

**Сельскохозяйственная микробиология**

УДК 633.9:631.461.52

doi: 10.15389/agrobiology.2022.3.555rus

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ АЗОТФИКСИРУЮЩЕГО СИМБИОЗА  
ГУАРА (*Cyamopsis tetragonoloba*) СО ШТАММАМИ *Bradyrhizobium retamae*  
RCAM05275 И *Ensifer aridi* RCAM05276 В ВЕГЕТАЦИОННОМ ОПЫТЕ\*****П.С. УЛЬЯНИЧ<sup>1</sup>, А.А. БЕЛИМОВ<sup>1</sup> ✉, И.Г. КУЗНЕЦОВА<sup>1</sup>, А.Л. САЗАНОВА<sup>1</sup>,  
О.С. ЮЗИХИН<sup>1</sup>, Ю.В. ЛАКТИОНОВ<sup>1</sup>, Д.С. КАРЛОВ<sup>1</sup>, М.А. ВИШНЯКОВА<sup>2</sup>,  
В.И. САФРОНОВА<sup>1</sup>**

Бобовая культура гуар (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) — источник гуаровой камеди (комплекс полисахаридов, который используется в различных отраслях промышленности). Эта культура широко возделывается в основном в Индии и Пакистане, но в последние годы возрастает интерес к промышленному выращиванию гуара в южных регионах России. Одна из проблем внедрения этой культуры в сельское хозяйство Российской Федерации — отсутствие в почвах бактерий, способных образовывать симбиотические клубеньки на корнях гуара в почвенно-климатических условиях России. В представляемой работе получены первые данные по эффективности инокуляции клубеньковыми бактериями гуара при выращивании в почвах России. Цель нашего исследования состояла в оценке эффективности симбиоза перспективных штаммов клубеньковых бактерий гуара *Bradyrhizobium retamae* RCAM05275 и *Ensifer aridi* RCAM05276 при выращивании растений в почвах, отобранных в разных районах Российской Федерации и не содержащих комплементарных клубеньковых бактерий. Для инокуляции семян гуара сорта Кубанский Юбилейный использовали инокулюмы в виде водных суспензий бактерий, полученные по стандартной методике приготовления жидких биопрепаратов клубеньковых бактерий. Эффективность симбиоза изучали в вегетационном опыте с выращиванием растений в дерново-подзолистой почве и чернозёме. Инокуляция обоими штаммами привела к активному образованию клубеньков (около 20–40 шт. на растение), в то время как на корнях контрольных растений клубеньков обнаружено не было. Количество клубеньков на растении было максимальным в варианте инокуляции штаммом *B. retamae* RCAM05275. Значения общей массы клубеньков на одно растение были максимальными в вариантах инокуляции штаммом *E. aridi* RCAM05276 благодаря образованию более крупных клубеньков. Клубеньки формировались на боковых корнях, имели округлую неправильную форму, розоватый цвет (свидетельство наличия в них леггемоглобина) и существенно варьировали по размеру. Оба штамма повысили биомассу побегов и всего растения примерно на 70 % при выращивании на дерново-подзолистой почве и черноземе, но не повлияли на биомассу корней. Инокулированные растения обладали примерно одинаковой нитрогеназной активностью независимо от штамма ризобий и типа почвы. Удельная нитрогеназная активность (на единицу биомассы клубенька) была примерно в 2 раза выше по сравнению с другими вариантами при инокуляции растений штаммом *B. retamae* RCAM05275 в дерново-подзолистой почве. Во всех вариантах опыта в побегах инокулированных растений выявлено повышение содержания общего азота примерно в 1,4 раза и накопления азота — в 3–4 раза. Таким образом, оба изученных штамма оказались способны формировать азотфиксирующий симбиоз, что привело к значительному росту биомассы растений и накоплению азота в побегах. Результаты показали перспективность дальнейших исследований по испытанию штаммов в полевых экспериментах с целью создания биопрепаратов для улучшения азотного питания этой сельскохозяйственной культуры.

**Ключевые слова:** азотфиксация, гуар, клубеньки, симбиоз, *Cyamopsis tetragonoloba*.

Гуар *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. — одна из важнейших тропических бобовых культур, в семенах которой содержится гуаровая камедь, используемой в угольной, нефтегазовой, пищевой, текстильной, бумажной и косметической промышленности. Гуар широко культивируется в Индии и Пакистане, а также в Афганистане, Кении, Австралии и полупустынных регионах США (1). Спрос на гуаровую камедь постоянно растет, и в 2016 году импорт гуаровой камеди в Россию превысил 15 тыс. т (2). В Россию

\* Авторы благодарят Ю.В. Хомякова (ФГБНУ АФИ, г. Санкт-Петербург) за проведение агрохимического анализа почв и Е.Е. Андронову (ФГБНУ ВНИИСХМ, г. Санкт-Петербург) за помощь в проведении фотосъемки клубеньков. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-16-00084).

гуар был завезен в середине 1920-х годов (3), но широкого распространения не нашел из-за недостаточных знаний о технологии его возделывания (4). В последние годы интерес к промышленному выращиванию гуара в южных регионах России возрастает (5). Одним из аспектов решения этой задачи — поиск штаммов клубеньковых бактерий (ризобий), способных образовывать эффективный азотфиксирующий симбиоз с гуаром в почвенно-климатических условиях Российской Федерации и создание биопрепаратов на основе таких микроорганизмов.

Инокуляция семян биопрепаратами клубеньковых бактерий обеспечивает интенсивную биологическую азотфиксацию, которая способствует усилению фотосинтеза и увеличению урожайности бобовых культур (6, 7). Использование ризобий для инокуляции особенно важно при возделывании бобовых на новых территориях, почвы которых не содержат необходимых микросимбионтов. Например, при попытке выращивания сои культурной *Glycine max* (L.) Merr. в нетипичных для вида географических зонах России клубеньки на корнях практически не формировались, поэтому потребовалась разработка биопрепаратов и инокуляция семян специфичными ризобиями (6). В настоящее время для решения этой проблемы производители семян сои обеспечивают их поставку совместно с биопрепаратами клубеньковых бактерий (<https://kingsagriseeds.com/soybeans/>).

