

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ
ГУАРА *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.***

И.Г. КУЗНЕЦОВА¹, А.Л. САЗАНОВА¹, В.И. САФРОНОВА¹, Ж.П. ПОПОВА¹,
Д.В. СОКОЛОВА², Н.Ю. ТИХОМИРОВА¹, Ю.С. ОСЛЕДКИН¹, Д.С. КАРЛОВ¹,
А.А. БЕЛИМОВ^{1, 2}

Циамопсис четырехкрыльниковый, или гуар (*Cyamopsis tetragonoloba*, сем. *Fabaceae*), — однолетняя зернобобовая культура, перспективная для возделывания в России. Его плоды содержат значительное количество жирных масел и белков, зеленые бобы могут служить ценным пищевым продуктом, это древняя кормовая культура (в настоящее время используется гуаровая мука и немолотый гранулированный корм), но наиболее востребовано это растение как источник гуаровой камеди, которая представляет собой полисахарид, образованный галактозой и маннозой (галактоманнан) и содержится в эндосперме семян. Гуар в основном выращивают в Индии, однако из-за высокого спроса на камедь это растение пытаются культивировать в других районах с подходящим климатом: в США, Судане, Афганистане, Кении, Пакистане, Австралии, а также на юге России. Известно, что продуктивность бобовых культур зависит не только от климатических условий, но и от эффективности симбиоза с ризобиями, которая в том числе определяется азотфиксирующей активностью и конкурентоспособностью микросимбионтов, а также их комплементарностью к определенному сорту. Использование клубеньковых бактерий для инокуляции растений особенно важно при интродукции на новые места обитания, поэтому для успешного выращивания гуара в России необходимы специфические штаммы-микросимбионты. В настоящей работе мы впервые выделили клубеньковые бактерии вида *Bradyrhizobium elkanii* из корневых клубеньков растений гуара, выращенных в условиях вегетационного опыта с использованием почвы, привезенной из Индии, определили таксономическое положение и генетическую гетерогенность штаммов. У 10 полученных изолятов проведено секвенирование гена 16S рРНК (*rrs*), последовательности между генами 16S и 23S рРНК (ITS-региона) и трех генов «домашнего хозяйства» *atpD*, *dnaK* и *recA*. По результатам анализа последовательности *rrs* все изоляты отнесены к виду *Bradyrhizobium elkanii* (сем. *Bradyrhizobiaceae*), представители которого служат микросимбионтами широкого круга бобовых растений, в том числе трибы *Indigofereae*, к которой относится гуар. Однако ранее представители вида не были описаны в качестве микросимбионтов циамопсиса четырехкрыльникового. Секвенирование ITS-региона и генов «домашнего хозяйства» подтвердило видовую принадлежность изолятов и продемонстрировало генетическую разнородность природной популяции микросимбионтов гуара, что может свидетельствовать о различиях в симбиотических взаимоотношениях между растениями и изолированными штаммами. Дальнейшее изучение генетического разнообразия, морфолого-культуральных, физиолого-биохимических, хозяйственно полезных свойств клубеньковых бактерий гуара позволит расширить знания о филогении микросимбионтов этой относительно новой для России культуры, а также проводить селекцию эффективных штаммов, улучшающих рост растений и качество продукции в новых регионах возделывания.

Ключевые слова: *Cyamopsis tetragonoloba*, гуар, клубеньковые бактерии, ген 16S рРНК, ITS-регион, гены «домашнего хозяйства», симбиоз.

Циамопсис четырехкрыльниковый *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. (гуар, гороховое дерево, или индийская акация) — однолетняя зернобобовая культура с высоким содержанием белка из трибы *Indigofereae* семейства *Fabaceae*. Помимо *C. tetragonoloba*, род *Cyamopsis* включает еще 4 вида (*C. dentata*, *C. psoraloides*, *C. senegalensis* и *C. serrate*) с меньшим промышленным значением (1, 2). Выращивается как овощная культура и может употребляться на корм животным. Гуар — азотфиксирующее растение и служит хорошим предшественником в севообороте. Особую ценность представляет гуаровая камедь (используется как натуральный загуститель и эмульгатор в пищевой, медицинской, текстильной и целлюлозно-бумажной промышленности, при производстве косметики, взрывчатых веществ, а также как поверхностно-активное вещество с высокой вязкостью в

* Исследование выполнено при поддержке Минобрнауки в рамках проекта RFMEFI60417X0168 (соглашение № 14.604.21.0168). Долгосрочное хранение штаммов осуществляется в рамках Программы по развитию и инвентаризации биоресурсных коллекций научными организациями.

угольной и нефтегазовой промышленности) (3), спрос на которую постоянно растет: по данным за 2014–2016 годы, ежегодная потребность в камеди составляет около 1,5 млн т, а в 2016 году импорт гуаровой камеди в Россию превысил 15 тыс. т (4). Родина циамопсиса и основной поставщик гуаровой камеди — Индия, хотя растение также культивируется в Пакистане, Судане, Африке, Австралии, Цейлоне, Афганистане и США (1). В Россию гуар был завезен в середине 1920-х годов (5), но широкого распространения не нашел из-за недостаточных знаний о технологии ее возделывания (6). В последние годы интерес к промышленному выращиванию гуара отмечается в Северо-Кавказском регионе России, в Краснодарском крае, Ростовской области и в Крыму (3).

