

ВПЛИВ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ КОЗЛЯТНИКА НА ФОРМУВАННЯ І ФУНКЦІОНУВАННЯ СИМБІОЗУ СОЯ – *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* 634Б

Н. М. Мельникова, С. Я. Коць

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
вул. Васильківська, 31/17; м. Київ, 03022, Україна; e-mail: mnn_knu@ukr.net

Мета. Дослідити характер бульбочкоутворення у процесі формування симбіотичної системи соя – *Bradyrhizobium japonicum* 634б, азотфіксувальну активність симбіозу та особливості росту і розвитку рослин за впливу ризобій козлятника. **Методи.** Мікробіологічні, фізіологічні, газової хроматографії, статистичні. **Результати.** В умовах вегетаційного дослідження за вирощування рослин у піщаній культурі змішані бактеріальні композиції, до складу яких входили бульбочкові бактерії сої *Bradyrhizobium japonicum* 634б та козлятника *Rizobium galegae* 0702 або *R. galegae* 0703 у співвідношенні 1 : 1, відрізнялись від монокультури брадиризобій за характером впливу на бульбочкоутворення, азотфіксувальну активність соєво-ризобіального симбіозу та розвиток рослин сої сорту Алмаз. Підвищення нодуляційної активності у фазі примордіальних листків та бутонізації, а також суттєве зниження рівня азотфіксації симбіозу під час бутонізації спостерігали за використання у бінарних бактеріальних композиціях штаму *R. galegae* 0703. Зазначені ризобії козлятника пригнічували розвиток кореневої системи сої, проте не мали суттєвого впливу на формування надземної частини рослин протягом усього періоду спостереження. Штам *R. galegae* 0702 децю уповільнював бульбочкоутворення брадиризобіями у фазу примордіальних листків, що зумовило зменшення кількості рослин сої, які утворили симбіоз з *B. japonicum* 634б. Бульбочкові бактерії козлятника *R. galegae* 0702 покращували формування кореневої системи, а також стимулювали ріст і розвиток надземної частини макросимбіонта у фазу двох трійчастих листків. **Висновки.** Ризобії козлятника за сумісної інокуляції з бульбочковими бактеріями *B. japonicum* 634б виявили різноспрямовану дію на формування симбіозу рослинами сої сорту Алмаз та функціонування соєво-ризобіального симбіозу. Характер впливу мікроорганізмів *R. galegae* залежав від їх штамової належності.

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium galegae*, соя, симбіоз, азотфіксація, бульбочкоутворення, розвиток рослин.

Вступ. Серед численних видів ґрунтових мікроорганізмів, що оточують насіння і містяться в прикореневій зоні бобових рослин, найбільше значення мають бульбочкові бактерії, які здатні у симбіозі з рослиною відновлювати атмосферний азот, перетворюючи його у доступні азотовмісні сполуки. Бобово-ризобіальний симбіоз — це потужне джерело біологічного азоту, використання якого у сільськогосподарському виробництві дозволяє зменшити собівартість продукції та підвищити рівень екологічної безпеки зі збереженням високих показників врожайності

цінних сільськогосподарських культур, що особливо важливо в умовах сталого розвитку. Одним із перспективних шляхів покращення формування і функціонування симбіотичних азотфіксувальних систем, зокрема сої, як цінної сільськогосподарської культури, є розробка і застосування бактеріальних препаратів комплексної дії, до складу яких входять специфічні бульбочкові бактерії та ризосферні мікроорганізми з рістстимулювальними властивостями. За допомогою різних механізмів ризобактерії можуть модулювати процеси, які спричинюють утворення бобо-