Медленнорастущие клубеньковые бактерии рода *Bradyrhizobium* (семейство *Bradyrhizobiaceae*) являются основной группой ризобий, вступающих в симбиоз с гуаром (8, 9). В большинстве случаев штаммы не были идентифицированы до вида, но многие были близки к виду *B. japonicum* (10, 11). К этому виду относится очень большая и генетически разнородная группа микросимбионтов сои, а также штаммы, нодулирующие разные виды вигны (*Vigna*), люпина (*Lupinus*), сераделлы (*Ornithopus*) и широкий спектр бобовых растений генистоидного комплекса (12-14).

Исследования показали, что инокуляция гуара штаммами *Bradyrhizobium* spp. оказывает положительное влияние на развитие растений, значительно увеличивает количество клубеньков (до 79 %), массу растений (до 71 %), массу корней (до 262 %), урожай семян (до 53 %), содержание белка (до 33 %), клетчатки (до 26 %), повышает общее содержание азота и минеральных веществ (8, 12, 15-17). Недавно описана способность гуара образовывать симбиоз с быстрорастущими ризобиями *Ensifer aridi* (семейство *Rhizobiaceae*), также обладающими широким спектром бобовых растений-хозяев из подсемейств *Mimosoideae* и *Papilionoideae* (18). Наличие среди клубеньковых бактерий гуара представителей родов *Bradyrhizobium* и *Ensifer* — общая черта, объединяющая это растение с соей и вигной (19-21).

Для успешной интродукции гуара в России требуется (наравне с созданием новых сортов, разработкой технологий их возделывания и применения минеральных удобрений) селекция эффективных микросимбионтов этой культуры с целью создания биопрепаратов. В Индии применение минеральных азотных удобрений ограничено высокой стоимостью и низким уровнем механизации сельского хозяйства. Поэтому высокая продуктивность гуара достигается во многом благодаря наличию в почвах высокоэффективных штаммов клубеньковых бактерий. Следует подчеркнуть, что наблюдения российских селекционеров за корневой системой гуара в районах России, где его недавно начали возделывать (Краснодарский край, Крым, Астраханская и Волгоградская области и Дагестан), показали отсутствие симбиотических клубеньков.

Ранее мы выделили клубеньковые бактерии гуара, изучили их биоразнообразие и в результате охарактеризовали медленнорастущие штаммы рода *Bradyrhizobium* (22) и быстрорастущие штаммы рода *Ensifer* (неопубликованные данные).

Цель представляемой работы состояла в оценке способности образовывать эффективный симбиоз у двух перспективных штаммов ризобий родов *Bradyrhizobium* и *Ensifer* с гуаром в условиях вегетационного опыта при выращивании растений в почвах, отобранных в разных районах России и не содержащих комплементарных клубеньковых бактерий.

**Методика.** Штаммы клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium retamae* RCAM05275 (23) и *Ensifer aridi* RCAM05276 (24), которые были выделены из клубеньков гуара, охарактеризованы в предварительных экспериментах и запатентованы авторами, депонированы в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ФГБНУ ВНИИСХМ, г. Санкт-Петербург). Для обработки семян бактериями использовали инокулюм, приготовленный в лабораторных условиях в виде образца жидкого биопреперата. Посевной материал чистых культур бактерий помещали в колбы с 250 мл полусинтетической питательной среды (г/л): маннит — 10; дрожжевой экстракт — 1;  $K_2HPO_4$  — 0,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,2; NaCl — 0,1. Колбы инкубировали при 28 °С на качалке при 180 об/мин (в течение 3 сут — для штамма *E. aridi* RCAM05276, в течение 5 сут — для штамма *B. retamae* RCAM05275). По стандартной методике с соблюдением мер асептики содержимое колбы пересевали в лабораторный ферментер BIORUS 5L («BIORUS», Россия), содержащий 5 л такой же среды. Культивирование в ферментере проходило при 28 °С, интенсивности аэрации 1 л воздуха · 1 л среды<sup>-1</sup> · мин<sup>-1</sup> и перемешивании при 200 об · мин<sup>-1</sup> в течение 3 сут (штамм *E. aridi* RCAM05276) или 4 сут (штамм *B. retamae* RCAM05275). Затем бактериальные суспензии (инокулюм) помещали в стерильную тару и хранили при комнатной температуре (22–24 °С) для последующего использования.

Семена гуара сорта Кубанский Юбилейный (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 30 мин, промывали стерильной водопроводной водой и проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри при температуре 25 °С в темноте в течение 2 сут. Для вегетационного опыта использовали дерново-подзолистую почву (Albic Retisol, Abruptic, Ochric, Псковская обл.) и чернозем (Haplic Chernozem, Pachic, Воронежская обл.), отобранную летом 2017 года. Дерново-подзолистая почва была предоставлена Псковским НИИ сельского хозяйства и совхозом «Родина» (57°50'44.2" N, 28°12'03.7" E), чернозем получен в заповеднике «Каменная степь» (51°01'41.6" N, 40°43'39.3" E). Агрохимические показатели сухой почвы измеряли по стандартным методикам (25). Почву вносили в металлические сосуды по 400 г и удобряли  $K_2HPO_4$  (600 мг/кг). Проросшие семена выдерживали 1 ч в инокулюме и высаживали в сосуды (2 сосуда по 4 проростка на каждый вариант опыта). Растения культивировали в течение 106 сут в фитокомнате с относительной влажностью 60 % при 2-уровневом режиме освещенности и температуры: ночь (темнота, 18 °С, 8 ч), день (400 мклк · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup>, 23 °С, 16 ч). Для освещения использовались лампы ДНаТ (ООО «СЗЗ Лисма», Россия) и L36W/77 FLUORA («OSRAM Licht AG», Германия). Влажность почвы поддерживали на уровне 60–70 % полной влагоемкости регулярным поливом при взвешива-

нии сосудов. На 45-е сут культивирования почву дополнительно удобряли раствором  $K_2HPO_4$  (600 мг/кг).

