

ВПЛИВ ЗМІШАНИХ КУЛЬТУР РИЗОБІЙ ЛЮПИНУ І КОЗЛЯТНИКА НА БУЛЬБОЧКОУТВОРЕННЯ, АЗОТФІКСАЦІЮ, РІСТ ТА СТРУКТУРУ ВРОЖАЮ ЛЮПИНУ

С. В. Омельчук, Л. М. Михалків, 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 активність бульбочкоутворення, азотфіксації та розвитку рослин люпину за інокуляції мікробними композиціями на основі бульбочкових бактерій люпину і козлятника, а також провести аналіз структури врожаю зазначеної бобової культури. **Методи.** Люпин жовтий (*Lupinus luteus* L.) сорту Круглик вирощували в умовах дрібноділянкового дослідження. Насіння інокулювали ризобіями люпину *Bradyrhizobium lupini* 359a у поєднанні з бульбочковими бактеріями козлятника *Neorhizobium galegae* 0702, 0703 або МС-1. Визначали кількість і масу бульбочок, масу надземної частини рослин у фазі шести пальчастих листків (ВНЗ1) і бутонізації (ВН51), а також кількість і масу насіння у перерахунку на рослину та масу 1000 насінин. Азотфіксувальну активність вимірювали за допомогою ацетиленового методу. **Результати.** Бінарні композиції бульбочкових бактерій люпину і козлятника відрізнялися за впливом на формування бобово-ризобіального симбіозу у люпину та розвиток надземної частини рослин, залежно від складу мікроорганізмів у них. Поєднання в інокуляційній суспензії бактерій *B. lupini* 359a і *N. galegae* 0702 сприяло збільшенню кількості і маси кореневих бульбочок у фазу шести пальчастих листків проти контролю (моноінокуляція штамом 359a). Зазначена змішана культура також покращувала формування надземної маси люпину протягом всього періоду спостереження. Водночас комбінована інокуляція штамами 359a і МС-1 мала незначний вплив на розвиток рослин та стимулювала формування бульбочок з досить низькою азотфіксувальною активністю. Бінарна мікробна культура *B. lupini* 359a + *N. galegae* 0703 за ефективністю не відрізнялася від монокультури ризобій люпину *B. lupini* 359a. Жодна із досліджуваних бінарних композицій бульбочкових бактерій суттєво не впливала на масу бульбочок та рівень азотфіксації симбіозу у фазу бутонізації, а також на показники кількості і маси насіння. **Висновки.** Результати дослідження вказують на здатність бінарних композицій бульбочкових бактерій люпину і козлятника впливати на симбіотичні параметри та ріст рослин люпину протягом ранніх етапів розвитку, а також на те, що склад мікроорганізмів у змішаних культурах відіграє важливу роль у забезпеченні їхньої ефективності. Стимулювальна дія бінарної композиції *B. lupini* 359a + *N. galegae* 0702 на формування симбіозу у люпину і розвиток надземної частини рослин свідчить про перспективність її застосування при вирощуванні цієї бобової культури та необхідність подальших досліджень консорціуму мікроорганізмів із залученням широкого кола сортів та різних типів ґрунтів.

Ключові слова: *Bradyrhizobium lupini*, *Neorhizobium galegae*, люпин, симбіотична система, нодуляція, азотфіксація, надземна маса, структура врожаю.

Вступ. Люпин — це невибаглива до умов вирощування бобова культура з високим рівнем поживної цінності, що здатна рости на бідних ґрунтах [1]. Люпин як сидерат відіграє значну роль у підвищенні родючості

ґрунту, оскільки може його збагачувати необхідними мінеральними елементами, які накопичуються в біомасі за допомогою добре розвиненої кореневої системи [2; 3]. У симбіозі з бульбочковими бактеріями

люпин є потужним джерелом біологічного азоту [4]. Цю культуру використовують у медицині, а безалкалоїдні сорти — у харчовій промисловості та як корм для тварин [2; 3]. Люпин вирощують у низці країн Європи, зокрема в Україні, в Австралії, а також у США та інших регіонах [2] на площах, які за розміром значно поступаються територіям, на яких культивують стратегічні для людства сільськогосподарські культури. Останнім часом особлива увага науковців спрямована на створення безалкалоїдних сортів, що спонукатиме зростання зацікавленості виробників у вирощуванні люпину та розширенні посівних площ під ним [5]. Проте широке залучення зазначеної бобової культури у сільськогосподарське виробництво потребує розв'язання низки питань, наприклад, розробки сучасних технологій вирощування, одним із векторів дії яких були б активізація росту і біофортифікація рослин, а також підвищення стійкості люпину до шкодочинної дії фітопатогенів [6].