во-ризобіальних симбіозів [1], підвищуючи їх ефективність та продуктивність [2; 3]. Разом з іншими мікроорганізмами прикореневої зони бульбочкові бактерії беруть активну участь у збагаченні ґрунтів мінеральними елементами, у регуляції рівня фітопатогенів, синтезують низку біологічно активних речовин, покращуючи у такий спосіб ріст і розвиток рослин [4; 5].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Дослідження останніх років вказують на те, що симбіотичним азотфіксаторам, як і ризобактеріям, притаманна рістстимулювальна активність, а отже бульбочкові бактерії здатні покращувати ріст і розвиток бобових і небобових рослин [4; 5], забезпечуючи їх живлення, зокрема за рахунок фіксації атмосферного азоту [1] і мобілізації фосфору [6] з важкодоступних сполук, а також синтезуючи фітогормони [7; 8], сидерофори [9] і сполуки з антагоністичною дією [10] та за допомогою інших механізмів [1]. Зазначені властивості ризобій дозволяють розглядати їх як компонент бактеріальних композицій для інокуляції рослин з метою створення ефективного бобово-ризобіального симбіозу та підвищення його продуктивності. Поєднання гомо- та гетерологічних штамів бульбочкових бактерій в інокуляційній суспензії може бути дієвим технологічним підходом, який дозволить активізувати бульбочкоутворення на коренях бобових рослин та покращити формування надземної маси рослин [11]. У той же час сумісне застосування гомологічних ризобій часто призводить до зниження активності бобово-ризобіального симбіозу [12]. Бульбочкові бактерії *R. galegae* — це маловивчена група мікроорганізмів. Однак їх стійкість до дії стресових чинників навколишнього середовища, здатність продукувати значну кількість полісахаридів та інші властивості [13; 14] дають підстави для поглибленого вивчення цих ризобій і їх залучення під час створення бактеріальних композицій для інокуляції бобових культур, зокрема змішаних культур на основі гомо- і гетерологічних штамів бульбочкових бактерій. Актуальність таких досліджень полягає також у необхідності вивчення впливу ненодулюючих і гетерологічних симбіотичних азотфіксаторів, які можуть перебувати у ризосфері бобових рослин, на формування симбіотичних азотфіксувальних систем.

Мета досліджень. Дослідити характер бульбочкоутворення за формування симбіотичної системи соя – *Bradyrhizobium japonicum* 6346, азотфіксувальну активність симбіозу та особливості росту і розвитку рослин за впливу ризобій козлятника.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проводили із залученням бульбочкових бактерій сої *Bradyrhizobium japonicum* 6346 та козлятника східного *Rhizobium (Neorhizobium) galegae* 0702, 0703 (зберігаються у Всеросійській колекції непатогенних мікроорганізмів сільськогосподарського призначення ГНУ Всеросійського науково-дослідного інституту сільськогосподарської мікробіології РАН (С.-Петербург, Росія)). Модельною рослиною під час формування бобово-ризобіального симбіозу була соя *Glycine max* (L.) Merr. сорту Алмаз (селекція Полтавської аграрної академії).

Мікроорганізми вирощували на манітно-дріжджовому агаризованому середовищі до початку стаціонарної фази росту мікробної культури за температури 28 °С. Бактеріальні суспензії готували шляхом змиву біомаси мікроорганізмів з поверхні живильного середовища стерильним фізіологічним розчином та ретельно суспендували. Оптичну густину суспензій для визначення титру ризобій вимірювали за допомогою спектрофотометра BIORAD SmartSpectPlus (США). Кількість мікроорганізмів в 1 мл складала 10^8 клітин. Для інокуляції насіння сої використовували змішані культури бульбочкових бактерій із співвідношенням компонентів 1 : 1. У разі монокультури ризобій сої (контроль) до суспензії мікроорганізмів додавали фізіологічний розчин.

Вплив бактерій *R. galegae* на формування і функціонування симбіозу соя – *B. japonicum* 6346 вивчали у вегетаційних експериментах на базі Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Рослини вирощували у посудинах Вагнера, наповнених промитим річковим піском з додаванням середовища Гельрігеля зі стартовою дозою азоту 0,2 норми, за природних умов освітлення та температури протягом травня-липня. Вологість субстрату підтримували на рівні 60 % від його повної вологоємності. Насіння поверхнево стерилізували 10 % перекисом водню і ретельно промивали стерильною водою. Після цього його інокулювали підготовленими су-

спензіями бульбочкових бактерій протягом години і висівали. Контрольні рослини інокулювали культурою бульбочкових бактерій без додаванням ризобій козлятника.