По окончании эксперимента корни растений вместе с образовавшимися клубеньками отделяли от побегов, промывали водопроводной водой, помещали в герметичные пластиковые пробирки и добавляли ацетилен в количестве 5 % от объема пробирки для измерения биологической азотфиксации ацетиленовым методом. Для этого после инкубации пробирок при 25 °С в темноте в течение 1 ч определяли количество образовавшегося этилена на газовом хроматографе GC-2014 с ПИД-детектором (FID) и колонкой SUS 2.0 m×3.0 mm (L×ID) («Shimadzu Corporation», Япония). Анализ проводили при следующих параметрах: температура детектора — +250 °С; газ-носитель — азот; скорость потока газа-носителя — 70 мл/мин; температура инжектора — +72 °С; температура колонки — +70 °С; время анализа — 5,0 мин; время удерживания этилена —  $1,20 \pm 0,01$  мин; время удерживания ацетиленового —  $2,00 \pm 0,01$  мин.

Фотографии корней делали с использованием фотокамеры PC1742 («Cannon», Япония), клубеньков — с помощью стереомикроскопа Stemi 508 («Carl Zeiss», Германия).

Клубеньки отделяли от корней и определяли их число на каждом растении. Побеги, корни и клубеньки высушивали при комнатной температуре и взвешивали. Содержание общего азота в побегах определяли на автоматическом анализаторе Kjeltec 8200 («FOSS Analytical», Дания) по стандартной методике производителя.

Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения STATISTICA v. 10 («TIBCO Software Inc.», США). Для оценки различий между средними значениями использовали однофакторный дисперсионный анализ и критерий НСР Фишера, равенство дисперсий выборок проверяли с помощью критерия Левене (Levene's Test).

*Результаты.* Агрохимические показатели образцов сухой почвы представлены в таблице.

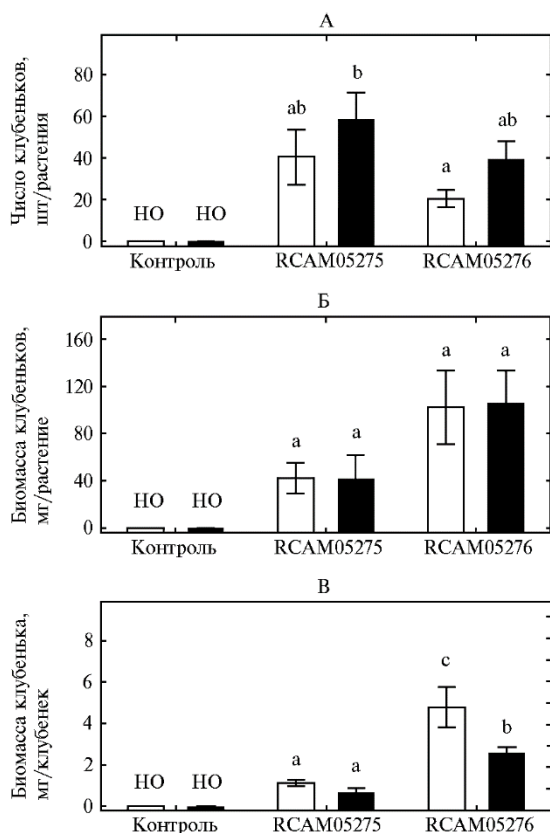
**Агрохимические показатели почв, использованных в эксперименте**

Показатель	Дерново-подзолистая	Чернозем
Массовая доля органического вещества, %	2,4	8,8
Азот общий, %	0,22	0,38
Азот аммиачный, мг N/кг	25	37
Азот нитратный, мг N/кг	9,6	26,3
Подвижный фосфор, мг $P_2O_5$ /кг	85	121
Подвижный калий, мг $K_2O$ /кг	60	155
Гидролитическая кислотность, ммоль/кг	29	18
Сумма поглощенных оснований ( $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ , $Na^+$ , $K^+$ , $NH_4^+$ ), ммоль/кг	60	372
pH <sub>H2O</sub>	6,1	7,3
pH <sub>KCl</sub>	4,9	6,2

Примечание. Дерново-подзолистая почва и чернозем отобраны в 2017 году соответственно в Псковской (57°50'44.2" N, 28°12'03.7" E) и Воронежской (51°01'41.6" N, 40°43'39.3" E) областях. Массовую долю органического вещества определяли по Тюрину; общий азот — по Кьельдалю; аммиачный азот — с реактивом Несслера (экстракция 2 % раствором KCl); нитратный азот — дисульфифеноловым методом (экстракция 0,05 % раствором  $K_2SO_4$ ); подвижный фосфор — по образованию фосфомолибденовой сини, подвижный калий — пламенно-фотометрическим методом, экстракцию из дерново-подзолистой почвы проводили 0,2 моль/л HCl, из чернозема — 10 г/л  $(NH_4)_2CO_3$ ; гидролитическую кислотность и сумму поглощенных оснований — методом Каппена, экстрагируя соответственно 1 н. раствором  $CH_3COONa \cdot 3H_2O$  и 0,1 н. раствором HCl.

Инокуляция гуара обоими штаммами привела к активному образованию клубеньков (около 20–40 шт. на растение, рис. 1, А), в то время как на корнях контрольных растений клубеньков мы не обнаружили. При выращивании растений на черноземе число клубеньков, образованных

штаммом *B. retamae* RCAM05275, было в 2,8 раза больше, чем у растений, выращенных на дерново-подзолистой почве и инокулированных штаммом *E. aridi* RCAM05276. Общая масса клубеньков на одном растении была максимальной при инокуляции *E. aridi* RCAM05276 на дерново-подзолистой почве и черноземе, однако различия между вариантами опыта не были достоверными из-за значительной вариации этого параметра (см. рис. 1, Б).