Літературні дані свідчать, що використання в землеробстві ризосферних мікроорганізмів із рідстимулювальними властивостями (ризобактерій) — один із найбільш перспективних, екологічно і економічно доцільних шляхів покращення росту і розвитку рослин, зокрема бобових культур, та підвищення їхньої продуктивності в умовах сталого розвитку [7]. Ризобактерії за допомогою прямих і непрямих механізмів здатні підвищувати стійкість рослин до дії абіотичних і біотичних факторів довкілля, позитивно впливати на їх ріст, контролювати рівень фітопатогенів у навколишньому середовищі, поліпшувати поживну якість рослинної продукції тощо [7]. Серед численних видів мікроорганізмів, що населяють ризосферу, варто виокремити бульбочкові бактерії, рідстимулювальна дія яких спрямована передусім на забезпечення рослин необхідними мінеральними елементами, зокрема азотом, на зниження рівня шкодочинного впливу стресових чинників довкілля на макроорганізм шляхом регуляції функціонування системи захисту та продукування антибіотичних сполук, на активізацію ростових процесів за допомогою біологічно активних речовин, зокрема фітогормонів [8]. Завдяки зазначеним властивостям та іншим механізмам ризобії можуть покращувати розвиток бобових і небобових

рослин [9; 10]. Водночас симбіотичні азотфіксатори [9], як і несимбіотичні ризобактерії — представники прикореневої мікробіоти [11], продемонстрували можливість їх залучення до модулювання процесів, пов'язаних із рослинно-мікробною взаємодією, зокрема при формуванні бобово-ризобіального симбіозу, підвищуючи ефективність симбіотичних азотфіксуювальних систем, а тому й продуктивність бобових культур. Мікроорганізми з рідстимулювальною активністю були ідентифіковані у складі багатьох родів бульбочкових бактерій [8]. Серед них на увагу заслуговують ризобії козлятника, які, як було нещодавно показано, здатні позитивно впливати на ріст рослин та встановлення бобово-ризобіальної взаємодії [12; 13].

Треба зазначити, що наукові роботи останніх десятиліть присвячені передусім розробці високоефективних моно- і змішаних мікробних інокулюмів для покращення росту і розвитку сої та зернових, які є стратегічними культурами для людства [14]. Водночас створення комплексних біодобрих на основі рідстимулювальної мікробіоти ризосфери з метою підвищення врожайності цінних для сільського господарства, але менш значущих у глобальному розумінні культур, зокрема люпину, в умовах збільшення ризику глобальної продовольчої кризи потребує більшої уваги.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Як було показано нещодавніми дослідженнями, мікробні композиції, до складу яких входять бульбочкові бактерії різних родів, часто є ефективнішими за монокультури ризобій у підвищенні рівня реалізації потенціалу продуктивності бобових культур [15–17]. Гетерологічні бульбочкові бактерії, як рідстимулювальний компонент змішаних ризобіальних консорціумів, здатні покращувати формування бульбочок на коренях макросимбіонта, збільшувати азотфіксувальну активність симбіотичних систем, а також позитивно впливати на розвиток і врожайність рослини-живителя [15–17]. Повідомлялося також про те, що полікомпонентні суспензії бульбочкових бактерій різних родів не завжди можуть переважати однокомпонентні препарати на основі ризобій одного роду за рівнем ефекторної дії на окремі показники при формуванні і функціонуванні бобово-ризобіального симбіозу [11].

Аналіз низки досліджень показав, що сумісне використання для інокуляції бобових рослин ризобій одного виду здебільшого не мало істотної переваги над моноінокуляцією кожним із штамів — компонентів таких змішаних мікробних композицій [18; 19]. До того ж консорціями гомологічних ризобій, до складу яких входили ненодулюючі бульбочкові бактерії, негативно впливали на морфометричні показники бобових рослин та формування останніми симбіотичної взаємодії із нодулювальними мікроорганізмами [20]. Повідомлялося також про відсутність суттєвого впливу (за винятком окремих процесів, де спостерігали зростання) змішаних мікробних культур, до складу яких входили ризобії одного роду, на симбіотичну ефективність рослин [21]. Необхідно відзначити існування поодиноких наукових робіт [22; 23], в яких показано, що за умови коректного поєднання різних штамів одного виду ризобій з урахуванням їхніх генетичних особливостей та ростової активності можна досягти формування бобово-ризобіальних симбіозів із високими показниками бульбочкоутворення та рівня азотфіксації, наслідком чого є підвищення врожайності бобових культур.

Серед бульбочкових бактерій із рістстимулювальними властивостями окремої уваги заслуговують симбіотичні азотфіксувальні бактерії козлятника *Neorhizobium galegae*. Літературні дані свідчать про те, що ризобіям *N. galegae* притаманна стійкість до дії низки стресових факторів довкілля [24]. Вони здатні продукувати значну кількість полісахаридів [25], а також метаболіти із рістстимулювальною активністю, на що вказує збільшення маси і довжини паростків сої за обробки її насіння перед пророщуванням культуральними рідинами неоризобій [26]. Водночас на прикладі соєво-ризобіальної симбіотичної системи показано, що бульбочкові бактерії козлятника можуть бути дієвим інструментом модифікації подій, які відбуваються в процесі формування симбіотичної взаємодії між бобовими рослинами та їхніми мікросимбіонтами [13].