Известно, что производительность бобовых культур зависит от эффективности их симбиоза с клубеньковыми бактериями, которую в том числе определяет азотфиксирующая активность, вирулентность, конкурентоспособность, а также комплементарность (специфичность) штаммов микросимбионтов к определенному сорту растения. Применение активных штаммов в качестве инокулянтов обеспечивает интенсивную азотфиксацию, способствует усилению фотосинтеза и, как следствие, приводит к увеличению урожайности растений (7). Использование ризобий для инокуляции особенно важно при возделывании бобовых на новых территориях, где в почве отсутствуют необходимые микросимбионты. Например, при попытке выращивания сои культурной (*Glycine max*) в нетипичных для вида географических зонах России клубеньки на корнях практически не формировались, и для повышения урожая и содержания белка в растительной массе и зерне потребовалось внесение с семенами специфических микросимбионтов (8). Согласно исследованиям прошлых лет, инокуляция произрастающего в Судане гуара штаммами *Bradyrhizobium* spp. оказывала заметное положительное влияние на развитие растений, значительно увеличивала количество клубеньков, сухую массу растений, общее содержание азота и урожай семян (9).

Мы полагаем, что для успешной интродукции гуара в России требуется (наравне с изучением подходящих почвенно-климатических условий и разработкой технологий возделывания) исследование микросимбионтов этой культуры и последующая селекция эффективных штаммов.

В настоящей работе мы впервые выделили из клубеньков гуара ризобии вида *Bradyrhizobium elkanii*. С помощью секвенирования последовательностей 16S рДНК, ITS-региона и генов «домашнего хозяйства» *atpD*, *dnaK* и *recA* у изолятов определена таксономическая принадлежность и описана генетическая разнородность.

Цель работы состояла в получении и филогенетическом анализе микросимбионтов растений *Cyamopsis tetragonoloba*.

Методика. Семена гуара (получены во Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, г. Санкт-Петербург) скарифицировали и поверхностно стерилизовали в 98 % H_2SO_4 в течение 10 мин, затем тщательно промывали стерильной водопроводной водой и прорастивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри при температуре 25 °С в темноте в течение 3 сут. Проростки переносили в пластиковые сосуды (12 сосудов по 4 проростка), содержащие 100 г стерильного вермикулита. В каждый сосуд добавляли 5 мл водной вытяжки, полученной из 12 образцов почв, собранных в провинции Раджастан (Индия).

Растения культивировали в течение 45 сут в фитокомнате с относительной влажностью 60 % при 4-уровневом режиме освещенности и температуры: ночь (темнота, 18 °С, 8 ч), утро (200 мкмоль · м⁻² · с⁻¹, 20 °С, 2 ч),

день (400 мкмоль · м⁻² · с⁻¹, 23 °С, 12 ч), вечер (200 мкмоль · м⁻² · с⁻¹, 20 °С, 2 ч). Для освещения использовались лампы L 36W/77 FLUORA («Osram», Германия). По окончании эксперимента корни растений вынимали из вермикулита и промывали водопроводной водой. Образовавшиеся клубеньки отделяли от корней, поверхностно стерилизовали 1 мин в 70 % этаноле и гомогенизировали в стерильной водопроводной воде.

Штаммы ризобий выделяли из гомогенатов клубеньков по традиционной методике (10) и с использованием модифицированного маннитно-дрожжевого агара YMSA (11) с добавлением 0,5 % янтарной кислоты. Культуры выращивали при 28 °С. Все изоляты депонированы в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) и размещены на Станции низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов (Liconic Instruments, Лихтенштейн) (12). Информация о штаммах доступна в Интернет-базе данных ВКСМ (13).

Видовую принадлежность штаммов определяли на основе секвенирования гена 16S рПНК (*rrs*), а также последовательности между генами 16S и 23S рПНК (ITS-региона). Для амплификации 16S рДНК (фрагмент гена около 1500 п.н.) использовали праймеры fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'), для амплификации ITS региона (800 п.н.) — праймеры FGPL-132 (5'-CCGGGTTTCCCATTCGG-3') и FGPS1490-72 (5'-TGCGGCTGGATCCCCTCCTT-3'). Для уточнения таксономического положения и изучения генетической гетерогенности штаммов были секвенированы гены «домашнего хозяйства» *atpD*, *recA* и *dnaK*. Амплификацию генов «домашнего хозяйства» проводили с помощью праймеров *atpD352F* и *atpD871R*, *recA63FD* и *recA504RD* (14), *dnaK1466Fd* и *dnaK1777Rd* (15). Полученные ПЦР-продукты выделяли из геля и очищали (16) для последующего секвенирования (генетический анализатор ABI PRISM 3500xl, «Applied Biosystems», США). Поиск гомологичных последовательностей выполняли с помощью базы данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и программы BLAST (17). Филогенетическое дерево конструировали в программе MEGA5 методом Neighbor-Joining (18). Пары последовательностей сравнивали по числу различающихся нуклеотидов. Чтобы оценить уровни поддержки кластеров, проводили бутстреп-анализ на основе 1000 повторов. Полученные последовательности депонированы в базе данных GenBank под номерами МН938226-МН938235 для гена *rrs*, МН938704-МН938713 — для последовательности ITS-региона, МН982271-МН982280 — для гена *atpD*, МН982261-МН982270 — для гена *dnaK* и МН982251-МН982260 — для гена *recA*.