**Рис. 1.** Число клубеньков (А) и сухая биомасса клубеньков (Б) на одном растении и биомасса одного клубенька (В) на корнях гуара сорта Кубанский Юбилейный: контроль — без инокуляции, RCAM05275 — инокуляция штаммом *Bradyrhizobium retamae* RCAM05275, RCAM05276 — инокуляция штаммом *Ensifer aridi* RCAM05276; белые столбики — дерново-подзолистая почва, черные — чернозем. Вертикальные отрезки означают ошибки средних значений, но — не обнаружено. Разными латинскими буквами отмечены варианты, различия между которыми статистически значимы ( $n = 8$ , критерий НСР Фишера,  $p < 0,05$ ; лабораторный опыт).

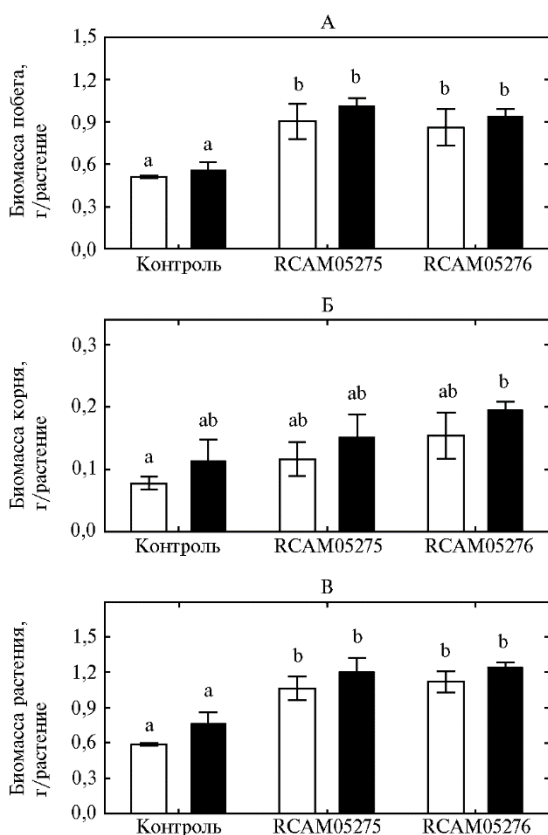
Ранее было показано, что образование клубеньков у гуара могут ингибировать высокие концентрации доступного почвенного азота (26). В использованном нами черноземе содержание разных форм азота было в 1,5–2 раза выше, чем в дерново-подзолистой почве (см. табл.). Но это не привело к ингибированию клубенькообразования, что свидетельствует

о способности обоих партнеров образовывать симбиоз при различном содержании почвенного азота.

По сравнению со штаммом *B. retamae* RCAM05275 штамм *E. aridi* RCAM05276 образовывал более крупные клубеньки на растениях (см. рис. 1, В). Максимально крупные клубеньки у штамма *E. aridi* RCAM05276 формировались на дерново-подзолистой почве. Информация о влиянии типа и состава почвы на размер симбиотических клубеньков и роль штамма ризобий в этой зависимости очень ограничена.

Известно, что растение контролирует образование (число и биомассу) и функционирование (приток фотосинтатов и транспорт азотных соединений) клубеньков (27). Число и биомасса образуемых клубеньков также существенно варьируют в зависимости от штамма микросимбионта (6, 28, 29). Процессы формирования симбиоза зависят от физико-химических свойств почвы, таких как содержание органического вещества, доступного растениям азота, кислотности и других факторов (29, 30). Большое влияние на число образуемых клубеньков оказывают аборигенные ризосферные микроорганизмы, которые модулируют гормональный статус и обеспе-

ченность растения питательными веществами и взаимодействуют с интродуцентами (31). Наблюдаемый нами феномен влияния почвы на биомассу клубенька может быть связан с несколькими перечисленными факторами и его объяснение требует более детального изучения.



**Рис. 2.** Сухая биомасса побегов (А), корней (Б) и общая биомасса растения (В) гуара сорта Кубанский Юбилейный: контроль — без инокуляции, RCAM05275 — инокуляция штаммом *Bradyrhizobium retamae* RCAM05275, RCAM05276 — инокуляция штаммом *Ensifer aridi* RCAM05276; белые столбики — дерново-подзолистая почва, черные — чернозем. Вертикальные отрезки означают ошибки средних значений. Разными латинскими буквами отмечены варианты, различия между которыми статистически значимы ( $n = 8$ , критерий НСР Фишера,  $p < 0,05$ ; лабораторный опыт).

Оба штамма повысили биомассу побегов примерно на 70 % при выращивании гуара на дерново-подзолистой почве и черноземе (рис. 2, А), но не повлияли на биомассу корней (см. рис. 2, Б). В результате биомасса всего инокулированного растения во всех вариантах опыта также была больше, чем в контроле, примерно на 60-80 % (см. рис. 2, В). Это согласуется с данными литературы о высокой отзывчивости

гуара на инокуляцию клубеньковыми бактериями, что проявлялось в увеличении биомассы надземной части растений и урожая семян (8, 11, 13).

На рисунке 3 в качестве примера представлен внешний вид надземной части, корневая система и клубеньки растений, выращенных на дерново-подзолистой почве, в день окончания эксперимента. Контрольные растения существенно уступали инокулированным в высоте и площади листьев, проявляли признаки хлороза, вероятно обусловленного дефицитом азота (рис. 3, А). Корни были хорошо развиты, разветвлены, но не имели клубеньков (см. рис. 3, Б). Оба штамма формировали клубеньки на боковых корнях, при этом встречались единичные клубеньки и группы тесно расположенных клубеньков (см. рис. 3, В, Д). Клубеньки обоих штаммов имели неправильную округлую форму и существенно варьировали по размеру (см. рис. 3, Г, Е). Розоватый цвет клубеньков свидетельствовал о наличии в них леггемоглобина, который необходим для фиксации атмосферного азота.

