта Вега 87 (*Medicago varia* L.) в микровегетационных опытах

Штамм	Ф	Типовые условия				Условия засоления			
		СМР, мг	ошибка СП, мг	СМР, %	ошибка СП, %	СМР, мг	ошибка СП, мг	СМР, %	ошибка СП, %
А1	R	52,5	5,49	508,64	63,71	11,1	1,44	58,4	20,6
А2	S	35,7	2,41	314,23	27,94	17,8	1,41	155,0	20,2
А3	S	28,0	2,87	224,47	33,28	15,2	1,99	118,0	28,5
А4	R	36,0	3,72	317,89	43,17	23,2	1,85	232,7	26,6
А5	S	36,2	3,42	320,19	39,60	20,9	2,66	198,8	38,2
А6	S	21,2	2,50	146,27	28,93	12,6	0,91	81,2	13,1
Rm1021	S	21,2	0,88	146,26	10,26	10,5	0,79	50,4	11,3
КБИ		8,63	0,57	0,00	6,58	6,98	0,46	0,0	6,6
НСР ₀₅		11,76				4,64			

Примечание. Ф — фенотип (R — штаммы устойчивы, S — штаммы чувствительны к NaCl); СМР — сухая масса растений (среднее значение по 10 повторностям); ошибка СП — ошибка среднего значения прибавки; КБИ — контроль без инокуляции; Rm1021 — референсный штамм; НСР — наименьшая существенная разница.

Таким образом, анализ симбиотических свойств шести штаммов, из которых два имели солеустойчивый, а четыре — солечувствительный фенотип, не позволяет сделать вывод о взаимосвязи между собственной солеустойчивостью штаммов и возможностью формировать ими стрессоустойчивые симбиотические системы, что, однако, не противоречит результатам, о которых мы сообщали ранее (38). В то же время анализ величин прибавок СМР, полученных в незасоленных и засоленных условиях, выявил положительную корреляцию: штаммы, инокуляция которыми способствовала значительному повышению урожайности растений в незасо-

ленных условиях, также формировали высокопродуктивные симбиотические системы при засолении (коэффициент корреляции r составил 0,89).

Оценка симбиотических свойств штаммов в деляночных опытах. Симбиотическую эффективность и хозяйскую специфичность указанных штаммов проверяли в симбиозе с 10 сортами люцерны изменчивой (*M. varia*), полученными методами традиционной и современной селекции, а также с люцерной хмелевидной сорта Мира (*M. lupulina*) (табл. 2). В качестве группы сравнения использовали производственные штаммы 425а и 415б. Всего изучили 73 сорто-микробные системы, из которых 32 проверили в 2-6 независимых экспериментах в условиях модельных деляночных опытов в рамках ГСО (см. табл. 2).

2. Районы проведения деляночных опытов с разными сортами люцерны в рамках Географической сети опытов (ГСО ВНИИСХМ)

Опытные поля	Характеристика почв	Сорта люцерны изменчивой (<i>Medicago varia</i> L.)
Брянская область ¹ , Брянская государственная сельскохозяйственная академия (Брянская ГСХА; с 2014 года — Брянский государственный аграрный университет), 2002-2009 годы	Серая лесная легкосуглинистая почва среднеокультуренная (рН 5,7)	Марусинская, Селена, Вега 87, Лада, Луговая 67
Московская область ¹ , Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии имени В.Р. Вильямса (ФНЦ ВИК им. В.Р. Вильямса), 2002-2018 годы	Дерново-подзолистая, средне-суглинистая, слабо окультуренная почва (рН 4,49-5,08), неокulturенная почва	Пастбишная, Агния, Таисия, Селена, Луговая 67 (Л10/2), Мира (люцерна хмелевидная <i>M. lupulina</i> L.)
ФГБНУ Новгородский научно-исследовательский и проектно-технологический институт сельского хозяйства (Новгородский НИПТИСХ) ² , 2005-2009, 2018 годы	Дерново-подзолистая, легкосуглинистая на глине, средне окультуренная почва	Пастбишная, Вега 87, Селена, Лада, Луговая 67
ООО «РосАгро» Волоковского района Ленинградской области ² , 2015 год	Дерново-карбонатные окультуренные почвы (рН 6,5)	Агния, Таисия
Томский государственный педагогический университет (ТГПУ) ³ , 2002-2006 годы	Серая лесная почва	Кузбасская
Приморский НИИ сельского хозяйства (Приморский НИИСХ) ⁴ , 2014 года	Лугово-бурая, тяжелый суглинок	Вега 87
ФГБНУ Якутский НИИ сельского хозяйства им. М.Г. Сафонова (Якутский НИИСХ), ГМУ ⁴ , 2011 год	Тажно-палевые мерзлотные почвы, темновато серые подзолистые среднесуглинистые, на светло-палевом суглинке	Сюлинская

Примечание. ¹ — Центральный, ² — Северо-Западный, ³ — Западно-Сибирский, ⁴ — Дальневосточный районы постановки деляночных опытов по Географической сети опытов (ГСО ВНИИСХМ). Почвенные характеристики, период и условия проведения опытов, сорта люцерны приведены согласно отчетным карточкам ГСО (см. раздел «Методика»).

Так как схемы поставленных опытов различались (контрольные штаммы, число укосов и экспериментов, годы исследований, учитываемые параметры), сравнительный анализ симбиотрофной эффективности сорто-микробных систем, сформированных на основе указанных выше сортов и штаммов ризобий, проводили по показателям прибавок урожая зеленой массы растений (ЗМР) и/или сухого вещества (СВ), средние значения прибавок для которых приведены в таблице 3. Значения прибавок, полученные для однократных 2-3 летних экспериментов, приведены с указанием года учета результатов (см. табл. 3).

Оценка урожайности сорта Сюлинская в симбиозе со штаммом А1 или А2 или с производственным штаммом 425а не выявила достоверных различий ($p > 0,05$) между этими тремя сорто-микробными системами в условиях Дальневосточного географического района (см. табл. 3). В то же время сорт Сюлинская оказался отзывчивым на инокуляцию производственным штаммом 415б, поскольку величина прибавки ЗМР была почти в 2 раза выше, чем в случае вышеуказанных штаммов (см. табл. 3). Интересно, что статистически значимые прибавки ЗМР для симбиотических систем Сюлинская-А2 и Селена-А2, выращиваемых в географически удаленных

регионах (соответственно Дальневосточный и Центральный), были сходными (среднее значение $47,7 \pm 9,4$ %). Инокуляция люцерны сорта Селена штаммом А2 способствовала 4-кратному увеличению СВ растений по сравнению с использованием производственного штамма 425а в условиях Центрального региона, тогда как системы, образуемые сортом Селена со штаммами А2 или А3 либо с производственными штаммами 425а или с 415б, достоверно не различались по величинам прибавок ЗМР в условиях Северо-Западного географического района ($p > 0,05$). Урожайность по СВ для системы Селена-А2 была достоверно выше, чем для системы Пастбищная 88-А2 (более чем в 2 раза) в условиях Центрального региона (см. табл. 3).