Результаты. Из корневых клубеньков растений гуара было выделено 10 бактериальных штаммов: по одному штамму из каждого образца почв. В двух образцах почв на корнях растений клубеньков не обнаружили. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рПНК показал, что все штаммы принадлежат к роду *Bradyrhizobium* и формируют монофилетический статистически достоверный кластер с уровнем поддержки 99 % (рис. 1). Помимо изолятов, кластер включал типовые штаммы *B. elkanii* USDA 76T, *B. jicamae* PAC68T, *B. lablabi* CCBAU 23086T, *B. pachyrhizi* PAC48T и *B. tropiciagri* SEMIA 6148T. Однако максимальная степень *rrs*-гомологии у новых изолятов (100 %) наблюдалась только с двумя типовыми штаммами — *B. elkanii* USDA 76T и *B. pachyrhizi* PAC48T (табл.). Со штаммом *B. tropiciagri* SEMIA 6148T сходство по *rrs* гену было ниже и варьировало от 98,4 до 99,3 %, со штаммами *B. jicamae* PAC68T и *B. lablabi* CCBAU 23086T *rrs*-

ГОМОЛОГИЯ БЫЛА НИЖЕ 99 % (см. табл.).

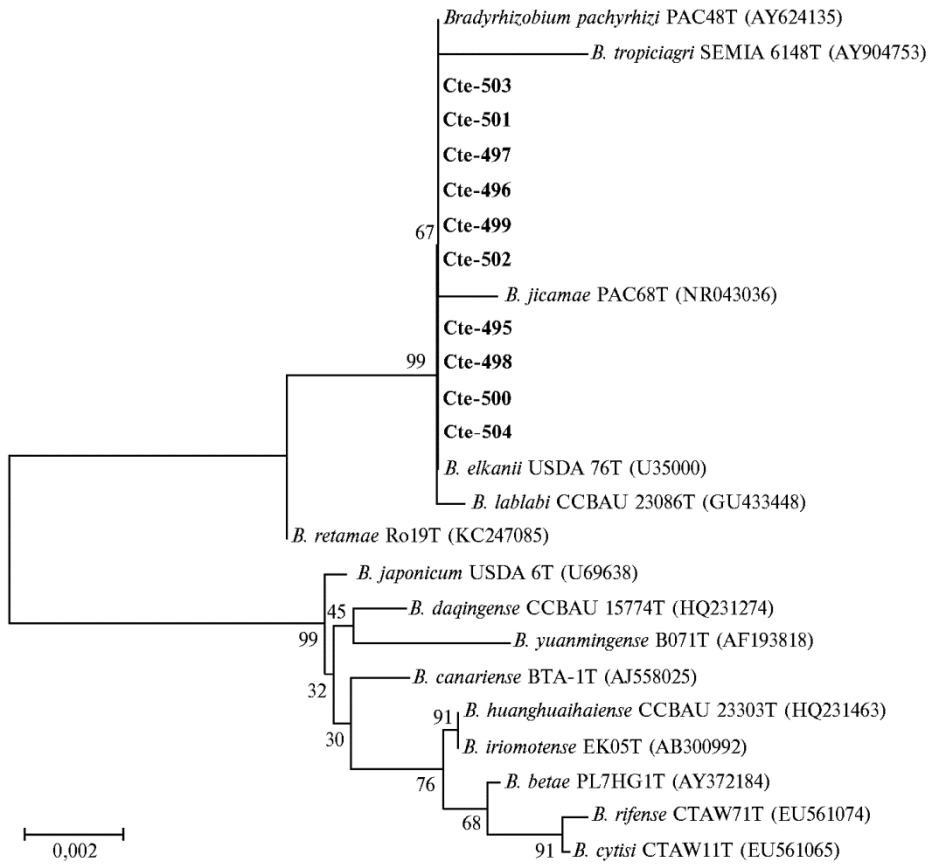


Рис. 1. *rrs*-Филограмма штаммов, выделенных из клубеньков гуара *Cyamopsis tetragonoloba*, а также представителей родственных видов рода *Bradyrhizobium*. Типовые штаммы отмечены литерой Т. Штаммы гуара отмечены жирным шрифтом (метод Neighbour-Joining).