Рослини відбирали у фази: примордіальних листків (V_C), двох трійчастих листків (V₂) та бутонізації (V₃–V₄). Оцінювали кількість бульбочок, їх масу, а також масу рослин. Азотфіксувальну активність кореневих бульбочок вимірювали за допомогою ацетиленового методу [15] у модифікації [16] на газовому хроматографі «Agilent GC system 6850» (США) з полум'яно-іонізаційним детектором. Розділення газів проводили на колонці Supelco Porapak N за температури термостата 55 °С і детектора 150 °С. Як газ-носії використовували гелій (20 мл/хв). Об'єм аналізованої проби складав 1 см³.

Повторність дослідів — трикратна.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за Доспеховим [17]. Достовірність відмінностей між варіантами оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента за $p < 0,05$. На рисунку і в таблицях наведено результати досліджень, представлені як середнє арифметичне та похибка середнього арифметичного.

Результати та їх обговорення. Експериментальні дані свідчать, що штами бульбочкових бактерій козлятника за характером

впливу на формування і функціонування соєво-ризобіального симбіозу відрізняються між собою. Так, ризобії *R. galegae* 0702 у фазу примордіальних листків уповільнювали бульбочкоутворення на коренях сої, інокульованої змішаною бактеріальною культурою, до складу якої, окрім бульбочкових бактерій козлятника, входили також *B. japonicum* 6346 (рисунок), викликаючи зменшення кількості рослин, на яких утворилися бульбочки, проти контролю.

Водночас штам *R. galegae* 0703 сприяв нодуляції, на що вказує тенденція до збільшення числа корневих бульбочок, яку спостерігали у період розвитку примордіальних листків у сої (табл. 1). Суттєва активізація процесів бульбочкоутворення в процесі формування соєво-ризобіального симбіозу за інокуляції рослин бінарною композицією з бульбочковими бактеріями *R. galegae* 0703 відзначена також у фазу бутонізації (табл. 1). Проте азотфіксувальна активність симбіотичної системи соя – *B. japonicum* 6346 була в 1,5 раза нижчою проти контролю (табл. 2). Бульбочкові бактерії козлятника *R. galegae* 0703 також пригнічували розвиток коренів (табл. 2). Штам *R. galegae* 0702, навпаки, не чинив позитивного впливу на формування бульбочок та їх азотфіксувальну активність. Однак, зазначені ризобії козлятника сприяли

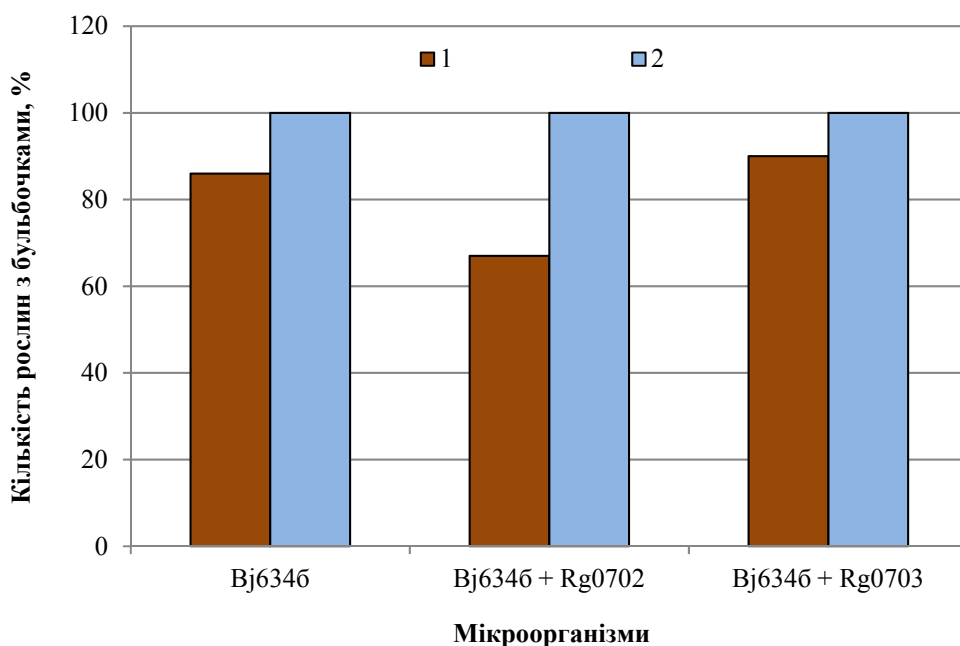


Рис. Активність бульбочкоутворення на коренях сої за змішаної інокуляції рослин гомота гетерологічними ризобіями.