3. Симбиотрофные показатели сорто-микробных систем, сформированных штаммами *Sinorhizobium meliloti* с разными сортами люцерны изменчивой (*Medicago varia* L.) в делянчных опытах (ГСО ВНИИСХМ)

Сорт люцерны	У	Прибавка урожая растений люцерны, инокулированных штаммами клубеньковых бактерий (к КБИ, %)							
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	425а	415б
Центральный географический район									
Агния	1	132,1 ³	163,7 ³	нд	нд	нд	45,0 ³	11,4 ³	33,0 ²
	2	50,5±7,6	43,5±10,5	134,9 ⁴	198,9 ⁴	нд	нд	35,8 ⁴	нд
Таисия	1	нд	95,6±0,5	102±10,1	79,3±0,8	99,1±0,9	45,7±0,3	нд	82,3±0,7
	2	нд	62,5±11,4	нд	нд	нд	нд	36±1,8	33,0±1,6
Пастбищная 88	1	нд	нд	нд	нд	10,3 ⁹	нд	нд	17,1 ⁹
	2	нд	51,7±2,5	нд	нд	нд	нд	нд	нд
Селена	1	нд	47,4±16,3	нд	нд	нд	нд	нд	нд
	2	нд	115,2±5,8	нд	нд	нд	нд	26,3 ¹	нд
Вега 87	1	нд	31,7 ³	нд	нд	нд	нд	нд	нд
Лада	1	нд	36,7 ³	нд	нд	нд	нд	нд	нд
Луговая 67	1	нд	6,0 ³	нд	нд	нд	нд	нд	нд
Луговая 67 (Л110/2)	1	170,3±20,5	136±14,3	149±2,6	171 ⁷	80,1 ⁸	нд	нд	65,4±3,3
	2	78,6 ⁸	40,2 ⁸	80,1 ⁸	73,5 ⁸	нд	нд	нд	нд
Марусинская 425	1	133,8 ⁸	51,0 ⁸	148,1 ⁸	нд	нд	нд	нд	50,8 ⁸
	2	9,9±1,6	17,0±3,9	17,8±1,2	21,4±0,9	31,7 ⁴	нд	24,0±4,6	нд
Мира	2	27,9 ⁴	95,7±4,8	нд	нд	нд	нд	нд	нд
Северо-Западный географический район									
Агния	1	нд	нд	нд	нд	нд	163,4 ¹⁰	нд	18,3 ¹⁰
	2	нд	нд	17,2±7,4	61,8±11,9	149,3±27,4	143,5±20,1	9,8±0,5	22,9±5,0
Таисия	1	нд	нд	нд	нд	нд	176,6 ¹⁰	нд	14,1 ¹⁰
	2	нд	нд	нд	29,6 ⁸	нд	98,0±7,3	нд	15,0 ¹⁰
Пастбищная 88	1	84,3±4,2	63,0±11,2	нд	нд	нд	нд	17,1±5,9	52,0 ¹¹
	2	нд	8,0 ³	нд	нд	нд	нд	39,2 ⁵	нд
Селена	1	нд	7,4 ³	нд	нд	нд	нд	22,2 ³	нд
	2	нд	63,7 ³	61,8 ¹³	25,9 ¹³	нд	нд	59,6 ³	50,5 ¹³
Вега 87	1	нд	63,3 ³	нд	нд	нд	нд	58,3 ³	нд
	2	120,1±6,0	81,3±18,3	44,3 ¹³	нд	нд	нд	4,0 ³	25,5 ¹³
Лада	1	нд	6,4 ⁵	нд	нд	нд	нд	нд	133 ¹¹
	2	нд	31,9 ³	нд	нд	нд	нд	5,8 ³	нд
Луговая 67	1	нд	45,4±8,7	нд	нд	нд	нд	27,3 ⁵	нд
	2	нд	37,3 ³	нд	нд	нд	нд	нд	нд
Мира	1	нд	5,9 ³	нд	нд	нд	нд	12,6 ³	нд
	2	нд	6,4 ³	нд	нд	нд	нд	20,5 ³	нд
Мира	1	нд	77±3,9	нд	нд	нд	нд	нд	63±3,2
Западно-Сибирский географический район									
Кузбасская	1	нд	14,5 ²	нд	нд	нд	нд	17,3 ± 0,3	нд
Дальневосточный географический район									
Столинская	1	42,3 ⁹	48,5 ⁹	нд	нд	нд	нд	38,1 ⁹	73,2 ⁹
Вега 87	1	15,3 ⁶	нд	нд	18,3 ⁶	нд	нд	12,2 ⁶	нд

Примечание. Сорт Мира — люцерна хмелевидная (*Medicago lupulina* L.). У — урожайность: 1 — зеленая масса растений (ЗМР), 2 — сухое вещество (СВ). В таблице приведены средние значения прибавок и ошибок средних значений прибавок массы растений, рассчитанных относительно контроля без инокуляции (КБИ) и выраженные в процентах (см. раздел «Методика»). Годы исследований: ¹ — 2003, ² — 2006, ³ — 2007, ⁴ — 2008, ⁵ — 2009, ⁶ — 2011, ⁷ — 2012, ⁸ — 2013, ⁹ — 2014, ¹⁰ — 2015, ¹¹ — 2016, ¹² — 2017, ¹³ — 2018; нд — нет данных.

Высокие значения прибавок (по ЗМР) на сорте Пастбищная 88 по-

лучили при использовании штаммов А1 или А2 в условиях другого географического района — Северо-Западного (среднее значение $70,4 \pm 8,3$ %), что более чем в 3 раза превышало средние значения прибавок при применении производственного штамма 425а ($p < 0,05$; см. табл. 3). При этом прибавки по ЗМР, полученные для систем Селена-А2 и Селена-А3, были сходными с величиной прибавки, установленной для системы Пастбищная 88-А2, но более чем в 3 раза выше, чем для системы Пастбищная 88-425а. Следует отметить хорошую отзывчивость сорта Пастбищная 88 на инокуляцию штаммом 4156 (прибавки по ЗМР), тогда как прибавки от инокуляции штаммом 425а могли значительно различаться по годам исследований (2009 год, см. табл. 3) в условиях Северо-Западного региона. Согласно полученным данным, симбиотическая система Селена-А2 может быть рекомендована для выращивания в двух районах Центрального и Северо-Западного регионов как высокоэффективная и обладающая широким адаптивным потенциалом, а системы Селена-А3, Пастбищная 88-А1/А2 — для условий Северо-Западного региона. Также для последнего географического района может представлять интерес инокуляция сортов Селена и Пастбищная 88 производственным штаммом 4156 или 425а, но ожидаемые прибавки урожая, вероятно, окажутся существенно ниже (см. табл. 3).