Гомология (%) последовательностей генов у изолятов, выделенных из клубеньков гуара *Cyamopsis tetragonoloba*, и у ближайших типовых штаммов рода *Bradyrhizobium*

Типовой штамм	Локус	Изолят С									
		495	496	497	498	499	500	501	502	503	504
<i>B. elkanii</i> USDA76Т	<i>rrs</i>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	ITS	92,2	93,0	92,3	92,6	92,9	92,1	94,2	91,3	94,3	94,3
	<i>atpD</i>	96,1	96,5	97,4	97,8	97,8	96,8	96,0	96,2	96,3	97,0
	<i>dnaK</i>	98,8	98,8	98,4	97,9	98,4	98,7	98,4	98,7	98,7	99,2
	<i>recA</i>	94,4	95,0	94,5	94,5	94,7	94,5	95,7	94,4	96,1	94,6
<i>B. pachyrhizum</i> PAC48Т	<i>rrs</i>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	ITS	90,6	89,8	90,6	90,7	90,8	90,2	87,9	90,6	87,9	88,3
	<i>atpD</i>	96,1	95,3	95,1	95,7	95,1	94,9	95,7	95,8	95,8	95,1
	<i>dnaK</i>	99,6	99,6	99,2	98,6	99,1	99,0	98,7	99,3	99,0	99,2
	<i>recA</i>	93,8	93,9	93,9	93,9	93,6	93,8	94,8	93,9	94,7	93,6
<i>B. tropiciagri</i> SEMIA6148Т	<i>rrs</i>	99,3	99,3	98,8	99,0	99,1	99,2	98,4	99,3	99,3	99,2
	ITS	92,1	91,9	91,8	91,5	91,9	91,5	91,4	91,1	90,8	90,8
	<i>atpD</i>	96,9	95,7	95,7	96,2	96,3	95,3	96,6	96,8	96,8	95,3
	<i>dnaK</i>	96,6	96,7	96,3	96,7	96,8	96,7	96,1	97,0	96,4	96,5
	<i>recA</i>	94,7	95,2	95,2	94,8	94,4	94,8	95,5	94,6	95,9	94,4

Для уточнения видовой принадлежности штаммов, а также изучения их генетической разнородности был проведен анализ последовательностей трех генов «домашнего хозяйства»: *atpD* и *recA*, кодирующих соответственно β-субъединицу мембранной АТФ-синтазы и ДНК-рекомбиназу

(14), а также гена *dnaK*, который кодирует шаперон, предотвращающий агрегацию белков и обеспечивающий их рефолдинг при тепловом повреждении (15). Дендрограмма, построенная на основе объединенных последовательностей генов *atpD*, *dnaK* и *recA*, представлена на рисунке 2.

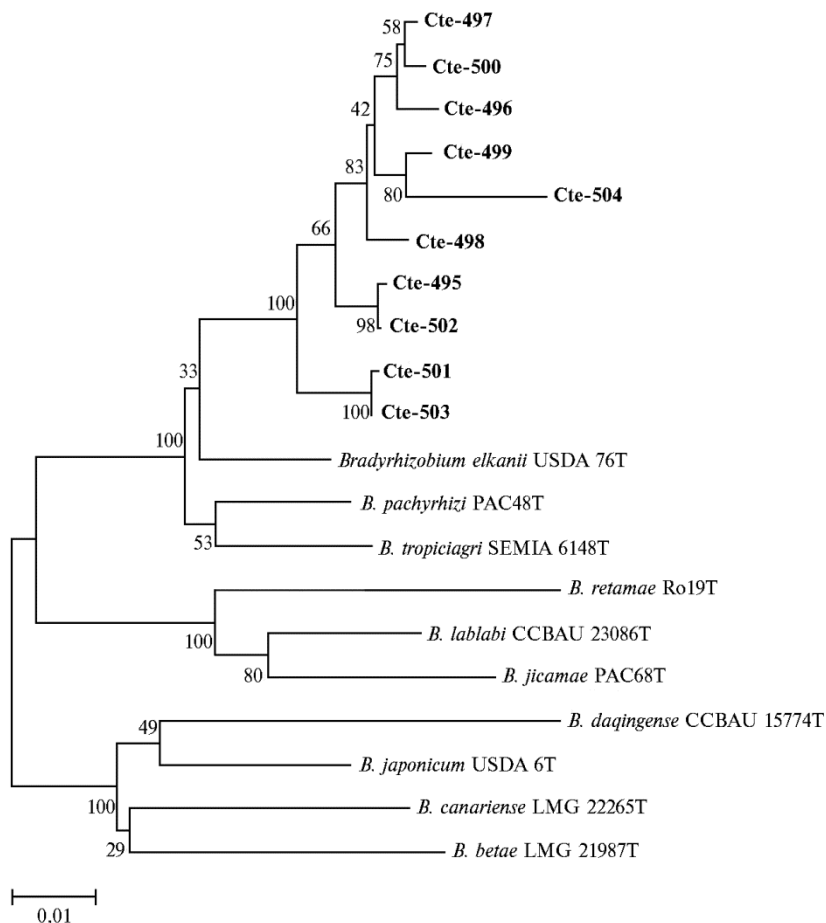


Рис. 2. Филограмма, построенная на основе объединенных последовательностей генов *atpD*, *dnaK* и *recA* у штаммов, выделенных из клубеньков гуара *Syamopsis tetragonoloba*, а также представителей родственных видов рода *Bradyrhizobium*. Типовые штаммы отмечены литерой Т. Штаммы гуара отмечены жирным шрифтом (метод Neighbour-Joining).