Примітка: 1 — фаза примордіальних листків (V_C); 2 — фаза двох трійчастих листків (V₂); Bj6346 — *B. japonicum* 6346; Rg0702 — *R. galegae* 0702; Rg0703 — *R. galegae* 0703.

Таблиця 1. Бульбочкоутворення та формування надземної частини сої за інокуляції змішаними культурами гомо- і гетерологічних ризобій протягом різних фаз розвитку рослин**

Мікроорганізми	Кількість бульбочок, од./рослину	Суха маса надземної частини рослини, г
Фаза примордіальних листків (V _C)		
<i>B. japonicum</i> 6346	4,1 ± 0,5	0,21 ± 0,01
<i>B. japonicum</i> 6346 + <i>R. galegae</i> 0702	3,1 ± 0,5	0,22 ± 0,01
<i>B. japonicum</i> 6346 + <i>R. galegae</i> 0703	5,3 ± 0,6	0,20 ± 0,01
Фаза двох трійчастих листків (V ₂)		
<i>B. japonicum</i> 6346	18,7 ± 1,9	0,56 ± 0,02
<i>B. japonicum</i> 6346 + <i>R. galegae</i> 0702	20,5 ± 2,7	0,69 ± 0,03*
<i>B. japonicum</i> 6346 + <i>R. galegae</i> 0703	13,7 ± 1,5	0,60 ± 0,02
Фаза бутонізації (V ₃ –V ₄)		
<i>B. japonicum</i> 6346	22,7 ± 1,6	1,10 ± 0,02
<i>B. japonicum</i> 6346 + <i>R. galegae</i> 0702	21,8 ± 1,5	1,11 ± 0,04
<i>B. japonicum</i> 6346 + <i>R. galegae</i> 0703	30,0 ± 2,1*	1,02 ± 0,05

Примітка: у таблицях 1 і 2: * — різниця з контролем достовірна за $p < 0,05$; ** — проаналізовано по 14–24 рослин.

Таблиця 2. Вплив бактерій *R. galegae* на розвиток бульбочок і кореневої системи рослин за формування симбіозу соя – *B. japonicum* 6346 та на його азотфіксувальну активність (фаза бутонізації (V₃–V₄))**

Мікроорганізми	Суха маса кореня, г	Азотфіксувальна активність, мкмоль С ₂ Н ₄ / (г бульбочок × год)***	Маса бульбочок, г/рослину
<i>B. japonicum</i> 6346	0,24 ± 0,01	30,5 ± 3,3	0,22 ± 0,01
<i>B. japonicum</i> 6346 + <i>R. galegae</i> 0702	0,28 ± 0,01*	31,1 ± 1,7	0,21 ± 0,01
<i>B. japonicum</i> 6346 + <i>R. galegae</i> 0703	0,21 ± 0,01*	20,3 ± 1,4*	0,20 ± 0,01

Примітка: *** — азотфіксувальну активність визначали у шестикратній повторності.

формуванню надземної частини рослин сої у фазу двох трійчастих листків (табл. 1) та кореневої системи (табл. 2), про що свідчить збільшення їх сухої маси. Слід зазначити, що в умовах проведення наших досліджень бульбочкові бактерії козлятника у складі змішаної бактеріальної культури на основі

B. japonicum 6346 не впливали на масу кореневих бульбочок (табл. 2).

Літературні дані вказують на те, що використання комплексних бактеріальних препаратів, до складу яких входять ризосферні мікроорганізми з рістстимулювальною активністю, що належать до різних видів і родів,