Сорт Марусинская 425 изучали в симбиозе с пятью испытываемыми штаммами, сорт Кузбасская — с А2, также оба сорта оценивали в симбиозе с производственным штаммом 425а. Прибавки для указанных симбиотических систем на основе сорта Кузбасская со штаммом А2 или с производственным штаммом 425а (усредненные значения прибавок соответственно 14,5 и 17,3 %, см. табл. 3), как и для сорта Марусинская 425 в симбиозе со штаммом А2 или А3 (среднее значение $17,9 \pm 2,7$ %), достоверно не различались. Незначительно большие прибавки регистрировали в случае инокуляции того же сорта штаммом А4 или производственным штаммом 425а (см. табл. 3). Следует отметить крайне низкую отзывчивость сорта Марусинская 425 на инокуляцию штаммом А1, вместе с тем размер прибавки мог существенно варьировать по годам исследований (2008 год, см. табл. 3). Наиболее высокие значения прибавок получены для системы Марусинская 425-А5 (прибавки по ЗМР выше в 1,3 раза, чем для штамма 425а) (см. табл. 3).

Сорт Вега 87 преимущественно испытывали в Северо-Западном регионе со штаммами А1, А2, А3 и с обоими производственными штаммами, тогда как в Центральном — только в симбиозе с А2. Урожайность системы Вега 87-А2, оцениваемая по ЗМР, была в 2,5 раз выше в Северо-Западном регионе, чем в Центральном, при этом следует отметить нестабильность величины прибавок по годам исследований (2009 год, см. табл. 3). Более высокие показатели урожайности получены для системы Вега 87-А1 (прибавка ЗМР $120,1 \pm 6,0$ %) и почти в 2 раза более низкие — для системы Вега 87-А3 в том же географическом районе (см. табл. 3). Вместе с тем инокуляция сорта Вега 87 производственным штаммом 425а не приводила к статистически значимым прибавкам ($4,0 \pm 0,2$ %; см. табл. 3), тогда как использование производственного штамма 4156 позволяло получать среднюю прибавку 25,5 %, величина последней также могла возрастать в несколько раз в условиях Северо-Западного региона в зависимости от года исследований (2016 год, см. табл. 3). Системы Вега-87-А1 и Вега 87-А2 следует рассматривать как высокоурожайные для Северо-Западного региона.

Урожайность сорта Лада от инокуляции штаммом А2 в условиях Центрального, а также Северо-Западного регионов была сходной (среднее значение $42,5 \pm 2,2$ %; см. табл. 3). Инокуляция растений сорта Луговая 67 сопровождалась формированием эффективной симбиотической системы

только в случае использования производственного штамма 425а (прибавка по СВ составила 20,5 %) в условиях Северо-Западного региона (см. табл. 3). Следовательно, систему Лада-А2 можно рассматривать как эффективную и обладающую широкой адаптивностью, тогда как система Луговая 67-425а дает статистически значимые, но невысокие прибавки при выращивании в Северо-Западном регионе.

Таким образом, использование производственного штамма 425а позволяет получать прибавки урожая (по ЗМР), варьирующие от 4 до 27,3 % на сортах Вега 87, Кузбасская, Лада, Луговая 67, Марусинская 425 и Пастбищная 88. Значимые прибавки на сортах Вега 87 и Пастбищная 88 могут быть получены при инокуляции производственным штаммом 415б. Статистически значимые прибавки на сорте Селена (не менее 50 %) ожидаемы при инокуляции любым из двух упомянутых штаммов, тогда как отзывчивость сорта Сюлинская на инокуляцию штаммом 415б была в 2 раза выше (более 70 %). Испытуемые высокоэффективные штаммы позволяли получать прибавки по ЗМР от 40 до 80 % на 5 из 8 сортов, полученных традиционными методами селекции, при этом в случае сортов Пастбищная 88 и Селена создаваемые сорто-микробные системы обладали высоким адаптивным потенциалом.

Особенно следует отметить тот факт, что штамм А1, отобранный по данным микровегетационных опытов на сорте Вега 87 как суперэффективный, способствовал получению наиболее высоких показателей урожайности этого сорта и в полевых опытах. Штаммы А1 и А2 также испытывали в симбиозе с сортом Мира люцерны хмелевидной. Урожайность соответствующих сорто-микробных систем не уступала и даже превышала по величине прибавку, полученную при использовании производственного штамма 415б. Штаммы А1 и А2 можно рассматривать как перспективные для использования в качестве микробного препарата под посевы люцерны хмелевидной сорта Мира как сидерата на слабокислых почвах.

Таким образом, представленные результаты по симбиотической активности штаммов с сортами люцерны, полученными традиционными методами селекции, однозначно свидетельствуют о необходимости селекционного подбора высокоэффективных штаммов в модельных лабораторных условиях и важности оценки генетической комплементарности микро- и макросимбионтов в создаваемых сорто-микробных системах.

Агния и Таисия — сорта нового поколения, при создании которых учитывались симбиотрофные показатели. Урожайность сорта Агния оценивали со штаммом А1, который использовали в процессе создания сорта, а также со штаммами А2-А6 в деляночных опытах в Центральном и Северо-Западном регионах. Необходимо отметить высокую отзывчивость сорта Агния на инокуляцию штаммами А1-А4 (средняя прибавка по СВ 153,9 %; см. табл. 3) и сорта Таисия — штаммами А2-А5 в условиях Центрального региона, тогда как симбиотрофные показатели для этих же сортов при их инокуляции штаммом А6 были либо сопоставимы, либо ниже таковых при использовании штамма 415б (см. табл. 3). Сорт Агния районирован в Центральном регионе и при выращивании в другом районе показатели урожайности могут отличаться. В условиях Северо-Западного региона высокие прибавки по СВ были получены при инокуляции растений сорта Агния штаммами А5 или А6 (среднее значение 146,1 %), а также штаммом А4 (более 60 %; см. табл. 3), тогда как высокоэффективный симбиоз с сортом Таисия формировал штамм А6 (прибавки по ЗМР и СВ соответственно 176,6 и 98,0 %). Следует отметить, что урожайность (по СВ) сорта Агния и Таисия могла возрасти в 2,5-4 раза в некоторые годы исследо-