На сьогодні існує невелика кількість досліджень, присвячених вивченню впливу рістстимулювальних мікроорганізмів на розвиток рослин люпину та формування ними бобово-ризобіального симбіозу, які демонструють покращення симбіотичних та мор-

фометричних параметрів рослин за одночасної інтродукції у прикореневу зону ризобактерій та бульбочкових бактерій [27; 28]. При цьому несимбіотичні рістстимулювальні мікроорганізми в цих наукових роботах були представлені лише декількома видами [27; 28]. Повідомлень про симбіотичну ефективність змішаних культур на основі ризобій, зокрема тих мікробних композицій, до складу яких входять штами гетерологічних симбіотичних азотфіксаторів, у доступній нам літературі не знайдено.

Метою цієї роботи було оцінити активність бульбочкоутворення та рівень азотфіксації у люпину при формуванні ним бобово-ризобіального симбіозу за використання для інокуляції бінарних композицій бульбочкових бактерій люпину і козлятника, а також дослідити вплив симбіотичних азотфіксувальних мікроорганізмів на розвиток надземної частини рослин та структуру врожаю.

Матеріали і методи досліджень. У роботі використовували бульбочкові бактерії люпину *Bradyrhizobium lupini* 359a та козлятника *Neorhizobium galegae* 0702, 0703, МС-1 (попередня назва *Neorhizobium galegae* 159) (зберігаються в Колекції штамів симбіотичних і асоціативних азотфіксувальних мікроорганізмів Інституту фізіології рослин і генетики НАН України), а також рослини люпину жовтого (*Lupinus luteus* L.) сорту Круглик.

Ризобії культивували на манітно-дріжджовому агаризованому (МДА) середовищі до початку стаціонарної фази росту за температури 28 °С. Мікробну біомасу змивали з поверхні середовища стерильною водопровідною водою і ретельно суспендували. Кількість бактерій у 1 мл суспензії визначали за допомогою калібрувальної кривої, побудованої на основі даних оптичної густини мікробної культури та числа колонієутворювальних одиниць, що сформувалися на поверхні агару після розсіву суспензій бульбочкових бактерій. Оптичну густину оцінювали за допомогою спектрофотометра Shimadzu UV 1900 (Japan) при довжині хвилі 600 нм.

Вплив неоризобій на ріст бактерій *B. lupini* оцінювали за допомогою методу агарових блоків [29]. Симбіотичні азотфіксувальні мікроорганізми люпину і козлятника вирощували на МДА протягом 7 діб (ризобії козлятника) та 10 діб (ризобії люпину) за температури 28 °С. З агару, на якому росли

бульбочкові бактерії козлятника, вирізали блоки, розклали їх на свіжозасіяний газон *B. lupini* 359a і культивували. Критерієм оцінки ефекторної дії неоризобій була ширина зони сповільнення чи підсилення росту бульбочкових бактерій люпину.

Насіння люпину ретельно промивали стерильною водопровідною водою, інокулювали протягом години суспензіями бульбочкових бактерій з розрахунку 10^7 мікробних клітин / насінину та висівали. У контрольному варіанті обробку насіння здійснювали монокультурою ризобій люпину. При використанні бінарних композицій із залученням бульбочкових бактерій люпину і козлятника співвідношення компонентів у них було 1:1.

Дослідження впливу змішаних культур бульбочкових бактерій на формування бобово-ризобіального симбіозу у люпину здійснювали в умовах дрібноділянкового експерименту в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України. Рослини вирощували на сірому супіщаному ґрунті за природних умов освітлення, температури та вологості ґрунту й повітря. Дослідні ділянки довжиною 1 метр, кожна з яких містила по три рядки, розміщували рендомізовано. Повторність дослідів шестиразова (два окремих досліди з триразовою повторністю кожен). Визначення кількості бульбочок, сформованих на коренях люпину, їхньої маси та азотфіксуючої активності, а також надземної маси рослин здійснювали у фазу шести пальчастих листків (ВВСН31) і бутонізації (ВВСН51). Після дозрівання насіння оцінювали його масу та кількість насінин у перерахунку на рослину, а також масу 1000 насінин. Азотфіксуючу активність вимірювали за допомогою ацетиленового методу [30] у модифікації [31] на газовому хроматографі Agilent GC system 6850 (США) з полум'яно-іонізаційним детектором. Розділення газової суміші проводили на колонці Supelco Porapak N за температури термостата 55 °С і детектора 150 °С з використанням гелію як газу-носія.

Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали із залученням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA. Достовірність різниці між показниками оцінювали за критерієм Tukey HSD за $p < 0,05$. Наведені в таблицях та рисунках результати подані як середнє арифметичне і похибка середнього арифметичного.