сприяє більшою мірою реалізації симбіотичного потенціалу мікро- і макросимбіонтів, якщо порівняти з моноінокуляцією бульбочковими бактеріями, що корелює із збільшенням маси бобових рослин та підвищенням їх урожайності [2; 3]. Зазвичай змішані бактеріальні культури містять у своєму складі специфічні бобовим рослинам бульбочкові бактерії та мікроорганізми, виділені із прикореневої зони, які активізують ростові процеси у рослин за рахунок прямих і непрямих механізмів, а саме: продукуючи біологічно активні речовини, забезпечуючи макроорганізм мінеральними сполуками тощо [1]. Створення і використання поліризобіальних композицій для інокуляції бобових рослин сьогодні може розглядатися як перспективний напрям у технології підвищення ефективності симбіотичних азотфіксуючих систем, оскільки бульбочковим бактеріям притаманні властивості, які обумовлюють рістстимулювальну активність ризосферних мікроорганізмів [4; 5]. Інокуляція бобових рослин сумішшю гомологічних ризобій в одних випадках сприяла формуванню бобово-ризобіального симбіозу [18], тоді як в інших такого ефекту не спостерігалось [19], що може бути пов'язано з конкуренцією між різними штамми мікроорганізмів за сайти зв'язування на поверхні кореня. Поєднання ж в інокулюмі гомо- і гетерологічних бульбочкових бактерій може більшою мірою підвищувати ефективність симбіопартнерів, як було показано на прикладі рослин квасолі [11]. У наших дослідженнях ризобії козлятника як гетерологічні мікроорганізми виявили здатність змінювати спрямованість процесів формування і функціонування симбіозу соя – *V. japonicum* 634б. Проте характер їх дії мав штамову залежність. Бульбочкові бактерії *R. galegae* 0702 негативно впливали на бульбочкоутворення на початкових етапах становлення симбіотичного кооперування, проте сприяли формуванню маси рослин протягом наступних фаз розвитку рослин (рис., табл. 1 і 2). Водночас ризобії *R. galegae* 0703 загалом стимулювали процеси нодуляції, однак у змішаній культурі з *V. japonicum* 634б вони пригнічували азотфіксуювальну активність і розвиток кореневої системи сої (рис., табл. 1 і 2).

Було показано, що мікросимбіонт козлятника може продукувати ауксини, відзнача-

ється рістстимулювальною дією [20], продукує значну кількість полісахаридів та має інші властивості [14], які можуть визначати їх вплив на розвиток соєво-ризобіального симбіозу у наших дослідах. Ймовірно, при використанні бактеріальних суспензій *V. japonicum* 634б і *R. galegae* 0702, 0703 із високими титрами слід очікувати більш вираженої позитивної дії цих мікроорганізмів на формування і функціонування симбіотичних систем сої. Результати досліджень впливу змішаних ризобіальних культур на розвиток симбіозу у квасолі показали існування тісної кореляції між кількістю інокулюму і приростом надземної маси рослин, а також активністю бульбочкоутворення і накопиченням азоту у біомасі [11]. Крім того, важливим фактором серед інших, які визначають ефективність соєво-ризобіального симбіозу за інокуляції рослин змішаними бактеріальними культурами із залученням симбіотичних азотфіксаторів козлятника, може бути сортова належність макросимбіонта.

Висновки. Ризобії козлятника за сумісної інокуляції з бульбочковими бактеріями *V. japonicum* 634б виявили різноспрямовану дію на формування симбіозу рослинами сої сорту Алмаз і функціонування соєво-ризобіального симбіозу. Характер впливу *R. galegae* залежав від штамової належності мікроорганізмів. Доцільність використання бульбочкових бактерій козлятника у змішаних бактеріальних композиціях може бути встановлена після проведення додаткових досліджень із залученням різних сортів сої та штамів *V. japonicum*, зміною бактеріального навантаження та модифікацією інших умов проведення експериментів. Поглибленого вивчення також потребують властивості ризобій козлятника, що дозволить активно використовувати ці бульбочкові бактерії в процесі створення бактеріальних препаратів комплексної дії для бобових і небобових культур.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Мельникова Н. Н., Михалкив Л. М., Омельчук С. В., Береговенко С. К. Ризосферные микроорганизмы как фактор регулирования формирования бобово-ризобиального симбиоза. *Физиология растений и генетика*. 2018. Т. 50, № 4. С. 299–231. <https://doi.org/10.15407/frg2018.04.299>
2. Queiroz Rego C. H., Cardoso F. B., da Silva Cândido A. C., Teodoro P. E., Alves C. Co-inocula-