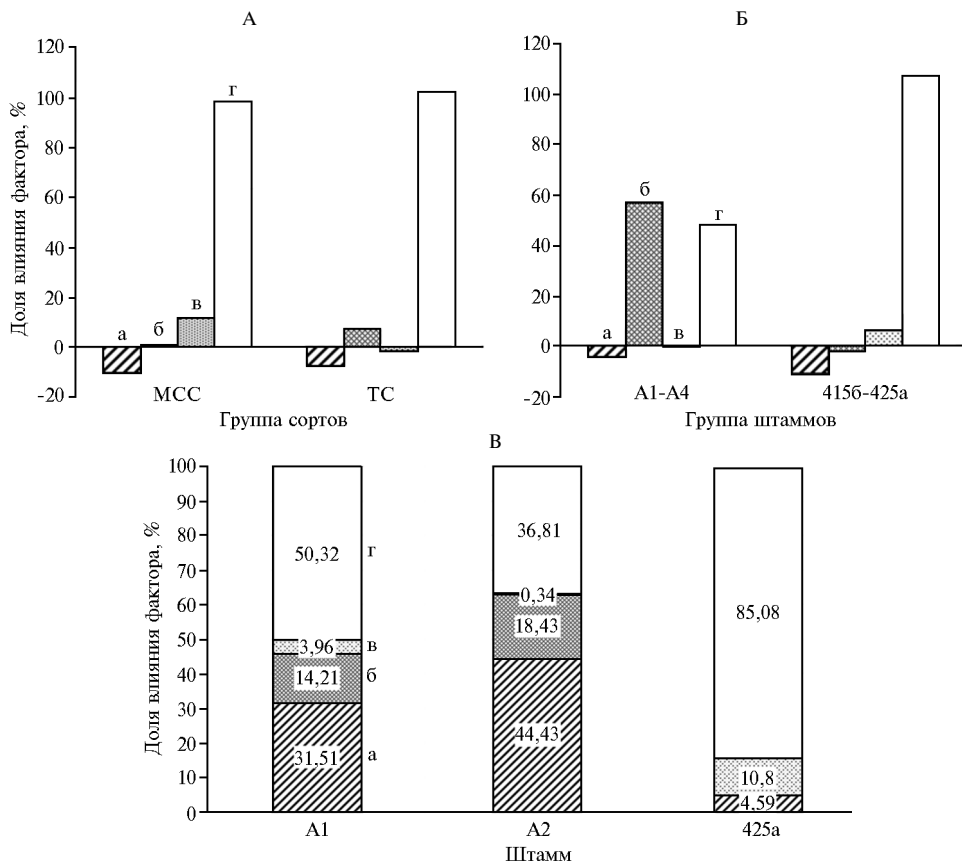
ваний в Центральном (2008, 2014 годы) и в 1,5-2 раза в Северо-Западном регионе (2012, 2015 годы; см. табл. 3).

Сходно высокие прибавки получены в опытах с новым сортообразцом Л10/2 (Г.В. Степанова, персональные данные), который инокулировали штаммами А1-А5. Показатели урожайности по ЗМР для штаммов А1-А4 были сходными и составили в среднем $154,3 \pm 9,0$ %, что 2-кратно превышало прибавки, полученные при использовании штамма 4156. В случае штамма А2 значение прибавки было в 7 и 23 раза выше (в зависимости от года исследования; см. табл. 3), чем величина прибавки, полученная при инокуляции исходного сорта Луговая 67.

Таким образом, инокуляция сорта Агния производственными штаммами 425а или 4156 или сорта Таисия последним из указанных штаммов не позволяла получать значения прибавок по СВ соответственно более 10 % и 23 % в Северо-Западном и в среднем 35 % — в Центральном регионе, но в некоторые годы величины прибавок также могли возрастать соответственно в 4,0 и 2,6 раза (2014 год, см. табл. 3). В случае инокуляции сорта Агния или сортообразца Л10/2 штаммами А1-А4 величина прибавок варьировала от 130 до почти 200 % по годам исследований (по СВ и по ЗМР), на сорте Таисия прибавки составили от 79 до 102 % при инокуляции штаммами А2-А5 в Центральном регионе. Выявлено два штамма — А6 и А3, которые формировали высокоэффективные системы с сортом Агния или Таисия только в одном из двух географических районов исследования: штамм А3 — в Центральном, А6 — в Северо-Западном. Высокая урожайность системы Агния-А6 подтвердилась в производственном опыте на делянках площадью 0,1 га (ООО «РосАгро», Волосовский р-н, Ленинградская обл.) (54). Прибавка урожайности по ЗМР в этом опыте, как определено в указанной работе, составила $163,4 \pm 8,7$ % (см. табл. 3). А4 и А5 (в отличие от указанных выше штаммов) формировали высокоэффективные системы с обоими сортами в обоих районах исследования. Полученные результаты показывают, что сорта, созданные на основе сопряженной селекции, имеют высокую отзывчивость на инокуляцию, что позволяет в 2-3 раза поднять урожайность, вместе с тем для них характерна высокая специфичность растительно-микробного взаимодействия.

Двухфакторный дисперсионный анализ данных деляночных опытов. Цель анализа заключалась в определении роли факторов варьирования (вкладов) со стороны растительно-микробных систем (макро- и микросимбионты, их сочетания) и неконтролируемых факторов в формирование урожая. Анализ величин прибавок для сортов, полученных методами традиционной селекции (сорта ТС — Пастбищная 88, Сюлинская, Вега 87, Марусинская 425) и методом сопряженной селекции (МСС — сорта Агния, Таисия, сортообразец Л10/2), которые формировали симбиозы с изучаемыми высокоэффективными штаммами, позволил показать, что в случае сортов МСС наибольшее влияние на формируемые с ними симбиотические системы оказывали штаммы бактерий-микросимбионтов (значение вклада составило 11,58 %), тогда как с сортами ТС, наоборот, больший вклад был обусловлен генетическими характеристиками растений этих сортов люцерны (6,99 %; рис., А). Неконтролируемые факторы в указанных случаях оказывали сходное влияние на сорто-микробные системы, сформированные на основе сортов МСС или ТС. Оценка вклада штаммов показала, что высокоэффективные природные штаммы А1-А4 активно формировали симбиоз на изученных сортах люцерны (вклад 56,6 %), а в случае производственных штаммов 425а и 4156 определенную роль (6 %) в формировании симбиотических систем с рассматри-

ваемыми сортами растений играли их геномные характеристики (см. рис., Б). Установлено, что симбиотические системы на основе высокоэффективных штаммов А1-А4 были менее подвержены воздействию со стороны неконтролируемых факторов, чем симбиотические системы, сформированные производственными штаммами 425а и 415б (соответственно 47,8 и 107,2 %; см. рис., Б).



Двухфакторный анализ урожайности сорто-микробных систем на основе сортов люцерны, полученных методами традиционной и симбиотической селекции, с высокоэффективными штаммами клубеньковых бактерий *Sinorhizobium meliloti*: А — вклады сортов, полученных методами традиционной селекции и методом сопряженной селекции, в симбиозе с изучаемыми высокоэффективными штаммами; Б — вклады природных и производственных штаммов в формирование прибавки урожая у изучаемых сортов люцерны изменчивой; В — вклады штаммов А1, А2 и 425а в формирование прибавки урожая у изучаемых сортов люцерны изменчивой; а — комбинация сорт-штамм (с-ш), б — сорта растений (с), в — штамм (ш), г — неконтролируемые факторы (нф). MCC — сорта люцерны, полученные методом сопряженной селекции (Агния, Таисия, сортообразец Л110/2); TC — сорта люцерны, полученные методами традиционной селекции (Пастбищная 88, Сюлинская, Вега 87, Марусинская 425); А1, А2 и 425а — высокоэффективные штаммы *S. meliloti*.

Этот же метод анализа мы использовали для оценки факторов варьирования в формирование прибавки урожая сорто-микробных систем на основе штаммов А1, А2 и 425а и сортов TC (Пастбищная 88, Сюлинская, Вега 87, Марусинская 425) и MCC. Это позволило показать, что в случаях сорто-микробных систем, сформированных штаммом А1 или А2, существенный вклад принадлежал сочетаниям сорта растения-хозяина и штамма-микросимбионта (31,5 и 44,4 % по урожайности). Вклад генотипических характеристик сорта растения-хозяина в формирование урожайности для этих систем варьировал соответственно от 14,2 до 18,4 % (см. рис., В).