Результати та їх обговорення. Показано, що досліджувані нами штами неоризобій і бульбочкові бактерії люпину *B. lupini* 359a не мали антагоністичної активності, тому були залучені до створення на їх основі мікробних композицій. Як свідчать одержані нами результати, за інокуляції люпину бінарними культурами на основі ризобій люпину *B. lupini* 359a та козлятника *N. galegae* 0702 або *N. galegae* МС-1 відбувалась активізація бульбочкоутворення на коренях рослин у фазу шести пальчастих листків (ВВСН 31) (рис. 1).

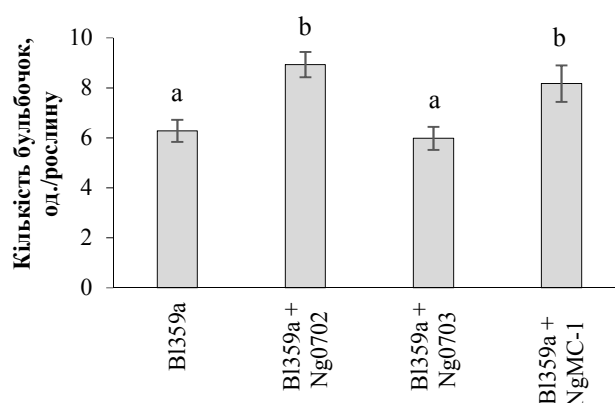


Рис. 1. Кількість бульбочок на коренях люпину за інокуляції рослин змішаними культурами бульбочкових бактерій люпину і козлятника у фазу шести пальчастих листків (ВВСН 31).

Примітка: B1359a — *B. lupini* 359a; Ng0702 — *N. galegae* 0702; Ng0703 — *N. galegae* 0703; NgMC-1 — *N. galegae* МС-1. Різниця між варіантами, позначена різними літерами, є достовірною при $p < 0,05$. Проаналізовано по 24 рослини / варіант.

При цьому у разі бінарної композиції *B. lupini* 359a + *N. galegae* 0702 кількість бульбочок збільшувалася в 1,4 раза проти контролю (інокуляція монокультурою *B. lupini* 359a), тоді як за використання змішаної мікробної культури *B. lupini* 359a + *N. galegae* МС-1 — в 1,3 раза. Присутність у складі інокулюму штаму *N. galegae* 0702 сприяла також підвищенню маси корневих бульбочок (табл. 1), рівень азотфіксації яких не відрізнявся від контрольного показника. Навпаки, інтродукція у ризосферу люпину неоризобій *N. galegae* МС-1 як компонента мікробної композиції з ризобіями люпину викликала формування у фазу шести пальчастих листків (ВВСН 31) бульбочок із невеликою

Таблиця 1. Маса кореневих бульбочок та рівень азотфіксації при формуванні симбіозу у люпину за використання для інокуляції насіння бінарних бактеріальних композицій на основі ризобій люпину і козлятника

Варіанти дослідів	АФА, мкмоль C ₂ H ₄ / (г бульбочок · год)*	Маса бульбочок, г/рослину
Шість пальчастих листків (ВВСН 31)		
<i>B. lupini</i> 359a	19,94 ± 1,19 ^a	0,15 ± 0,01 ^a
<i>B. lupini</i> 359a + <i>N. galegae</i> 0702	20,95 ± 2,26 ^a	0,19 ± 0,01 ^c
<i>B. lupini</i> 359a + <i>N. galegae</i> 0703	24,72 ± 1,92 ^a	0,13 ± 0,01 ^{ab}
<i>B. lupini</i> 359a + <i>N. galegae</i> МС-1	13,97 ± 1,13 ^b	0,12 ± 0,01 ^a
Бутонізація (ВВСН 51)		
<i>B. lupini</i> 359a	10,47 ± 1,18 ^A	0,61 ± 0,06 ^A
<i>B. lupini</i> 359a + <i>N. galegae</i> 0702	9,15 ± 0,80 ^A	0,59 ± 0,04 ^A
<i>B. lupini</i> 359a + <i>N. galegae</i> 0703	9,02 ± 0,91 ^A	0,49 ± 0,03 ^A
<i>B. lupini</i> 359a + <i>N. galegae</i> МС-1	10,04 ± 0,89 ^A	0,58 ± 0,05 ^A

Примітка. Різниця між варіантами в межах одного стовпчика та фази розвитку рослин, позначена різними літерами, є достовірною за $p < 0,05$; * — азотфіксувальну активність (АФА) визначали у восьмиразовій повторності. Проаналізовано по 24 рослини / варіант.

масою та низькою азотфіксувальною активністю (табл. 1). За інокуляції рослин люпину бінарною суспензією *B. lupini* 359a + *N. galegae* 0703 жодних змін у кількості та масі кореневих бульбочок, а також у функціонуванні нітрогеназного комплексу в них не виявлено (рис. 1, табл. 1).