- tion with Bradyrhizobium and Azospirillum increases yield and quality of soybean seeds. *Agronomy Journal*. 2018. Vol. 110, № 6. P. 1–8. <https://doi.org/10.2134/agronj2018.04.0278>
3. Colás Sánchez A., Torres Gutiérrez R., Cupull Santana R., Rodríguez Urrutia A., Fauvart M., Michiels J., Vanderleyden J. Effects of co-inoculation of native Rhizobium and Pseudomonas strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. *European Journal Soil Biology*. 2014. Vol. 62. 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.03.004>
 4. Gopalakrishnan S., Sathya A., Vijayabhargathi R., Varshney R. K., Gowda C. L. L., Krishnamurthy L. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*. 2015. Vol. 5, № 4. P. 355–377. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0241-x>
 5. Antoun H., Beauchamp C. J., Goussard N., Chabot R., Lalonde R. Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil*. 1998. Vol. 204, № 1. P. 57–67. <https://doi.org/10.1023/A:1004326910584>
 6. Sridevi M., Mallaiah K. V. Phosphate solubilization by Rhizobium strains. *Indian Journal Microbiology*. 2009. Vol. 49, № 1. P. 98–102. <https://doi.org/10.1007/s12088-009-0005-1>
 7. Boiero L, Perrig D., Masciarelli O., Penna C., Cassan F., Luna V. Phytohormone production by three strains of Bradyrhizobium japonicum and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2007. Vol. 74, № 4. P. 874–880. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0731-9>
 8. Kisiala A., Laffont C., Emery R. J. N., Frugier F. Bioactive cytokinins are selectively secreted by Sinorhizobium meliloti nodulating and nonnodulating strains. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 2013. Vol. 26, № 10. P. 1225–1231. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-13-0054-R>
 9. Arora N. K., Kang S. C., Maheshwari D. K. Isolation of siderophore-producing strains of Rhizobium meliloti and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *Current Science*. 2001. Vol. 81. № 6. P. 673–677.
 10. Das K., Prasanna R., Saxena A. K. Rhizobia: a potential biocontrol agent for soilborne fungal pathogens. *Folia Microbiologica (Praha)*. 2017. Vol. 62, № 5. P. 425–435. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0513-z>
 11. Jesus E. C., Leite R. A., Bastos R. A., Aragao O. O. S., Araujo P. A. Co-inoculation of Bradyrhizobium stimulates the symbiosis efficiency of Rhizobium with common bean. *Plant and Soil*. 2018. Vol. 425. P. 201–215. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3541-1>
 12. Gano-Cohen K. A., Stokes P. J., Blanton M. A., Wendlandt C. E., Hollowell A. C., Regus J. U. ... Sachs J. L. Nonnodulating Bradyrhizobium spp. modulate the benefits of legume-Rhizobium mutualism. *Applied Environmental Microbiology*. 2016. Vol. 82. P. 5259–5268. <https://doi.org/10.1128/AEM.01116-16>
 13. Lindstrom K., Sarsa M. L., Polkunen J., Kansanen P. Symbiotic nitrogen fixation of Rhizobium (Galega) in acid soils, and its survival in soil under acid and cold stress. *Plant and Soil*. 1985. Vol. 87, № 2. P. 293–302.
 14. Lindstrom K. Rhizobium galegae, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal Systematic Bacteriology*. 1989. Vol. 39, № 3. P. 365–367.
 15. Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol*. 1968. № 43. C. 1185–1207. <https://doi.org/10.1104/pp.43.8.1185>
 16. Крикунець В. М. Ацетиленвідновний метод у дослідженнях з фізіології бобово-ризобіального симбіозу. *Фізіологія і біохімія культурних рослин*. 1993. Т. 25, № 5. С. 419–430.
 17. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта с основами статистической обработки результатов исследований. М. : Агропромиздат, 1985. 351 с.
 18. Somasegaran P., Bohlool B. B. Strain versus multistrain inoculation: effect of soil mineral N availability on Rhizobium strain effectiveness and competition for nodulation on chick-pea, soybean and dry bean. *Applied Environmental Microbiology*. 1990. Vol. 56, № 11. P. 3293–3303.
 19. Kyei-Boahen S., Nleya T., Hynes R., Walley F. L. Single and multistrain rhizobial inocula for pinto and black bean cultivars. *Journal Plant Nutrition*. 2005. Vol. 28. P. 1679–1692. <https://doi.org/10.1080/01904160500250664>
 20. Vershinina Z. R., Khakimova L. R., Lavina A. M., Karimova L. R., Serbaeva E. R., Safronova V. I. ... Baimiev A. Kh. Effect of constitutive expression of the rapA1 gene on formation of bacterial biofilms and growth-stimulating activity of rhizobia. *Microbiology*. 2019. Vol. 88. № 1. P. 54–62. <https://doi.org/10.1134/S0026261719010090>