Инокулированные растения обладали примерно одинаковой нитрогеназной активностью независимо от штамма ризобий и типа почвы (рис. 4, А). Но удельная нитрогеназная активность, выраженная на единицу биомассы клубенька, была в 1,5-2,4 раза выше в дерново-подзолистой почве при инокуляции растений штаммом *B. etamae* RCAM05275, чем в других вариантах (см. рис. 4, Б). Вероятно, что относительно невысокая биомасса

клубеньков (см. рис. 1, Б) компенсировалась повышением эффективности функционирования азотфиксирующей системы с участием штамма *B. retamae* RCAM05275. Сравнение штаммов и измерение активности азотфиксации в этих исследованиях не проводилось, однако ранее было показано, что масса клубеньков коррелировала с накоплением азота и урожаем при сравнении 50 генотипов гуара (32). Об уровне нитрогеназной активности клубеньков гуара известно мало, но полученные нами значения были сравнимы с данными по измерению нитрогеназной активности у сои при инокуляции различными штаммами родов *Bradyrhizobium* и *Ensifer* (33, 34).

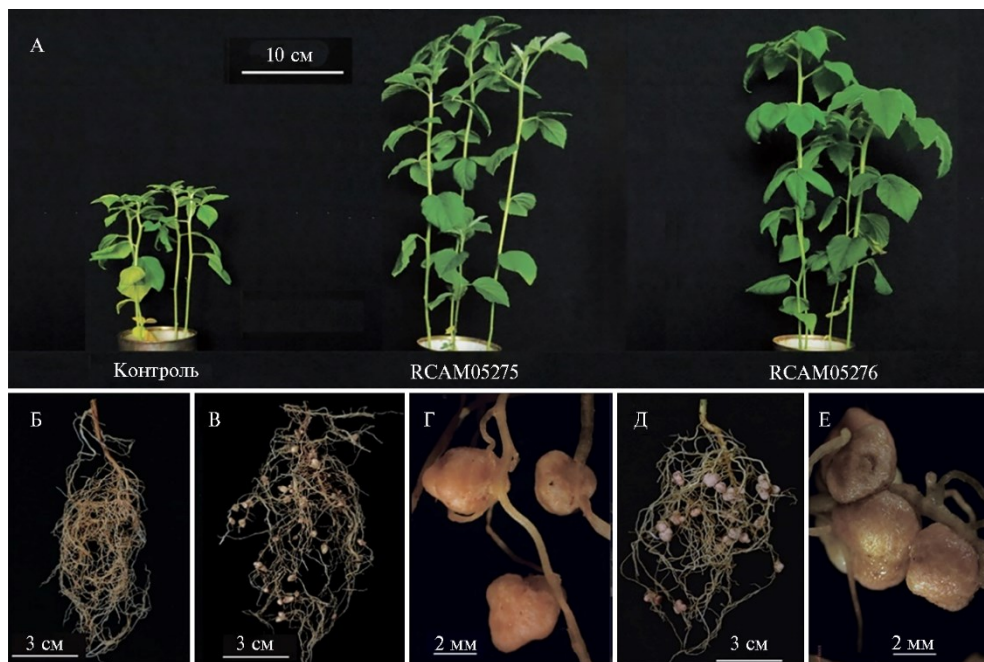
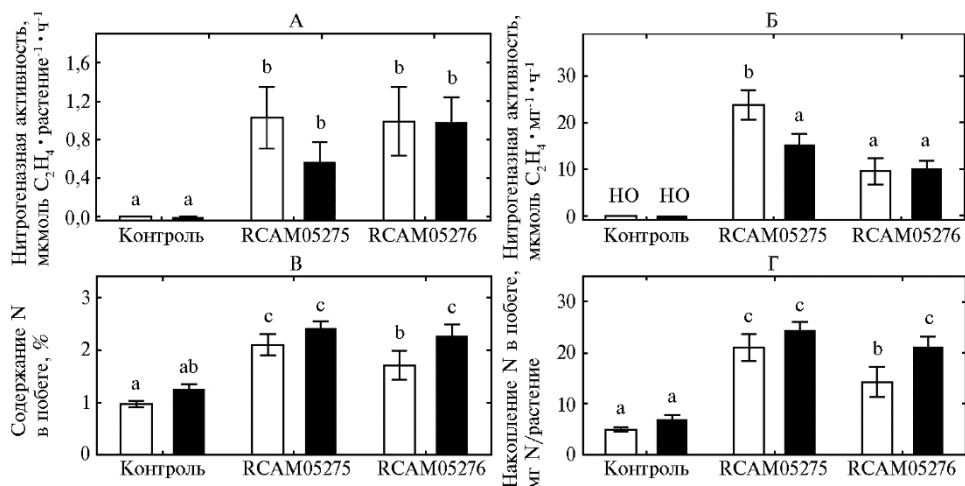


Рис. 3. Внешний вид побегов (А), корневой системы (Б, В, Д) и клубеньков (Г, Е) растений гуара сорта Кубанский Юбилейный, выращенных на дерново-подзолистой почве: Б — контроль без инокуляции, В, Г — инокуляция штаммом *Bradyrhizobium retamae* RCAM05275, Д, Е — инокуляция штаммом *Ensifer aridi* RCAM05276 (лабораторный опыт).