У подальшому у фазу бутонізації (ВВСН51) спостерігалось розростання і об'єднання бульбочок із формуванням ними навколо кореня «муфт-кластерів», що унеможливило достовірну оцінку активності бульбочкоутворення з урахуванням їх кількості. Проте зважування утворених на коренях кластерів бульбочок продемонструвало відсутність суттєвих відмінностей у їхній масі між дослідними (насіння обробляли змішаними культурами бульбочкових бактерій) і контрольним (інокуляція *B. lupini* 359a) варіантами (табл. 1). Варто відзначити, що показники азотфіксувальної активності бульбочок, сформованих за використання мікробних композицій та монокультури ризобій люпину, також не відрізнялись один від одного протягом бутонізації рослин (табл. 1).

Результати наших досліджень свідчать про те, що лише бінарна композиція бульбочкових бактерій *B. lupini* 359a + *N. galegae* 0702 позитивно впливала на розвиток надземної частини люпину протягом усього періоду спостереження (рис. 2). За обробки

рослин зазначеною змішаною культурою відбувалося збільшення маси пагонів на 20 % у фазу шести пальчастих листків (ВН31) та на 22 % у фазу бутонізації (ВН51), як порівняти з інокуляцією *B. lupini* 359a. Водночас у разі одночасного застосування штамів 359a і МС-1 також спостерігався, хоча і недостовірний, приріст надземної маси у фазу шести пальчастих листків (ВН31). В інших випадках комбінації штамів симбіотичних азотфіксаторів та монокультура бульбочкових бактерій люпину *B. lupini* 359a за ефективністю істотно не відрізнялися між собою (рис. 2).

Показники маси та кількості насіння в перерахунку на рослину, а також маси 1000 насінин за використання досліджуваних бінарних мікробних композицій достовірно не відрізнялися від аналогічних показників у рослин, інокульованих лише бульбочковими бактеріями люпину (табл. 2). Однак тенденція до збільшення маси 1000 насінин спостерігалася за використання бінарної мікробної композиції *B. lupini* 359a + *N. galegae* 0703.

Літературні дані свідчать про те, що бульбочкові бактерії як рістстимулювальні мікроорганізми у складі консорціумів можуть впливати на формування симбіотичної рослинно-мікробної взаємодії, підвищуючи ефективність бобово-ризобіальних симбіозів [15–17]. Змішані культури ризобій

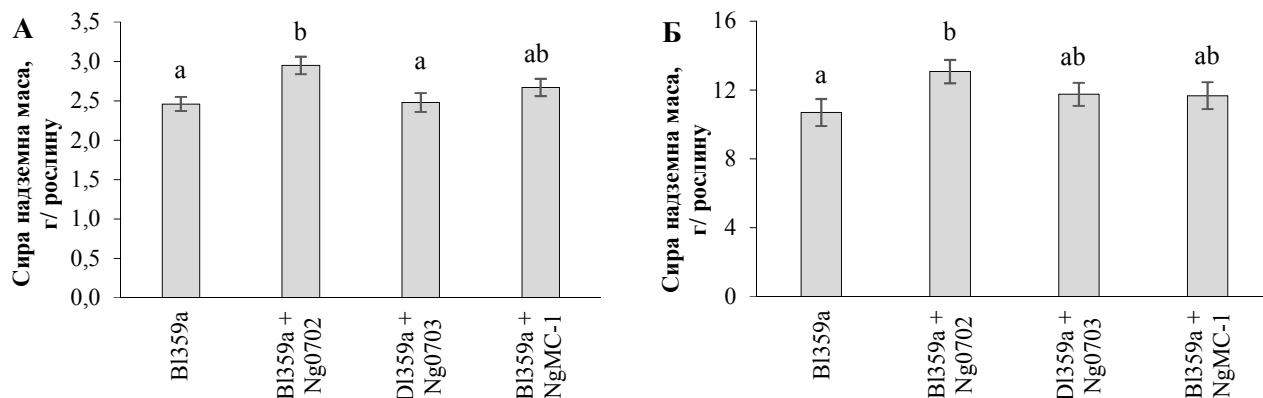


Рис. 2. Вплив змішаних мікробних композицій бульбочкових бактерій люпину та козлятника на формування надземної маси у рослин люпину.

Примітка. А — шість пальчастих листків (BVCN 31); Б — бутонізація (BVCN 51); B1359a — *B. lupini* 359a; Ng0702 — *N. galegae* 0702; Ng0703 — *N. galegae* 0703; NgMC-1 — *N. galegae* MC-1. Різниця між варіантами, позначена різними літерами, є достовірною за $p < 0,05$. Проаналізовано по 45 рослин / варіант у фазу шести пальчастих листків і по 75 рослин / варіант у фазу бутонізації.