Следует отметить, что генотипические характеристики штамма А1 влияли на урожайность симбиотической системы (вклад 3,96 %). Анализ сорто-микробной системы на основе штамма 425а, наоборот, показал, что неконтролируемые факторы — основные по влиянию на урожайность формируемых этим штаммом симбиотических систем. Генотипические характеристики штамма 425а (вклад 10,80 %) и его взаимодействие с растением-хозяином (вклад 4,59 %) определяли не более 16 % прибавки урожая.

Таким образом, нами впервые выявлено, что генотипические характеристики штамма 425а более значимо воздействуют на формирование симбиотических систем, тогда как его хозяйская специфичность по отношению к тому или иному сорту не очевидна. Обнаруженным фактом может объясняться успешность широкого применения биопрепаратов на основе этого штамма в России в различных агроценозах. В то же время использование высокоэффективных штаммов (А1-А6) — симбионтов растений люцерны, адаптированных к стрессовым условиям Приаралья, в процессе создания сортов Агния, Таисия и Л10/2 сопряженным методом селекции показало, что такие сорта обладают повышенной отзывчивостью на инокуляцию штаммами клубеньковых бактерий. Дальнейший подбор комплементарных генотипов позволяет повысить урожайность не менее чем на 50 % и создавать новые сорто-микробные системы с большей устойчивостью к абиотическим неконтролируемым факторам, что определяет возможность их выращивания в различных агроклиматических условиях.

Поскольку при выполнении работы нами была обнаружена высокая симбиотическая комплементарность штаммов А1 и А2 к сорту Агния, созданному для выращивания на средне окультуренных и неокультуренных почвах, и выявлена значимость генотипических характеристик штамма 425а, то изучение геномных характеристик этих высокоэффективных штаммов стало актуальным.

Молекулярно-генетический анализ штаммов. Мы провели сравнительный анализ геномов высокоэффективных штаммов А1, А2 и 425а с использованием ДНК-биочипа SM6kOligo, сконструированного на основе генома референсного штамма Rm1021 (49). Установлено, что в геноме проанализированного штамма СХМ1 (49) — стрептомицинустойчивого мутанта штамма 425а отсутствуют 508 ОРС (открытые рамки считывания), а у штаммов А1 и А2 — соответственно 601 и 432 ОРС, однако их последовательности могут присутствовать, но иметь значительные структурные изменения. Указанные ОРС (функционально значащие последовательности или гены), как установлено, локализованы как на хромосоме, так и на двух мегаплазидах, наличие которых характерно для этого вида ризобий. Был проведен анализ 72 ОРС, активность которых важна для формирования и функционирования симбиоза. Указанная группа ОРС включала 17 *nod* генов, описанных на симбиотической мегаплазмиде (SMa) референсного штамма, которые детерминируют или вовлечены в контроль процессов вирулентности, конкурентоспособности, клубенькообразования и хозяйской специфичности, а также гены *fix* и *nif* (соответственно 31 и 8), детерминирующих процесс азотфиксации и его эффективность. Установлено, что все указанные *nod* гены присутствуют в геноме СХМ1, тогда как в геноме штамма А1 последовательности генов *nodD3* и *nodN*, по-видимому, несут значительные структурные изменения (дивергентные гены). Анализ *fix* генов показал, что в геноме СХМ1 может отсутствовать три гена (*fixL*, *fixT2* и *fixM*), а в геномах штаммов А1 и А2 — соответственно четыре (*fixO3*, *fixT2*, *fixP2*, *fix*) и шесть генов (*fixO3*, *fixL*, *fixN3*, *fixP3*, *fixI2*, *fixH*). Также значительные структурные изменения выявлены в двух *nif*

генах штамма A1 (*nifD* и *nifN*). Анализ группы из шести *nod* генов, локализованных у референсного штамма на мегаплазмиде II, выявил у всех трех проанализированных штаммов структурные изменения в двух генах, расположенных на второй мегаплазмиде SMb (SMb20775 и SMb20825), продукты которых — это сигнальный рецептор клубенькообразования (предполагаемая ацетилтрансфераза NodL семейства; расположен на внешней мембране клетки). Гибридизационный анализ последовательностей шести локализованных на хромосомах проанализированных штаммов генов (трех *nod*, двух *fix* и одного *nif* гена), активность которых важна для формирования и функционирования симбиоза, показал их консервативность и присутствие в геномах всех штаммов.

Помимо генов, имеющих непосредственное отношение к симбиозу, были проанализированы 23 гена, имеющие отношение к солеустойчивости штаммов. Рассматривали 6 групп: *kup*, *kdp*, *trk* и *kef*, которые ответственны за внутриклеточную концентрацию катионов калия, *ots/tre* (кодируют систему накопления трегалозы) и *bet* гены (кодируют системы накопления, биосинтеза и катализа бетаинов). Установлено, что четыре группы проанализированных генов консервативно присутствовали в геномах всех изученных штаммов, вместе с тем значительные структурные изменения, имеющие функциональное значение, выявлены для штаммов СХМ1 и А1 по группам *bet* и *trk*, у СХМ1 отсутствовал (или изменен) ген *betB2*, а у штамма А1 — ген *trkD*. Следовательно, гены из рассмотренных групп, имеющие измененные структурные последовательности (или дивергентные гены) наиболее часто встречаются у штаммов, адаптированных к условиям засоления, в которых они формируют симбиоз с растениями люцерны.

Был проведен анализ штаммов А1 и А2 и 425а на наличие дополнительных элементов генома, или геномных островов (ГО), которые имеют фаговое происхождения и участвуют в процессе горизонтального переноса генов (49). Анализ контигов, полученных для штаммов А1 и А2 и 425а, позволил выявить шесть ГО, наличие которых в геномах исследуемых штаммов было подтверждено с использованием метода ПЦР детекции (см. раздел «Методика»). Установлено, что в отличие от референсного штамма, у которого три ГО, у высокоэффективных штаммов методом ПЦР детекции (см. раздел «Методика») выявили три, два и один ГО. Длины островов у референсного штамма варьировали 19 до 80 т.п.н, тогда как у высокоэффективных штаммов — от 10,6 до 44 т.п.н. Анализ нуклеотидных последовательностей островов по данным секвенирования показал, что один из островов (10,6 т.п.н.) штамма А2 имел гомологию с ГО Sme80S (80 т.п.н.) референсного штамма, а также с островом размером 10 т.п.н. у 425а (82 % гомологии). Вторым островом штамма А2 размером 44 т.п.н. имел последовательности, гомологичные ГО (27 т.п.н.) штамма А1 (85 % гомологии), тогда как два других ГО того же штамма не имели гомологичных последовательностей как между собой, так и с третьим островом этого же штамма. Представленные данные указывают на то, что ГО, выявленные у высокоэффективных штаммов, содержат разную генетическую информацию, а также подтверждают факт участия ГО в горизонтальном переносе генов и передаче штаммам-реципиентам новой генетической информации.