Об эффективном функционировании симбиоза свидетельствовало также повышение содержания общего азота примерно в 1,4 раза (см. рис. 4, В) и накопления азота — примерно в 3–4 раза (см. рис. 4, Г) в побегах инокулированных растений гуара. Эти эффекты проявились во всех вариантах опыта с минимальным значением при инокуляции выращенных на дерново-подзолистой почве растений штаммом *E. aridi* RCAM05276. Существенное повышение содержания и накопления азота в растениях гуара в результате инокуляции клубеньковыми бактериями ранее было неоднократно описано (8, 11, 12, 35). Было также показано, что в симбиозе с соей штаммы рода *Bradyrhizobium* более активно фиксировали азот, чем штаммы рода *Ensifer* (34). В наших экспериментах *B. retamae* RCAM05275 не уступал штамму *E. aridi* RCAM05276 по измеряемым параметрам симбиоза, а на дерново-подзолистой почве повысил содержание и накопление азота в растениях на 26 % по сравнению с увеличением этих показателей под влиянием штамма *E. aridi* RCAM05276 (см. рис. 4, В, Г). В среднем для всех вариантов опыта биомасса отдельного клубенька отрицательно коррелировала с содержанием азота в побегах ( $r = -0,98$ ;  $p = 0,019$ ;  $n = 4$ ), что свидетельствует о более высокой эффективности мелких клубеньков, которые образовывал штамм *B. retamae* RCAM05275.



**Рис. 4.** Нитрогеназная (ацетилен-редуктазная) активность растения (А), удельная нитрогеназная активность на единицу биомассы клубенька (Б), содержание (В) и накопление (Г) общего азота в побегах гуара сорта Кубанский Юбилейный: контроль — без инокуляции, RCAM05275 — инокуляция штаммом *Bradyrhizobium retamae* RCAM05275, RCAM05276 — инокуляция штаммом *Ensifer aridi* RCAM05276; белые столбики — дерново-подзолистая почва, черные — чернозем. Вертикальные отрезки означают ошибки средних значений. Разными латинскими буквами отмечены варианты, различия между которыми статистически значимы ( $n = 8$ , критерий НСР Фишера,  $p < 0,05$ ; лабораторный опыт).

Таким образом, оба штамма — *B. retamae* RCAM05275 и *E. aridi* RCAM05276 способны формировать эффективный симбиоз с гуаром при выращивании растений в дерново-подзолистой почве и черноземе, отобранных в разных районах Российской Федерации и не содержащих комплементарных клубеньковых бактерий. В основном штаммы имели сходство по параметрам образования клубеньков и эффективности симбиоза. Однако также выявлены характерные особенности штаммов во взаимодействии с растениями гуара, что выражалось в различиях по числу клубеньков, удельной нитрогеназной активности и интенсивности обеспечения растений азотом. Полученные нами результаты показали перспективность дальнейших испытаний изучаемых штаммов в полевых экспериментах с целью создания биопрепаратов для улучшения азотного питания растений гуара.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Лебедь Д.В., Костенкова Е.В., Волошин М.И. Агрономическое обоснование размещения посевов *Suatopsis tetragonoloba* L. на юге европейской части России. *Таврический вестник аграрной науки*, 2017, 1(9): 53-63.
2. Старцев В.И., Ливанская Г.А., Куликов М.А. Перспективы возделывания гуара *Suatopsis tetragonoloba* L. в России. *Вестник Российского государственного аграрного заочного университета*, 2017, 24(29): 11-15.
3. Вавилов Н.И. *Интродукция растений в советское время и ее результаты. Избранные труды.* М.-Л., 1965, т. V: 674-689.
4. Волошин М.И., Лебедь Д.В., Брусенцов А.С. Результаты интродукции нового бобового растения — гуара (*Suatopsis tetragonoloba* (L.) Taub.). *Труды Кубанского государственного аграрного университета*, 2016, 1(58): 84-91.
5. Булынецов 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»*. Пос. Персиановский, 2017: 167-172.
6. Берестецкий О.А., Доросинский Л.М., Кожемяков А.П. Эффективность препаратов клубеньковых бактерий в географической сети опытов. *Известия АН СССР, Серия биологическая*, 1987, 5: 670-679.
7. Кожемяков А.П., Лактионов Ю.В., Попова Т.А., Орлова А.Г., Кокорина А.Л., Вайшла О.Б., Агафонов Е.В., Гужвин С.А., Чураков А.А., Яковлева М.Т. Агротехнологические