Все изоляты кластеризовались при уровне поддержки 100 % вместе с типовыми штаммами *B. elkanii* USDA 76T, *B. pachyrhizi* PAC48T и *B. tropiciagri* SEMIA 6148T. В пределах этой группы были выявлены два статистически достоверных субкластера, сформированных изолятами Cte-501 и Cte-503, а также Cte-495 и Cte-502 (уровни поддержки субкластеров соответственно 100 и 98 %). Максимальная гомология по гену *atpD* между новыми изолятами и типовыми штаммами составила 97,8 % для *B. elkanii*, 96,9 % — для *B. tropiciagri* и 96,1 % — для *B. pachyrhizi* (табл.). Гомология по гену *dnaK* варьировала от 98,4 до 99,2 % для *B. elkanii*, от 98,7 до 99,6 % — для *B. pachyrhizi* и от 96,1 до 97,0 % — для *B. tropiciagri*. По гену *recA* величина максимальной гомологии между изолятами и типовыми штаммами равнялась 96,1 % для *B. elkanii*, 95,9 % — для *B. tropiciagri* и 94,8 % — для *B. pachyrhizi* (см. табл. 1).

Анализ последовательности ITS-региона часто используют в качестве дополнительного метода идентификации микроорганизмов (11, 19).

По результатам выполненного нами сравнения по ITS-региону все изоляты кластеризовались вместе с типовым штаммом *B. elkanii* USDA 76T при уровне статистической поддержки 100 % (рис. 3). Максимальная гомология по ITS-региону между новыми изолятами и типовыми штаммами *B. elkanii*, *B. tropiciagri* и *B. pachyrhizi* составляла соответственно 94,3, 92,1 и 90,8 % (см. табл.).

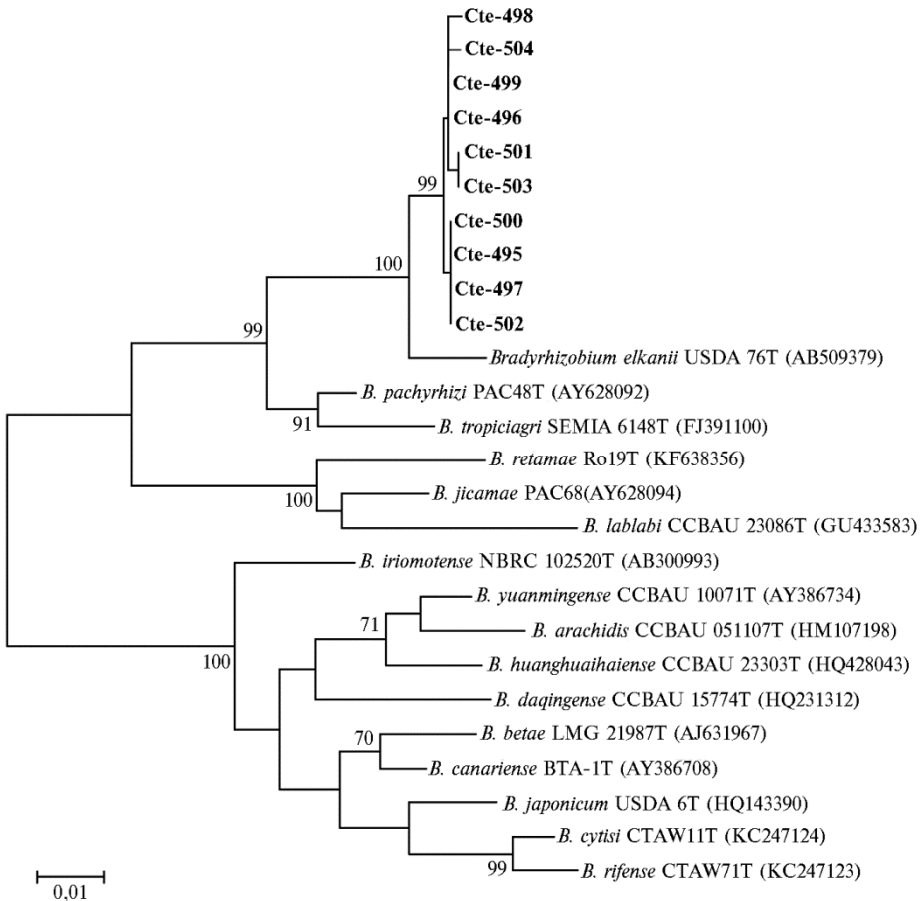


Рис. 3. ITS-филограмма штаммов, выделенных из клубеньков гуара *Cyamopsis tetragonoloba*, а также представителей родственных видов рода *Bradyrhizobium*. Типовые штаммы отмечены литерой Т. Штаммы гуара отмечены жирным шрифтом (метод Neighbour-Joining).