Следовательно, данные молекулярно-генетического анализа, принятого нами для сравнения геномов высокоэффективных штаммов А1, А2 и производственного штамма 425а, уже на первых этапах исследования свидетельствуют в пользу того, что их пулы генов, важных для формирования стрессоустойчивых симбиотических систем, имеют существенные структурно-функциональные различия.

В заключение подчеркнем, что нами впервые проведен сравнительный анализ высокоэффективных штаммов из района Приаралья, подверженного засолению, и производственных штаммов 425а и 415б, которые используют для приготовления биопрепарата Ризоторфин по симбиотической эффективности и геномным характеристикам. Впервые показано, что высокоэффективные штаммы, отобранные по симбиотрофным показателям в микровегетационных лабораторных опытах, активно формируют симбиотические системы с сортами люцерны, полученными методами традиционной и современной сопряженной селекции. В то же время сорто-микробные системы на основе современных сортов обладают повышенной адаптивностью и урожайностью (прибавки выше более чем на 50 % по сравнению с сортами традиционной селекции). Впервые получены данные, показывающие, что урожайность сорто-микробных систем, сформированных производственным штаммом 425а, зависит преимущественно от внешних неконтролируемых факторов (больше 80 %). Вместе с тем геномные характеристики этого штамма играют более существенную роль, чем сорто-штаммовые сочетания в варьировании прибавки урожая, что, по-видимому, обуславливает востребованность биопрепаратов на основе этого штамма для разных сортов растений в различных географических районах России.

Итак, урожайность растительно-микробных систем на основе сортов, полученных с учетом симбиотрофных показателей, и высокоэффективных штаммов клубеньковых бактерий, адаптированных к условиям засоления, достоверно превышала по показателям зеленой массы растений и сухого вещества аналогичные показатели для «случайно» сформированных симбиотических системы на основе производственных штаммов 425а и 415б. Сорта современной селекции обладают повышенной отзывчивостью на инокуляцию штаммами клубеньковых бактерий, а дальнейший подбор комплементарных генотипов будет способствовать существенному повышению урожая и созданию новых сорто-микробных систем с повышенной устойчивостью к абиотическим стрессовым факторам, что расширит возможность их выращивания в различных агроклиматических условиях. Представленные результаты оценки прибавок урожайности, полученных в результате деляночных опытов, проводимых в течение многих лет в регионах России, различающихся по природно-климатическим условиям, впервые наглядно доказывают необходимость широкого внедрения метода сопряженной симбиотической селекции для создания новых сортов люцерны.

¹ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: mroumiantseva@yandex.ru ✉, mariacherkasova@mail.ru,
allasaksaganskaya@mail.ru, vucovar@yandex.ru, kojemyakov@rambler.ru,
genet@vandex.ru;

*Поступила в редакцию
5 октября 2019 года*

*²ФГБНУ ФНЦ кормопроизводства и агроэкологии
им. В.Р. Вильямса,*
141055 Россия, Московская обл., г. Лобня, Научный городок, корп. 1,
e-mail: evstev@vandex.ru;

³ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный аграрный университет,
196601 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, Петербургское ш., 2,
e-mail: yanevich-2@mail.ru;

*⁴Philipps-University, Marburg, SYNMIKRO,
Center for Synthetic Microbiology,*
35043 Germany, Marburg, Hans-Meerwein Str. 6,
e-mail: anke.becker@synmikro.uni-marburg.de

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2019, V. 54, № 6, pp. 1306-1323

HIGHLY EFFECTIVE ROOT NODULE INOCULANTS OF ALFALFA

(Medicago varia L.): MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS AND PRACTICAL USAGE IN CULTIVAR CREATION

M.L. Roumiantseva¹, M.E. Vladimirova¹, V.S. Muntyan¹, G.V. Stepanova²,
A.S. Saksaganskaya¹, A.P. Kozhemyakov¹, A.G. Orlova³, A. Becker⁴, B.V. Simarov¹

¹All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg—Pushkin, 196608 Russia, e-mail mroumiantseva@yandex.ru (✉c corresponding author), mariiacherkasova@mail.ru, allasaksaganskaya@mail.ru, vucovar@yandex.ru, kojemyakov@rambler.ru, genet@yandex.ru;

²Williams Federal Research Center for Fodder Production and Agroecology, 1, Nauchnii Gorodok, Lobnya, Moscow Province, 141055 Russia, e-mail gvstep@yandex.ru;

³Saint Petersburg State Agrarian University, 2, Peterburgskoe sh., St. Petersburg—Pushkin, 196601 Russia, e-mail yanevich-2@mail.ru;

⁴Philipps-University, Marburg, SYNMIKRO, Center for Synthetic Microbiology, 35043 Germany, Marburg, Hans-Meerwein Str. 6, e-mail anke.becker@synmikro.uni-marburg.de

ORCID:

Roumiantseva M.L. orcid.org/0000-0001-5582-6473

Vladimirova (Cherkasova) M.E. orcid.org/0000-0003-1873-9674

Muntyan V.S. orcid.org/0000-0002-1979-0853

Stepanova G.V. orcid.org/0000-0001-9721-1207

Saksaganskaya A.S. orcid.org/0000-0002-8547-4904

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 14.607.21.0178, RFMEFI60717X0178)

Received October 5, 2019

Kozhemyakov A.P. orcid.org/0000-0002-9657-2454

Orlova A.G. orcid.org/0000-0002-2211-5824

Becker A. orcid.org/0000-0003-4561-9184

Simarov B.V. orcid.org/0000-0002-6893-557X

doi: 10.15389/agrobiologia.2019.6.1306eng

Abstract

In grass stands of perennial fodder legumes, alfalfa is a preferred leguminous plant for the creation of cultivated pastures and restoration of degraded soils. *Medicago sativa* L. nothosubsp. *Varia* (Martyn) Arcang is a high-yielding crop and resistant to adverse cultivation conditions, which is important for risky farming zones in Russia. Alfalfa productivity largely depends on the success of the formation of a plant-microbial symbiotic system with root nodule bacteria (rhizobia), which becomes able to fix atmospheric nitrogen. Modern symbiogenetics has shown that the effectiveness of symbiotic systems depends on the complementary interaction of the plant and microsymbiont genomes. Proceeding from this, the biological products that are used to treat legume seeds should also contain selected rhizobia strains with corresponding genotypic characteristics. In the present work, a comparative analysis of the yield of 73 variety-strain combinations, including *Sinorhizobium meliloti* represented by isolates from salt affected areas and by two strains (425a and 415b) of commercial importance, with alfalfa varieties obtained by classical and symbiotically depended plant breeding approaches was performed. The prospects of selecting highly effective strains those complementary to economically valuable varieties of alfalfa in model experiments have been shown. The strains A1 and A2 were found to be symbiotically more active with tested alfalfa varieties than strains of commercial importance. It has been evaluated that cultivar-strain combinations based on cultivars obtained by a symbiotically depended plant breeding approach are characterized by increased adaptability, and their potential to increase yield significantly exceeds 50 %. It was revealed that yields of variety-strain combinations formed by strain 425a are under the influence of uncontrolled factors according to two-factor analysis of variance. A high complementarity of strains A1 and A2 to the *Agnia* variety, and the functional significance of the genetic characteristics of strain 425a, led us to study their genomic characteristics. A comparative analysis of genomes done by using DNA biochips approach revealed significant differences between symbiotically highly effective strains. It was established that genes related to symbiotic activity and stress tolerance of rhizobia had a divergent structure mainly in strains recovered from salinized soils. The data of the first stages of the molecular genetic analysis of highly effective strains strongly indicate the need to continue research that will allow targeted selection of microsymbiont strains for modern varieties of alfalfa. Data produced through the research of a number of variety-strain combinations grown in various climatic conditions of the Russian Federation clearly demonstrate the need for the widespread introduction of a symbiotically depended plant breeding approach in order to create new economically valuable varieties of legumes needed to form a sustainable forage base for farmers.