Отримано 08.06.2019

EFFECT OF GOAT'S-RUE RHIZOBIA ON THE FORMATION AND FUNCTIONING OF THE SOYBEAN – *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* 634B SYMBIOSIS

N. M. Melnykova, S. Ya. Kots

Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv
e-mail: mnn_knu@ukr.net

Objective. Study the peculiarities of nodule formation upon the formation of the symbiotic system soybean-*Bradyrhizobium japonicum* 634b, as well as the symbiotic nitrogen-fixation ability and plant growth and development under the influence of goat's-rue rhizobia. **Methods.** Microbiological, physiological, statistical, gas chromatography. **Results.** In green house experiments, using sand as a substrate for growing plants, the mixed microbial cultures combining soybean nodule bacteria *B. japonicum* 634b and goat's-rue nodule bacteria *R. galegae* 0702 or *R. galegae* 0703 in the ratio of 1 : 1 differed from the monoculture bradyrhizobium by their influence on the nodulation, nitrogen-fixation ability of soybean-rhizobial symbiosis and development of soybean plants (variety Almaz). Increased nodulation activity in the primordial leaf and budding phases, as well as a significant decrease in the level of symbiosis nitrogen fixation during budding, were observed when used in binary bacterial compositions of strain *R. galegae* 0703. These rhizobia of goat's-rue suppressed the development of the root system of soybeans, but had no significant effect on the formation of the aerial part of the plants throughout the observation period. *R. galegae* 0702 strain slightly slowed the formation of nodules by bacteria in the primordial leaf phase, which caused a decrease in the number of soybean plants that formed symbiosis with *B. japonicum* 634b. Goat's-rue nodule bacteria *R. galegae* 0702 improved the formation of the root system, and stimulated the growth and development of the aerial part of the macro symbiont in the phase of two trigeminal leaves. **Conclusion.** Combined inoculation of the rhizobia of goat's-rue with nodule bacteria *B. japonicum* 634b showed a multidirectional effect on the formation of symbiosis by soybean plants of variety Almaz and functioning of soybean rhizobial symbiosis. The nature of the influence of *R. galegae* depended on their strain affiliation.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium galegae*, soybean, symbiosis, nitrogen fixation, nodule formation, plant growth

REFERENCES

1. Melnykova, N. N., Mykhalkiv, L. M., Omelchuk, S. V., & Beregovenko, S. K. (2018). Rizofernye mikroorganizmy kak faktor regulirovaniia formirovaniia bobovo-rizobial'nogo simbioza [Rhizosphere microorganisms as a factor influencing the legume-rhizobia symbiosis]. *Fiziologiya Rastenii i Genetika* [Plant physiology and genetics], 50(4), 299–231. <https://doi.org/10.15407/frg2018.04.299> [in Russian].
2. Queiroz Rego, C. H., Cardoso, F. B., da Silva Cândido, A. C., Teodoro, P. E., & Alves, C. (2018). Co-inoculation with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* increases yield and quality of soybean seeds. *Agronomy Journal*, 110(6), 1–8. <https://doi.org/10.2134/agronj2018.04.0278>
3. Colas Sanchez, A., Torres Gutierrez, R., Cu-pull Santana, R., Rodríguez Urrutia, A., Fauvart, M., Michiels, J., & Vanderleyden J. (2014). Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. *European Journal Soil Biology*, 62, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.03.004>
4. Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabhara-thi, R. Varshney, R. K., Gowda, C. L. L., & Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*, 5(4), 355–377. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0241-x>
5. Antoun, H., Beauchamp, C. J., Goussard, N., Chabot, R., & Lalande R. (1998). Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil*, 204(1), 57–67. <https://doi.org/10.1023/A:1004326910584>