Таблиця 2. Вплив бульбочкових бактерій люпину і козлятника у бінарній культурі на кількість і масу насіння люпину

Варіанти дослідів	Маса насіння, г/рослину	Кількість насіння, од./рослину	Маса 1000 насінин, г
<i>B. lupini</i> 359a	1,85 ± 0,13 ^a	11,4 ± 1,0 ^a	123,7 ± 7,5 ^a
<i>B. lupini</i> 359a + <i>N. galegae</i> 0702	2,07 ± 0,21 ^a	14,1 ± 1,3 ^a	123,2 ± 3,7 ^a
<i>B. lupini</i> 359a + <i>N. galegae</i> 0703	1,76 ± 0,14 ^a	13,0 ± 1,8 ^a	140,1 ± 10,2 ^a
<i>B. lupini</i> 359a + <i>N. galegae</i> MC-1	1,95 ± 0,22 ^a	13,6 ± 0,7 ^a	129,2 ± 4,8 ^a

Примітка. Визначення кількості і маси насіння, а також маси 1000 насінин здійснювали у шести-разовій повторності; різниця між варіантами, позначена різними літерами, є достовірною за $p < 0,05$.

продемонстрували здатність покращувати бульбочкоутворення на коренях бобових рослин і розвиток надземної маси, а також збільшувати азотфіксувальну активність та врожайність бобових культур [15–17]. Одним із важливих факторів, які визначають ефективність бульбочкових бактерій, а тому й мікробних композицій на їх основі, як було показано, є комплементарність симбіотичних азотфіксаторів між собою та з бобовою рослиною-живителем [17; 21; 22]. Прояв комплементарності в системі ризобії – ризобії – бобова рослина може визначатися низкою чинників, зокрема ростовими характеристиками бульбочкових бактерій, їхньою здатністю впливати на симбіотичний потенціал рослин і активність інших мікроорганізмів, ступенем взаємодії з макросимбіонтом, умовами навколишнього середовища, тощо [15; 17; 19; 21; 22; 24; 32]. Як було встановлено раніше, обробка сої змішаною

культурою на основі ризобій козлятника *N. galegae* 0702 і сої *Bradyrhizobium japonicum* 634б в умовах вегетаційного експерименту призвела до збільшення маси надземної частини і кореня рослин у фазу двох трійчастих листків, як порівняти з моноінокуляцією *B. japonicum* 634б [13], проте не мала стимулювального ефекту на бульбочкоутворення. Водночас за використання інокуляційної суспензії у складі *B. japonicum* 634б і *N. galegae* 0703 спостерігалась активізація розвитку кореневих бульбочок у фазу бутонізації [13].

У нашій роботі показано, що при вирощуванні люпину у ґрунтовій культурі бульбочкові бактерії козлятника можуть бути чинником, за допомогою якого можна регулювати формування бобово-ризобіального симбіозу цієї бобовою культурою з метою підвищення його ефективності (рис. 1, 2). Спрямованість дії неоризобій у нашому

дослідженні дещо відрізнялася від продемонстрованої в експериментах із соєю. Так, *N. galegae* 0702 у поєднанні з ризобіями люпину *B. lupini* 359a стимулював бульбочкоутворення на коренях люпину, а *N. galegae* 0703, навпаки, не впливав на цей процес (рис. 1). Одним із механізмів, який, ймовірно, лежить в основі ефекторної дії неоризобій як бактерій, що не здатні формувати бульбочки на коренях люпину [33], є сигналінг за участю поверхневих полісахаридів, які активно продукуються бактеріальними клітинами [26] та можуть активізувати процеси, пов'язані з бульбочкоутворенням, сприяючи розвитку бобово-ризобіального симбіозу високоактивним мікросимбіонтом. Підтвердженням цього припущення є збільшення кількості кореневих бульбочок у сої, паростки якої за декілька годин до інокуляції *B. japonicum* 634б обробляли екзополісахаридом ризобій люпину *B. lupini* 359a — бактерій, що не утворюють симбіотичну взаємодію з рослинами сої [27]. Треба вказати на важливість структурних особливостей екзополісахаридів різних видів мікроорганізмів, які визначають здатність вуглеводних біополімерів взаємодіяти з рецепторними молекулами рослин та модулювати розвиток бобово-ризобіального симбіозу [34]. З огляду на це, а також імовірне існування відмінностей у складі поверхневих полісахаридів різних штамів бульбочкових бактерій козлятника, можна пояснити різноспрямовану дію неоризобій у поєднанні з різними видами бобових рослин та їхніми мікросимбіонтами. Варті уваги й інші механізми, наприклад, продукування біологічно активних речовин, що лежать в основі комплементарності між рослинами люпину, бульбочковими бактеріями і аборигенними видами ґрунтових мікроорганізмів як фактор впливу на формування бульбочкового апарату у рослин люпину за використання бінарних композиції симбіотичних азотфіксаторів.