- основы создания усовершенствованных форм микробных биопрепаратов для земледелия. *Сельскохозяйственная биология*, 2015, 50(3): 369-376 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.3.369rus).
8. Elsheikh E.I.A.E., Ibrahim K.A. The effect of *Bradyrhizobium* inoculation on yield and seed quality of guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.). *Food Chemistry*, 1999, 65(2): 183-187 (doi: 10.1016/S0308-8146(98)00192-7).
  9. Ibrahim K., Suliman K.H., Abdalla A.A., Mohamed E.A., Ahmed A.I., Mukhtar S. Response of growth, yield and seed quality of guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) to *Bradyrhizobium* inoculations. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2011, 10(9): 805-813 (doi: 10.3923/pjn.2011.805.813).
  10. 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).
  11. Weaver R.W., Arayangkoon T., Schomber H.H. Nodulation and N<sub>2</sub> fixation of guar at high root temperature. *Plant and Soil*, 1990, 126(2): 209-213 (doi: 10.1007/BF00012824).
  12. Stępkowski 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. *Systematic and American Deserts. BMC Genomics*, 2017, 18(1): 1-24 (doi: 10.1186/s12864-016-3447-y).
  13. Vinuesa P., Leyn-Barrios M., Silva C., Willems A., Jarabo-Lorenzo A., Pérez-Galdona R., Werner D., Martínez-Romero E. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (*Papilionoideae: Genisteeae*) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. genistearum, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(2): 569-575 (doi: 10.1099/ijs.0.63292-0).
  14. 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 Microbiology Letters*, 2008, 285(2): 146-154 (doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01169.x).
  15. Elnesairy N.N., Abubaker J.A., Mahmod H., Mukhtar N. The impact of *Bradyrhizobium*, farmyard manure and inorganic nitrogen on growth and yield of guar. *World Journal of Agricultural Research*, 2016, 4(2): 56-63 (doi: 10.12691/wjar-4-2-4).
  16. Ibrahim K.A., Suliman K.H., Abdalla A.A. Influence of inoculation with some *Bradyrhizobium* strains on yield attributes, seed proximate composition and minerals content of guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) grown in Sudan. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2010, 4(5): 808-816.
  17. Ibrahim K.A., Naeim E.A.M., Naim A.M.E., Elsheikh M.A. Response of Guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) to *Bradyrhizobium* inoculations in semi-arid environment. *International Journal of Agriculture and Forestry*, 2016, 6(4):137-141 (doi: 10.5923/j.ijaf.20160604.01).
  18. Le Quéré A., Tak N., Gehlot H.S., Lavire C., Meyer T., Chapulliot D., Rath S., Sakrouhi I., Rocha G., Rohmer M., Severac D., Filali-Maltouf A., Munive J. A. Genomic characterization of *Ensifer aridi*, a proposed new species of nitrogen-fixing rhizobium recovered from Asian, African and American deserts. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 1-24 (doi: 10.1186/s12864-016-3447-y).
  19. Chen W.X., Yan G.H., Li J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1988, 38(4): 392-397 (doi: 10.1099/00207713-38-4-392).
  20. Ondieki D.K., Nyaboga E.N., Wagacha J.M., Mwaura F.B. Morphological and genetic diversity of rhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L.) from agricultural soils of Lower Eastern Kenya. *International Journal of Microbiology*, 2017, 2017: 8684921 (doi: 10.1155/2017/8684921).
  21. Yan H., Yan J., Sui X.H., Wang E.T., Chen W.X., Zhang X.X., Chen W.F. *Ensifer glycinis* sp. nov., a rhizobial species associated with species of the genus *Glycine*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(8): 2910-2916 (doi: 10.1099/ijsem.0.001120).
  22. Кузнецова И.Г., Сазанова А.Л., Сафронова В.И., Попова Ж.П., Соколова Д.В., Тихомирова Н.Ю., Оследкин Ю.С., Карлов Д.С., Белимов А.А. Выделение и идентификация клубеньковых бактерий гуара *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. *Сельскохозяйственная биология*, 2018, 53(6): 1285-1293 (doi: 10.15389/agrobiology.2018.6.1285rus).
  23. Белимов А.А., Кузнецова И.Г., Потоккина Е.К., Сазанова А.Л., Сафронова В.И. *Штамм клубеньковых бактерий гуара *Bradyrhizobium retamae* — стимулятор азотфиксирующей способности гуара. МПК: C12N 1/20, A01N 63/20, C05F 11/08, C12R 1/01. Федеральное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (РУ). № 2734836. Заявка: 2020100530 от 09.01.2020. Опубл. 23.10.2020. Бюл. № 30.*
  24. Белимов А.А., Кузнецова И.Г., Потоккина Е.К., Сазанова А.Л., Сафронова В.И. *Штамм клубеньковых бактерий гуара *Ensifer aridi* RCAM05276 — азотфиксирующий симбионт гуара. МПК: C12N 1/20, A01N 63/20, C05F 11/08, C12R 1/01. Федеральное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (РФ). № 2734836. Заявка: 2020100529 от 09.01.2020. Опубл. 20.11.2020.*

25. Аринушкина Е.В. *Руководство по химическому анализу почвы*. М., 1970.
26. Hinson P.O., Adams C.B. Quantifying tradeoffs in nodulation and plant productivity with nitrogen in guar. *Industrial Crops and Products*, 2020, 153: 112617 (doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112617)
27. Ferguson B.J., Mens C., Hastwell A.H., Zhang M., Su H., Jones C.H., Chu X., Gresshoff P.M. Legume nodulation: The host controls the party. *Plant, Cell & Environment*, 2019, 42(1): 41-51 (doi: 10.1111/pce.13348)
28. de Almeida Ribeiro P.R., dos Santos J.V., da Costa E.M., Lebbe L., Assis E.S., Louzada M.O., Guimaraes A.A., Willems A., de Souza Moreira F.M. Symbiotic efficiency and genetic diversity of soybean Bradyrhizobia in Brazilian soils. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2015, 212: 85-93 (doi: 10.1016/j.agee.2015.06.017).
29. Thilakarathna M.S., Raizada M.N. A meta-analysis of the effectiveness of diverse rhizobia inoculants on soybean traits under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 105: 177-196 (doi: 10.1016/j.soilbio.2016.11.022).
30. Zahran H.H. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, 63(4): 968-989 (doi: 10.1128/MMBR.63.4.968-989.1999).
31. Zeffa D.M., Fantin L.H., Koltun A., de Oliveira A., Nunes M., Canteri M.G., Gonçalves L. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on co-inoculation with *Bradyrhizobium* in soybean crop: a meta-analysis of studies from 1987 to 2018. *PeerJ*, 2020, 8: e7905 (doi: 10.7717/peerj.7905).
32. Shrestha R., Adams C.B., Ravelombola W., MacMillan J., Trostle C., Ale S., Hinson P. Exploring phenotypic variation and associations in root nodulation, morphological, and growth character traits among 50 guar genotypes. *Industrial Crops and Products*, 2021, 171: 113831 (doi: 10.1016/j.indcrop.2021.113831).
33. Salvagiotti F., Cassman K.G., Specht J.E., Walters D.T., Weiss A., Dobermann A. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: a review, *Field Crops Research*, 2008, 108(1): 1-13 (doi: 10.1016/j.fcr.2008.03.001).
34. Habibi S., Ayubi A.G., Ohkama-Ohtsu N., Sekimoto H., Yokoyama T. Genetic characterization of soybean rhizobia isolated from different ecological zones in North-Eastern Afghanistan. *Microbes and Environments*, 2017, 32(1): 71-79 (doi: 10.1264/jsme2.ME16119).
35. MacMillan J., Adams C.B., Trostle C., Rajan N. Testing the efficacy of existing USDA *Rhizobium* germplasm collection accessions as inoculants for guar. *Industrial Crops and Products*, 2021, 161: 113205 (doi: 10.1016/j.indcrop.2020.113205).