6. Sridevi, M., & Mallaiah, K. V. (2009). Phosphate solubilization by Rhizobium strains. *Indian Journal Microbiology*, 49(1), 98–102. <https://doi.org/10.1007/s12088-009-0005-1>
7. Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O., Penna, C., Cassan, F., & Luna, V. (2007). Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology Biotechnology*, 74(4), 874–880. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0731-9>
8. Kisiala, A., Laffont, C., Emery, R. J. N., & Frugier, F. (2013). Bioactive cytokinins are selectively secreted by Sinorhizobium meliloti nodulating and nonnodulating strains. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 26(10), 1225–1231. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-13-0054-R>
9. Arora, N. K., Kang, S. C., & Maheshwari, D. K. (2001). Isolation of siderophore-producing strains of Rhizobium meliloti and their biocontrol potential against Macrophomina phaseolina that causes charcoal rot of groundnut. *Current Science*, 81(6), 673–677.
10. Das, K., Prasanna, R., & Saxena, A. K. (2017). Rhizobia: a potential biocontrol agent for soilborne fungal pathogens. *Folia Microbiologica (Praha)*, 62(5), 425–435. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0513-z>
11. Jesus, E. C., Leite, R. A., Bastos, R. A., Aragao, O. O. S., & Araujo, P. A. (2018). Co-inoculation of Bradyrhizobium stimulates the symbiosis efficiency of Rhizobium with common bean. *Plant and Soil*, 425, 201–215. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3541-1>
12. Gano-Cohen, K. A., Stokes, P. J., Blanton, M. A., Wendlandt, C. E., Hollowell, A. C., Regus, J. U. ... Sachs, J. L. (2016). Nonnodulating Bradyrhizobium spp. modulate the benefits of legume-Rhizobium mutualism. *Applied Environmental Microbiology*, 82, 5259–5268. <https://doi.org/10.1128/AEM.01116-16>
13. Lindstrom, K., Sarsa, M. L., Polkunen, J., & Kansanen, P. (1985). Symbiotic nitrogen fixation of Rhizobium (Galega) in acid soils, and its survival in soil under acid and cold stress. *Plant and Soil*, 87(2), 293–302.
14. Lindstrom, K. (1989). Rhizobium galegae, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal Systematic Bacteriology*, 39(3), 365–367.
15. Hardy, R. W. F., Holsten, R. D., Jackson, E. K., & Burns, R. C. (1968). The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol*, 43, 1185–1207. <https://doi.org/10.1104/pp.43.8.1185>
16. Krykunets, V. M. (1993). Atsetylenvidnovnyi metod u doslidzhenniah z fiziologii bobovoryzobialnogo symbiozu [Acetylene-reduction method in research of the physiology of legume-rhizobial symbiosis]. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rastenii*, 25(5), 419–430 [in Ukrainian].
17. Dospekhov, B. A. (1985). *Metodika polevogo opyta s osnovami statisticheskoy obrabotki rezultatov issledovaniy* [Methods of field experiment with the basics of statistical processing of research results]. Moskva: Agropromizdat [in Russian].
18. Somasegaran, P., & Bohlool, B. B. (1990). Strain versus multistrain inoculation: effect of soil mineral N availability on Rhizobium strain effectiveness and competition for nodulation on chickpea, soybean and dry bean. *Applied Environmental Microbiology*, 56(11), 3293–3303.
19. Kyei-Boahen, S., Nleya, T., Hynes, R., & Walley, F. L. (2005). Single and multistrain rhizobial inocula for pinto and black bean cultivars. *Journal Plant Nutrition*, 28, 1679–1692. <https://doi.org/10.1080/01904160500250664>
20. Vershinina, Z. R., Khakimova, L. R., Lavina, A. M., Karimova, L. R., Serbaeva, E. R., Safironova, V. I. ... Baimiev, A. Kh. (2019). Effect of constitutive expression of the rapA1 gene on formation of bacterial biofilms and growth-stimulating activity of rhizobia. *Microbiology*, 88(1), 54–62. <https://doi.org/10.1134/S0026261719010090>

Received 08.06.2019