Варто наголосити, що бінарні мікробні композиції, створені із залученням штаму 0702 та ризобій — мікросимбіонтів сої *B. japonicum* 634б і люпину *B. lupini* 359a, продемонстрували більш виражений рістстимулювальний вплив на розвиток надземної частини обох бобових культур, ніж специфічні бульбочкові бактерії кожної з них за моноінокуляції протягом ранніх фаз розвитку рос-

лин. Збільшення надземної маси у випадку люпину є особливо важливим ефектом сумісної обробки згаданими вище мікроорганізмами, оскільки ця бобова рослина має велике значення передусім як сидеральна і кормова культура. Треба також вказати на тенденцію до зростання надземної маси люпину і у випадку використання змішаної суспензії, до складу якої входили *B. lupini* 359a і *N. galegae* МС-1 (табл. 2). Про рістстимулювальну активність штамів бульбочкових бактерій козлятника 0702 і МС-1 повідомлялося також у науковій роботі, присвяченій вивченню впливу культуральних рідин цих ризобій на розвиток паростків сої [12]. Аналіз одержаних нами експериментальних даних не виявив будь-якої ефекторної дії штаму *N. galegae* 0703 на симбіотичні і морфометричні параметри рослин люпину при формуванні ними бобово-ризобіального симбіозу із бактеріями *B. lupini* 359a (рис. 1, 2; табл. 1), що може свідчити про низький рівень взаємодії неоризобій з іншими учасниками зазначеної рослинно-мікробної системи. Необхідно також відзначити, що досліджувані нами змішані мікробні культури за інокуляції ними люпину не підвищували азотфіксувальної активності бульбочок та суттєво не впливали на показники структури врожаю (табл. 1, 2). Цікаво, що у складі бінарної композиції з бульбочковими бактеріями сої штам *N. galegae* 0702 так само не мав стимулювального ефекту на рівень азотфіксації соєво-ризобіального симбіозу [13].

Висновки. Отже, поєднання бульбочкових бактерій люпину і козлятника в інокуляційній суспензії може бути важливим чинником підвищення ефективності формування та функціонування симбіозу люпин – *B. lupini* на ранніх етапах розвитку рослин. Було показано, що склад мікроорганізмів у досліджуваних нами змішаних культурах ризобій значно впливає на спрямованість їхньої дії на симбіотичні та морфометричні параметри люпину. Бінарна композиція, до створення якої були залучені бульбочкові бактерії *B. lupini* 359a і козлятника *N. galegae* 0702, продемонструвала перспективність використання при вирощуванні люпину як сидеральної та кормової культури, оскільки вона виявила здатність покращувати формування бульбочкового апарату на його коренях та надземної маси. З огляду на роль