Keywords: *Medicago varia*, *Sinorhizobium meliloti*, alfalfa varieties, plant breeding approaches, symbiotic genes and stress tolerance genes, DNA biochip SM6kOligo, genomic islands, symbiotically effective variety-strain combinations, sustainable forage base.

REFERENCES

1. Ivanov A.I. *Lytserna* [Alfalfa]. Moscow, 1980 (in Russ.).

2. Dubovskii I.I. *Agroenergeticheskaya otsenka kul'tur i osnovnye napravleniya sovershenstvovaniya polevogo kormoproizvodstva v stepnykh raionakh Tsentral'no-Chernozemnoi polosy. Avtoreferat kandidatskoi dissertatsii* [Agro-energy crop assessment and the main directions for improving field feed production in the steppe regions of the Central Black Earth Strip. PhD Thesis]. Moscow, 2000 (in Russ.).
3. *Gosudarstvennyi reestr selektsionnykh dostizhenii, dopushchennykh k ispol'zovaniyu. Tom 1. Sorta rastenii (ofitsial'noe izdanie)* [The state register of selection achievements allowed for use. Vol. 1. Varieties of plants (official publication)]. Moscow, 2019 (in Russ.).
4. Shamsutdinov Z.Sh. Forage crops selection: progress and challenges. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* [Agricultural Biology], 2014, 6: 36-45 (doi: 10.15389/agrobiology.2014/6/36eng).
5. Bzheumykhov V.S., Kobozev I.V., Tokbaev M.M. *Izvestiya Timiryazevskoi sel'skokhozyaistvennoi akademii*, 2007, 2: 28-37 (in Russ.).
6. Provorov N.A., Simarov B.V. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* [Agricultural Biology], 1986, 12: 37-42.
7. Fotev Yu.V., Sidorova K.K., Novikova T.I., Belousova V.P. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii*, 2016, 20(3) 348-354 (doi: 10.18699/VJ16.099) (in Russ.).
8. Shkarupa M.V. *Sbornik materialov X Vserossiiskoi konferentsii molodykh uchenykh i spetsialistov «Aktual'nye voprosy biologii, selektsii, tekhnologii vozdeystviya i pererabotki maslichnykh i drugikh tekhnicheskikh kul'tur»* [Proc. X All-Russian Conference of Young Scientists and Specialists «Actual issues of biology, breeding, technology for the cultivation and processing of oilseeds and other industrial crops»]. Krasnodar, 2019: 231-235 (in Russ.).
9. Ddelić D., Stajković-Srbinović O., Radović J., Kuzmanović D., Rasulić N., Simić A., Knežević Vukčević E. Differences in symbiotic N₂ fixation of alfalfa, *Medicago sativa* L. cultivars and *Sinorhizobium* spp. strains in field conditions. *Romanian Biotechnological Letters*, 2013, 18(6): 8743-8750.
10. Shamseldin A., Youseif S.H., Abd El-Megeed F.H., Abdelkhalek A., Sadowsky M.J., Saleh S.A. Selection and use of effective, competitive, clover-nodulating rhizobium strains for use as commercial inoculants in alkaline and salt affected egyptian soils. *Asian Academic Research Journal of Multidisciplinary*, 2016, 3(7): 2319-2801.
11. Yadav J., Verma J.P., Rajak V.K., Tiwari K.N. Selection of effective indigenous rhizobia strain for seed inoculation on chickpea (*Cicer aritenium* L.) production. *Bacteriology Journal*, 2011, 1(1): 24-30 (doi: 10.3923/bj.2011.24.30).
12. Gasanov G.N., Usmanov R.Z., Musaev M.R., Abasov M.M. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* [Agricultural Biology], 2007, 1: 79-85.
13. Rumyantseva M.L., Stepanova G.V., Kurchak O.N., Onishchuk O.P., Muntyan V.S., Dzyubenko E.A., Dzyubenko N.I., Simarov B.V. Selection of salt tolerant alfalfa (*Medicago* L.) plants from different varieties and their morfo biological and symbiotic properties analysis. *Agricultural Biology* [Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya], 2015, 50(5): 673-684 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.5.673eng).
14. Aranjuelo L., Arrese-Igor C., Molero G. Nodule performance within a changing environmental context. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171(12): 1076-1090 (doi: 10.1016/j.jplph.2014.04.002).
15. Mahajan S., Tuteja N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2005, 444(2): 139-58 (doi: 10.1016/j.abb.2005.10.018).
16. O'Hara G., Yates R., Howieson J. Selection of strains of root nodule bacteria to improve inoculants performance and increase legume productivity in stressful environments. In: *Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam* /D. Herridge (ed.). ACIAR Proceedings, 2002: 75-80.
17. Sańko-Sawczenko I., Łotocka B., Mielecki J., Rekosz-Burlaga H., Czarnocka W. Transcriptomic changes in *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* root nodules during drought stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(5): 1204 (doi: 10.3390/ijms20051204).
18. Salim A., Cheloufi H., Attab S., Bouras N. Improvement of alfalfa growth under water stress by inoculation with *Sinorhizobium meliloti* strains from the Algerian Sahara. *International Journal of Sciences and Research*. 2019, 75(7/1): 35-40 (doi: 10.21506/j.ponte.2019.7.4).
19. Vriezen J.A., de Bruijn F.J., Nüsslein K. Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(11): 3451-3459 (doi: 10.1128/AEM.02991-06).
20. Xu J., Li X.L., Luo L. Effects of engineered *Sinorhizobium meliloti* on cytokinin synthesis and tolerance of alfalfa to extreme drought stress. *Biotechnology*, 2012, 78(22): 8056-8061 (doi: 10.1128/AEM.01276-12).
21. Lazarev N.N. *Vestnik OrelGAU*, 2006, (2-3): 55-56 (in Russ.).
22. Bourion V., Heulin-Gotty K., Aubert V., Tisseyre P., Chabert-Martinello M., Pervent M., Delaitre C., Vile D., Siol M., Duc G., Brunel B., Burstin J., Lepetit M. Co-inoculation of a Pea Core-Collection with diverse rhizobial strains shows competitiveness for nodulation and efficiency of nitrogen fixation are distinct traits in the interaction. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 8: 2249 (doi: 10.3389/fpls.2017.02249).
23. Tikhonovich I.A., Andronov E.E., Borisov A.Yu., Dolgikh E.A., Zhernakov A.I., Zhukov V.A., Provorov N.A., Rumyantseva M.L., Simarov B.V. *Genetika*, 2015, 51(9): 831-846 (doi: 10.7868/S001667581509012X) (in Russ.).