Название вида *Bradyrhizobium elkanii* предложено в 1992 году (20) для гомологичной группы штаммов в пределах существующего вида *B. japonicum*, описанного для азотфиксирующих микросимбионтов сои *Glycine max* (21). Оба вида относятся к доминирующему роду, способному нодулировать большинство видов трибы дроковых *Genisteeae* (22), к наиболее известным представителям которой относятся люпин (*Lupinus*), раkitник (*Cytisus*) и дрок (*Genista*). Однако штаммы *B. elkanii* были также обнаружены в клубеньках бобовых растений из трибы *Indigoferaeae*, к которой относятся и гуар: у вигны (*Vigna unguiculata*, *V. radiata*), палисандра (*Dalbergia odorifera*) и десмодиума (*Desmodium incanum*) (23–25). Ранее были описаны два штамма — XBD2 SARCC-388 и ENNRI 16A, выделенные из циамопсиса, способные к эффективной азотфиксации и идентифицированные соответственно как *B. japonicum* и *Bradyrhizobium* sp. (26, 27). Однако в основном исследования гуара проводятся для изучения и улучшения свойств камеди (28), устойчивости к болезням и селекции высокопродуктивных

сортов (2, 29). Видимо, это связано с достаточным количеством аборигенных штаммов-микросимбионтов в местах традиционного возделывания культуры и отсутствием необходимости в инокуляции растений. В связи с этим следует подчеркнуть, что при интродукции гуара на новые территории симбиотические растительно-микробные взаимоотношения, благодаря которым культура получает азотное питание, становятся важнейшим фактором повышения ее продуктивности.

Таким образом, по результатам секвенирования гена *rrs* десять штаммов, выделенных в вегетационном опыте из корневых клубеньков гуара, отнесены к роду *Bradyrhizobium*. С помощью дополнительных методов молекулярно-генетической идентификации (секвенирования последовательности ITS-региона и трех генов «домашнего хозяйства» *dnaK*, *recA* и *atpD*) удалось уточнить таксономическое положение изолятов и показать их принадлежность к виду *Bradyrhizobium elkanii*. Ранее представители этого вида не были описаны как микросимбионты циамопсиса четырехкрыльничкового. Секвенирование ITS-региона и генов «домашнего хозяйства» продемонстрировало генетическую разнородность природной популяции микросимбионтов гуара, что может свидетельствовать о различиях в симбиотических взаимоотношениях между растениями и изолированными штаммами. Дальнейшее изучение генетического разнообразия, морфолого-культуральных, физиолого-биохимических, хозяйственно полезных свойств клубеньковых бактерий гуара позволит расширить знания о филогении микросимбионтов этой относительно новой для России культуры, а также проводить селекцию эффективных штаммов, улучшающих рост растений и качество продукции в новых регионах возделывания.

Авторы благодарны П.А. Белимовой за ценную помощь в проведении вегетационного опыта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лебедь Д.В., Костенкова Е.В., Волошин М.И. Агрономическое обоснование размещения посевов *Cyatopsis tetragonoloba* L. на юге европейской части России. *Таврический вестник аграрной науки*, 2017, 1(9): 53-63.
2. Дзюбенко Н.И., Дзюбенко Е.А., Потокина Е.К., Булынец С.В. Гуар *Cyatopsis tetragonoloba* (L.) Taub.: характеристика, применение, генетические ресурсы и возможность интродукции в России (обзор). *Сельскохозяйственная биология*, 2017, 52(6): 1116-1128 (doi: 10.15389/agrobiology.2017.6.1116rus).
3. Булынец С.В., Вальяникова Т.И., Силаева О.И., Копоть Е.И., Пимонов К. И. Гуар — новая бобовая культура для России. *Мат. Всероссийской науч.-практ. конф. «Инновации в технологиях возделывания сельскохозяйственных культур»*. Донской ГАУ, пос. Персиановский, 2017: 167-172.
4. Старцев В.И., Ливанская Г.А., Куликов М.А. Перспективы возделывания гуара *Cyatopsis tetragonoloba* L. в России. *Вестник Российского государственного аграрного заочного университета*, 2017, 24(29): 11-15.
5. Вавилов Н.И. *Интродукция растений в советское время и ее результаты. Избранные труды. Том V. М.-Л.*, 1965: 674-689.
6. Волошин М.И., Лебедь Д.В., Брусенцов А.С. Результаты интродукции нового бобового растения — гуара (*Cyatopsis tetragonoloba* (L.)Taub.). *Труды Кубанского государственного аграрного университета*, 2016, 1(58): 84-91.
7. Стамбульская У.Я. *Влияние бактерий Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* на морфометрические показатели роста гороха. Режим доступа: <http://bio-x.ru/articles/simbioz-bakteriy-rhizobium-leguminosarum-i-rasteny-goroha>. Без даты.
8. Жакеева М.Б., Бекенова У.С., Жумадилова Ж.Ш., Шорабаев Е.Ж., Абдиева К.М., Садапов А.К. Влияние разных доз биопрепаратов на урожайность и биометрический показатель люцерны. *Современные проблемы науки и образования*, 2015, 5. Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21887>. Без даты.
9. Elsheikh El.A.Al., Ibrahim K. The effect of *Bradyrhizobium* inoculation on yield and seed quality of guar (*Cyatopsis tetragonoloba* L.). *Food Chem.*, 1999, 65(2): 183-187 (doi: 10.1016/S0308-8146(98)00192-7).
10. Novikova N., Safronova V. Transconjugants of *Agrobacterium radiobacter* harboring *sym* genes of