*1ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,*

196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,  
e-mail: p.ulianich@gmail.com, belimov@rambler.ru ✉,  
kuznetsova\_rina@mail.ru, anna\_sazanova@mail.ru, yuzikhin@gmail.com,  
Laktionov@list.ru, makondo07@gmail.com, v.safronova@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: m.vishnyakova.vir@gmail.com

*Поступила в редакцию  
3 декабря 2021 года*

*Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2022, V. 57, № 3, pp. 555-565

## EFFECTIVENESS OF NITROGEN-FIXING SYMBIOSIS OF GUAR (*Cyamopsis tetragonoloba*) WITH STRAINS *Bradyrhizobium retamae* RCAM05275 AND *Ensifer aridi* RCAM05276 IN POT EXPERIMENT

*P.S. Ulianich<sup>1</sup>, A.A. Belimov<sup>1</sup> ✉, I.G. Kuznetsova<sup>1</sup>, A.L. Sazanova<sup>1</sup>, O.S. Yuzikhin<sup>1</sup>,  
Yu.V. Laktionov<sup>1</sup>, D.S. Karlov<sup>1</sup>, M.A. Vishnyakova<sup>2</sup>, V.I. Safronova<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail p.ulianich@gmail.com, belimov@rambler.ru (✉ corresponding author), kuznetsova\_rina@mail.ru, anna\_sazanova@mail.ru, yuzikhin@gmail.com, Laktionov@list.ru, makondo07@gmail.com, v.safronova@rambler.ru;

<sup>2</sup>Federal Research Center Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42-44, ul. Bol'shaya Morskaya, St. Petersburg, 190000 Russia, e-mail m.vishnyakova.vir@gmail.com

ORCID:

Ulianich P.S. [orcid.org/0000-0002-2768-505X](https://orcid.org/0000-0002-2768-505X)

Belimov A.A. [orcid.org/0000-0002-9936-8678](https://orcid.org/0000-0002-9936-8678)

Kuznetsova I.G. [orcid.org/0000-0003-0260-7677](https://orcid.org/0000-0003-0260-7677)

Sazanova A.L. [orcid.org/0000-0003-0379-6975](https://orcid.org/0000-0003-0379-6975)

Yuzikhin O.S. [orcid.org/0000-0002-1818-9230](https://orcid.org/0000-0002-1818-9230)

Laktionov Yu.V. [orcid.org/0000-0001-6241-0273](https://orcid.org/0000-0001-6241-0273)

Karlov D.S. [orcid.org/0000-0002-9030-8820](https://orcid.org/0000-0002-9030-8820)

Vishnyakova M.A. [orcid.org/0000-0003-2808-7745](https://orcid.org/0000-0003-2808-7745)

Safronova V.I. [orcid.org/0000-0003-4510-1772](https://orcid.org/0000-0003-4510-1772)

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The authors thank Yu.V. Khomyakov (Agrophysical Research Institute, St. Petersburg) for carrying out the agro-chemical analysis of soils and E.E. Andronov (All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg) for help in photographing the nodules. Supported financially by Russian Science Foundation, project No. 21-16-00084

Received December 3, 2021

doi: 10.15389/agrobiology.2022.3.555eng

## Abstract

Legume plant guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) is a source of guar gum, a complex of polysaccharides that is used in various industries. This crop is widely cultivated mainly in India and Pakistan, but in recent years there has been an increasing interest in the industrial cultivation of guar in the southern regions of Russia. One of the problems of introducing this culture into Russian agriculture is the absence in the soil of bacteria that can form symbiotic nodules on the roots of guar in the soil-climatic conditions of the Russian Federation. One of the problems of the introduction of this crop into the agriculture of the Russian Federation is the absence of bacteria capable of forming symbiotic nodules on guar roots under environmental conditions of Russia. In the present work, the first data on the efficiency of inoculation with nodule bacteria of guar growing in the soils of Russia were obtained. The aim of this work was to evaluate the effectiveness of promising rhizobial strains of guar *Bradyrhizobium retamae* RCAM05275 and *Ensifer aridi* RCAM05276 when growing plants in soils selected in the regions of the Russian Federation and not containing the corresponding nodule bacteria. To inoculate the seeds of guar variety Kubanskiy Yubileiny, inoculums in the form of aqueous suspensions of bacteria were used. Inoculums were obtained according to the standard procedure for the preparation of liquid biopreparations of nodule bacteria. The effectiveness of symbiosis was studied in a pot experiment with growing plants in sod-podzolic soil and chernozem. Inoculation with both strains resulted in active formation of nodules (about 20-40 nodules per plant), while no nodules were found on the roots of control uninoculated plants. The number of nodules per plant was maximal in the variants of inoculation with the strain *B. retamae* RCAM05275. The values of the total mass of nodules per plant were maximum in the variants of inoculation with the strain *E. aridi* RCAM05276 due to the formation of larger nodules. The nodules formed on lateral roots had a rounded irregular shape, pinkish color (evidence of the presence of leghemoglobin in them) and significantly varied in size. Both strains increased the biomass of shoots and the whole plant by about 70% when growing plants on sod-podzolic soil and chernozem, but did not affect the biomass of the roots. The inoculated plants had approximately the same nitrogenase activity regardless of the rhizobia strain and soil type. The specific nitrogenase activity (per nodule biomass) was approximately 2 times higher than in other variants when plants were inoculated with the strain *B. retamae* RCAM05275 in sod-podzolic soil. In all variants of the experiment, an approximately 1.4-fold increase in the total nitrogen content and a 3-4-fold increase in nitrogen accumulation in the shoots of inoculated plants were revealed. Thus, the first data on the efficiency of inoculation with nodule bacteria of the guar cultivated in Russian soils have been obtained. Both studied strains were able to form nitrogen-fixing symbiosis, which led to a significant increase in plant biomass and accumulation of nitrogen in shoots. The results showed the promise of further research on testing strains in field experiments in order to create biopreparations to improve the nitrogen nutrition of this crop.

Keywords: nitrogen fixation, guar, nodulation, symbiosis, *Cyamopsis tetragonoloba*.