24. Gubry-Rangin C., Garcia M., Bena G. Partner choice in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium* symbiosis. *Proceedings. Biological sciences*, 2010, 277(1690): 1947-1951 (doi: 10.1098/rspb.2009.2072).
25. Wang D., Yang S., Tang F., Zhu H. Symbiosis specificity in the legume-rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology*, 2012, 14(3): 334-342 (doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01736.x).
26. Khapchaeva S.A., Didovich S.V., Topunov A.F., Mulyukin A.L., Zotov V.S. *Ekologicheskaya genetika*, 2018, 16(4): 51-60 (doi: 10.17816/ecogen16451-60) (in Russ.).
27. Argaw A. Symbiotic effectiveness of inoculation with *Bradyrhizobium* isolates on soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] genotypes with different maturities. *Springerplus*, 2014, 3: 753 (doi: 10.1186/2193-1801-3-753).
28. Vorobeikov G.A., Bredikhin V.N. *Mikroorganizmy v agrobiotekhnologiyakh i zashchite prirodnoi sredy*. SPb, 2018.
29. Kozhemyakov A.P., Laktionov Yu.V., Popova T.A., Orlova A.G., Kokorina A.L., Vaishlya O.B., Agafonov E.V., Guzhvin S.A., Churakov A.A., YAKovleva M.T. The scientific basis for the creation of new forms of microbial biochemicals. *Agricultural Biology [Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya]*, 2015, 50(3): 369-376 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.3.369eng).
30. Arafa M.M., El-Batanony N.H., Nofal A.M. Inoculation effect of rhizobial strains on growth, yield and chemical composition of some legume crops in new reclaimed soil. *Middle East Journal of Agriculture Research*, 2018, 7(2): 352-363.
31. Buntic A.V., Stajkovic-Srbinovic O.S., Knezevic M.M., Kuzmanovic D.Z., Rasulic N.V., Delic D.I. Development of liquid rhizobial inoculants and pre-inoculation of alfalfa seeds. *Archives of Biological Sciences*, 2019, 71(2): 379-387 (doi: 10.2298/abs181008062b).
32. Solomon T., Pant L.M., Angaw T. Effects of Inoculation by *Bradyrhizobium japonicum* strains on nodulation, nitrogen fixation, and yield of soybean (*Glycine max* L. Merrill) varieties on Nitisols of Bako, Western Ethiopia. *ISRN Agronomy*, 2012, Article ID 261475 (doi: 10.5402/2012/261475).
33. Atlasova L.G. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossijskoi akademii nauk*, 2015, 17(5): 77-80 (in Russ.).
34. Tsotsieva V.P., Basieva L.Zh., Kozyrev A.Kh. *Izvestiya Gorskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2015, 52(4): 57-62 (in Russ.).
35. Deaker R., Roughley R.J., Kennedy I.R. Legume seed inoculation technology — a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(8): 1275-1288 (doi: 10.1016/j.soilbio.2004.04.009).
36. Drobysheva L.V., Zyatchina G.P. *Adaptivnoe kormoproizvodstvo*, 2016, 3: 94-108 (in Russ.).
37. Stepanova G.V., Zolotarev V.N. *Adaptivnoe kormoproizvodstvo*, 2015, 1: 28-38 (in Russ.).
38. Ibragimova M.V., Rummyantseva M.L., Onishchuk O.P., Belova V.S., Kurchak O.N., Andronov E.E., Dzyubenko N.I., Simarov B.V. *Mikrobiologiya*, 2006, 75(1): 94-100 (in Russ.).
39. Beringer J.E. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, 1974, 84: 188-198 (doi: 10.1099/00221287-84-1-188).
40. Rummyantseva M.L., Simarov B.V., Onishchuk O.P., Andronov E.E., Chizhevskaya E.P., Belova V.S., Kurchak O.N., Muntyan A.N., Rummyantseva T.B., Zatovskaya T.V. *Biologicheskoe raznoobrazie klubenkovykh bakterii v ekosistemakh i agrotsenozakh. Teoreticheskie osnovy i metody /Pod redaktsiei M.L. Rummyantsevoi, B.V. Simarova* [The biological diversity of nodule bacteria in ecosystems and agrocenoses. Theoretical foundations and methods. M.L. Rummyantseva, B.V. Simarov (eds.)]. St. Petersburg, 2011 (in Russ.).
41. Cherkasova M.E., Muntyan V.S., Saksaganskaya A.S., Simarov B.V., Rummyantseva M.L. *Ekologicheskaya genetika*, 2019, 17(3): 23-38 (doi: 10.17816/ecogen17323-38) (in Russ.).
42. Giuntini E., Mengoni A., De Filippo C., Cavalieri D., Aubin-Horth N., Landry C.R., Becker A., Bazzicalupo M. Large-scale genetic variation of the symbiosis-required megaplasmid pSymA revealed by comparative genomic analysis of *Sinorhizobium meliloti* natural strains. *BMC Genomics*, 2005, 6: Article number 158 (doi: 10.1186/1471-2164-6-158).
43. Kim C.C., Joyce E.A., Chan K., Falkow S. Improved analytical methods for microarray-based genome-composition analysis. *Genome Biology*, 2002, 3(11): RESEARCH0065 (doi: 10.1186/gb-2002-3-11-research0065).
44. *Raionirovannye i perspektivnye sorta kormovykh kul'tur selektsii VNII kormov im. V.R. Vil'yamsa. Katalog* [Zoned and promising varieties of feed crops breeding VNII feed them. V.R. Williams. Catalog]. Moscow, 2007 (in Russ.).
45. Pustyl'nik E.I. *Statisticheskie metody analiza i obrabotki nablyudenii* [Statistical methods for the analysis and processing of observations]. Moscow, 1968 (in Russ.).
46. Lakin G.F. *Biometriya* [Biometrics]. Moscow, 1990 (in Russ.).
47. Gmurman V.E. *Teoriya veroyatnostei i matematicheskaya statistika* [Theory of Probability and Mathematical Statistics]. Moscow, 2004 (in Russ.).
48. Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 2001, 4(1):1-9.
49. Rummyantseva M.L., Muntyan V.S., Cherkasova M.E., Andronov E.E., Saksaganskaya A.S., Dzyubenko E.A., Dzyubenko N.I., Simarov B.V. A comparative analysis of genomic characters of reference *Sinorhizobium meliloti* strains, the alfalfa symbionts (review). *Agricultural Biology [Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya]*, 2017, 52(5): 928-939 (doi: 10.15389/agrobiology.2017.5.928eng).