- Rhizobium galegae* can form an effective symbiosis with *Medicago sativa*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1992, 93(3): 261-268 (doi: 10.1016/0378-1097(92)90472-Z).
11. Safronova V.I., Kuznetsova I.G., Sazanova A.L., Kimeklis A.K., Belimov A.A., Andronov E.E., Pinaev A.G., Chizhevskaya E.P., Pukhaev A.R., Popov K.P., Willems A., Tikhonovich I.A. *Bosea vaviloviae* sp. nov., a new species of slow-growing rhizobia isolated from nodules of the relict species *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2015, 107(4): 911-920 (doi: 10.1007/s10482-015-0383-9).
 12. Safronova V.I., Tikhonovich I.A. Automated cryobank of microorganisms: Unique possibilities for long-term authorized depositing of commercial microbial strains. In: *Microbes in applied research: current advances and challenges* /A. Mendez-Vilas (ed.). World Scientific Publishing Co, Hackensack, 2012.
 13. *Электронная база данных Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ)*. Режим доступа: <http://www.arriam.spb.ru>. Без даты.
 14. Gaunt M.W., Turner S.L., Rigottier-Gois L., Lloyd-Macgilp S.A., Young J.P. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 2001, 51(6): 2037-2048 (doi: 10.1099/00207713-51-6-2037).
 15. Stepkowski T., Czaplinska M., Miedzinska K., Moulin L. The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha *Proteobacteria*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2003, 26(4): 483-494 (doi: 10.1078/072320203770865765).
 16. Stepkowski T., Zak M., Moulin L., Kryliczak J., Golińska B., Narozna D., Safronova V.I., Mądrzak C.J. *Bradyrhizobium canariense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the two dominant rhizobium species in root nodules of lupin and serradella plants growing in Europe. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2011, 34(5): 368-375 (doi: 10.1016/j.syapm.2011.03.002).
 17. *GenBank sequence database. The National Center for Biotechnology Information*. Available <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Без даты.
 18. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, evolutionary distance, and Maximum Parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 2011, 28(10): 2731-2739 (doi: 10.1093/molbev/msr121).
 19. Safronova V.I., Sazanova A.L., Kuznetsova I.G., Belimov A.A., Andronov E.E., Chirak E.R., Popova J.P., Verkhovina A.V., Willems A., Tikhonovich I.A. *Phyllobacterium zundukense* sp. nov., a novel species of rhizobia isolated from root nodules of the legume species *Oxytropis triphylla* (Pall.) Pers. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 2018, 68(5): 1644-1651 (doi: 10.1099/ijsem.0.002722).
 20. Kuykendall L.D., Saxena B., Devine T.E., Udell S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.*, 1992, 38(6): 501-505 (doi: 10.1139/m92-082).
 21. Jordan D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* sp. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1982, 32(1): 136-139 (doi: 10.1099/00207713-32-1-136).
 22. Stepkowski T., Banasiewicz J., Granada C.E., Andrews M., Passaglia L.M.P. Phylogeny and phylogeography of rhizobial symbionts nodulating legumes of the Tribe *Genisteeae*. *Genes*, 2018, 9(3): 163 (doi: 10.3390/genes9030163).
 23. Zhang Y.F., Chang E.T., Tian C.F., Wang F.Q., Han L.L., Chen W.F., Chen W.X. *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the main rhizobia associated with *Vigna unguiculata* and *Vigna radiata* in the subtropical region of China. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2008, 285(2): 146-154 (doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01169.x).
 24. Lu J., Yang F., Wang S., Ma H., Liang J., Chen Y. Co-existence of Rhizobia and diverse non-rhizobial bacteria in the rhizosphere and nodules of *Dalbergia odorifera* seedlings inoculated with *Bradyrhizobium elkanii*, *Rhizobium* multihospitium-like and *Burkholderia pyrrocinia*-like strains. *Front. Microbiol.*, 2017, 21(8): 2255 (doi: 10.3389/fmicb.2017.02255).
 25. Toniutti M.A., Fornasero L.V., Albicoro F.J., Martini M.C., Draghi W, Alvarez F., Lagares A., Pensiero J.F., Del Papa M.F. Nitrogen-fixing rhizobial strains isolated from *Desmodium incanum* DC in Argentina: phylogeny, biodiversity and symbiotic ability. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2017, 40(5): 297-307 (doi: 10.1016/j.syapm.2017.04.004).
 26. Hassen A.I., Bopape F.L., Trytsman M. Nodulation study and characterization of rhizobial microsymbionts of forage and pasture legumes in South Africa. *World Journal of Agricultural Research*, 2014, 2(3): 93-100 (doi: 10.12691/wjar-2-3-2).
 27. Mohamed Ahmed T.H., Elsheikne A.E., Mahdi A.A. The in vitro compatibility of some *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains with fungicides. *African Crop Science Conference Proceedings*. Egypt, 2007, 18: 1171-1178 (doi: 10.13140/2.1.3933.9208).
 28. Sharma G., Sharma S., Kumar A., Al-Muhtaseb A.H., Naushad M., Ghfar A.A., Mola G.T., Stadler F.J. Guar gum and its composites as potential materials for diverse applications: A review. *Carbohydrate Polym.*, 2018, 199: 534-545 (doi: 10.1016/j.carbpol.2018.07.053).
 29. Muthuselvi R., Shanthi A., Praneetha S. Mean performance of cluster bean (*Cyamopsis tetragonoloba*) genotypes for yield and quality parameters. *International Journal of Chemical Studies*, 2018, 6(2): 3626-3629.

196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: kuznetsova_rina@mail.ru, v.safronova@rambler.ru ✉,
anna_sazanova@mail.ru, elestd@yandex.ru, arriam2008@yandex.ru,
arriam2008@yandex.ru, makondo07@gmail.com, belimov@rambler.ru;
2ФГБНУ ФИЦ Всероссийский институт
генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова,
190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42-44,
e-mail: dianasokol@bk.ru

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 6, pp. 1285-1293

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ROOT NODULE BACTERIA FROM GUAR *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.

I.G. Kuznetsova¹, A.L. Sazanova¹, V.I. Safronova¹, J.P. Popova¹, D.V. Sokolova²,
N.Yu. Tikhomirova¹, Yu.S. Osledkin¹, D.S. Karlov¹, A.A. Belimov^{1, 2}

¹All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail kuznetsova_rina@mail.ru, v.safronova@rambler.ru (✉ corresponding author), anna_sazanova@mail.ru, elestd@yandex.ru, arriam2008@yandex.ru, arriam2008@yandex.ru, makondo07@gmail.com, belimov@rambler.ru;

²Federal Research Center Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42-44, ul. Bol'shaya Morskaya, St. Petersburg, 190000 Russia, e-mail dianasokol@bk.ru

ORCID:

Kuznetsova I.G. orcid.org/0000-0003-0260-7677

Sazanova A.L. orcid.org/0000-0003-0379-6975

Safronova V.I. orcid.org/0000-0003-4510-1772

Popova J.P. orcid.org/0000-0003-1570-613X

Sokolova D.V. orcid.org/0000-0002-9967-7454

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The authors are grateful to P.A. Belimova for valuable assistance in pot trials.

Supported financially by Russian Ministry of Science and Education (project RFMEFI60417X0168, Agreement No. 14.604.21.0168). Long-term storage of strains is supported by the Program for the development and inventory of bioresource collections

Received July 24, 2018

Tikhomirova N.Yu. orcid.org/0000-0002-8510-2123

Osledkin Yu.S. orcid.org/0000-0001-8865-7434

Karlov D.S. orcid.org/0000-0002-9030-8820

Belimov A.A. orcid.org/0000-0002-9936-8678

doi: 10.15389/agrobiology.2018.6.1285eng

Abstract

Cyamopsis tetragonoloba (guar) belongs to the family *Fabaceae* and is one of the promising crops for cultivation in Russia. Beans contain a large number of protein and fatty oil content, green beans can serve as a valuable source of food and feeds (as seed flour and not ground granulated feeds), but the plant is more in demand as a source of guar gum, which is a polysaccharide formed by galactose and mannose (galactomannan) and is contained in the endosperm of the seeds of this plant. Guar gum is widely used in various industries: food, textile, cosmetic, oil and other. Guar comes from India, where approximately 80 % of the world's production of guar gum is obtained. However, due to high demand, the plant is cultivated throughout the world in areas with a suitable climate (the USA, Sudan, Kenya, Pakistan, Australia), including in the south of the Russian Federation. It is known that the productivity of leguminous crops depends not only on climatic conditions, but also on the effectiveness of symbiosis of plants with nodule bacteria (rhizobia), which is determined by the nitrogen-fixing activity and competitiveness of strains, as well as their complementarity to a particular variety. The use of rhizobia for inoculation of plants is especially important when they are introduced to new habitats, so knowledge of its microsymbionts is necessary for successful cultivation of guar in Russia. This paper is the first to report on isolation of the nodule bacteria of the species *Bradyrhizobium elkanii* from root nodules of the guar plants grown in a pot experiment with the use of soil samples from India. We determined the taxonomic position and genetic heterogeneity of the isolated strains. The 16S rRNA gene (*rrs*), ITS-region between the 16S and 23S rDNA and three "housekeeping" genes *atpD*, *dnaK* and *recA* of 10 isolates of nodule bacteria were sequenced. According to the results of the *rrs* sequence analysis, all isolates are assigned to the species *Bradyrhizobium elkanii* (family *Bradyrhizobiaceae*), whose representatives are microsymbionts of a wide range of leguminous plants, including the tribe *Indigoferae*, to which the guar belongs. However, the representatives of the species were not previously described as a microsymbiont of *Cyamopsis tetragonoloba*. Sequencing of the ITS-region and the "housekeeping" genes confirmed the species identity of the isolates and demonstrated their genetic heterogeneity. Thus, the study of nodule bacteria from guar has expanded our knowledge of the phylogeny of its microsymbionts and will allow us in the future to select the most effective strains that improve nitrogen nutrition and plant growth. Knowledge of the rhizobial microsymbionts of guar will help maximize the symbiotic potential of this agronomically valuable culture for its stable and highly productive cultivation.

Keywords: *Cyamopsis tetragonoloba*, guar, root nodule bacteria, 16S rRNA gene, ITS region, "housekeeping" genes, symbiosis.