бобової рослини як фактора, який значною мірою може впливати на ефективність симбіотичних азотфіксувальних систем, наприклад, регулюючи процес бульбочкоутворення [17; 22], важливим видається проведення подальших досліджень ефекторної дії змішаної мікробної композиції *B. lupini* 359a + *N. galegae* 0702 із залученням широкого кола видів і сортів люпину та різних типів ґрунтів.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Мазур В. А., Панцирева Г. В. Рід *Lupinus* L. в Україні: генофонд, інтродукція, напрями досліджень та перспективи використання. Вінниця : ВНАУ, 2020. 200 с.
2. Aćko D. K., Flajšman M. Production and utilization of *Lupinus* spp. M. Hasanuzzaman (Ed.). *Production and utilization of legumes — progress and prospects*. London : IntechOpen, 2023. P. 1–21. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.110227>
3. Гонта А. І. Жовтий люпин — високоякісний корм і резерв білка. *Корми і кормовиробництво*. 2004. Вип. 53. С. 99–103.
4. Патики В. П., Петриченко В. Ф. Мікробна азотфіксація у сучасному кормовиробництві. *Корми і кормовиробництво*. 2004. Вип. 53. С. 3–11.
5. Бронувицька М. А. Особливості формування національних сортових ресурсів люпину (*Lupinus* L.): стан і перспективи. *Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин*. 2014. № 2. С. 30–36.
6. Notz I., Reckling M. Why farmers grow lupin. *Legume Hub*. Leibniz Centre for Agricultural Landscape Research, 2022. Режим доступу: <https://www.legumestranslated.eu>
7. Hasan A., Tabassum B., Hashim M., Khan N. Role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as a plant growth enhancer for sustainable agriculture: a review. *Bacteria*. 2024. Vol. 3. P. 59–75. <https://doi.org/10.3390/bacteria3020005>
8. Gopalakrishnan S., Sathya A., Vijayabharathi 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>
9. Мельникова Н. Н., Михалкив Л. М., Омельчук С. В., Береговенко С. К. Ризосферные микроорганизмы как фактор регулирования формирования бобово-ризобияльного симбиоза. *Физиология растений и генетика*. 2018. Т. 50, № 4. С. 299–321. <https://doi.org/10.15407/ifrg2018.04.299>
10. Antoun H., Beauchamp C. J., Goussard N., Chabot R., Lalande R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant Soil*. 1998. Vol. 204, № 1. P. 57–67. <https://doi.org/10.1023/A:1004326910584>
11. Sanchez A. C., Gutierrez R. T., Santana R. C., Urrutia A. R., Fauvart M., Michiels J., Vanderleyden J. Effects co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. *Eur. J. Soil Biol.* 2014. Vol. 62. P. 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.03.004>
12. Мельникова Н. М. Вплив бульбочкових бактерій козлятника на проростання насіння та ріст проростків сої. Актуальні питання сільськогосподарської мікробіології: матеріали всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції (м. Чернігів, 4–5 вересня). Чернігів, 2019. С. 70–72.
13. Мельникова Н. М., Коць С. Я. Вплив бульбочкових бактерій козлятника на формування і функціонування симбіозу соя – *Bradyrhizobium japonicum* 634б. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2019. Вип. 29. С. 29–36. <https://doi.org/10.35868/1997-3004.29.29-36>
14. Bomfim C. A., Coelho L. G. F., do Vale H. M. M., de Carvalho M. I., Megias M., Ollerro F. J., dos Reis Junior F. B. Brief history of biofertilizers in Brazil: from conventional approaches to new biotechnological solutions. *Braz. J. Microbiol.* 2021. Vol. 52. P. 2215–2232. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00618-9>
15. Jesus E. C., Leite R. A., Bastos R. A., Aragao O. O. S., Araujo P. A. Co-inoculation of *Bradyrhizobium* stimulates the symbiosis sufficiency of *Rhizobium* with common bean. *Plant Soil*. 2018. Vol. 425. P. 201–215. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3541-1>
16. Leite R. A., Martins L. C., Ferreira L. V. S. F., Barbosa E. S., Alves B. J. R., Zilli J. E. ... Jesus E. C. Co-inoculation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* promotes growth and yield of common beans. *Appl. Soil Ecol.* 2022. Vol. 172. 104356. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104356>
17. de Carvalho R. H., Jesus E. C., Favero V. O., Straliootto R., Araujo A. P. The co-inoculation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* increases the early nodulation and development of common beans. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2020. Vol. 20. P. 860–864. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00171-8>
18. Kyei-Boahen S., Nleya T., Hynes R. K., Walley F. L. Single and multistrain rhizobial inocula for Pinto and black bean cultivars. *J. Plant Nutr.* 2005. Vol. 28, № 10. P. 1679–1692. <https://doi.org/10.1080/01904160500250664>
19. Somasegaran P., Bohlool B. B. Single-strain versus multistrain inoculation: effect of soil mineral N availability on rhizobial strain effectiveness and competition for nodulation on chick-pea, soybean, and dry bean. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990.

- Vol. 56, № 11. P. 3298–3303. <https://doi.org/10.1128/aem.56.11.3298-3303.1990>
20. 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016. Vol. 82. P. 5259–5268. <https://doi.org/10.1128/AEM.01116-16>
21. do Nascimento T. R., Sena P. T. S., Oliveira G. S., da Silva T. R., Dias M. A. M., de Freitas A. D. S. ... Fernandes Junior P. I. Co-inoculation of two symbiotically efficient Bradyrhizobium strains improves cowpea development better than a single bacterium application. *3 Biotech.* 2021. Vol. 11. 4. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02534-5>
22. Крутило Д. В. Ефективність спільної інокуляції сої штамами *Bradyrhizobium japonicum* з різною швидкістю росту. *Вісник аграрної науки.* 2017. Т. 95, № 10. С. 5–9. <https://doi.org/10.31073/agrovistyuk201710>
23. Крутило Д. В. Симбіотичні взаємовідносини між штамами *Bradyrhizobium japonicum* різних генетичних груп і рослинами сої. *Мікробіол. журнал.* 2017. Т. 79, № 6. С. 82–94. <https://doi.org/10.15407/microbiolj79.06.082>
24. 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 Soil.* 1985. Vol. 87, № 2. P. 293–302. <https://doi.org/10.1007/BF02181868>
25. Lindstrom K. Rhizobium galegae, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1989. Vol. 39, № 3. P. 365–367. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-3-365>
26. Мельникова Н. М. Вплив полісахаридів ризобій на проростання насіння сої та бульбочкоутворення при формуванні соєво-ризобіального симбіозу. *Физиология растений и генетика.* 2019. Т. 51, № 5. С. 436–446. <https://doi.org/10.15407/frg2019.05.436>
27. Sulewska H., Ratajczak K., Niewiadomska A., Panasiewicz K. The use of microorganisms as bio-fertilizers in the cultivation of white lupine. *Open Chem.* 2019. Vol. 17. P. 813–822. <https://doi.org/10.1515/chem-2019-0089>
28. Monroy-Guerrero M., Memenza-Zegarra M., Taco N., Mostacero E., Ogata-Gutierrez K., Huaranga-Joaquin A. ... Zuniga-Davila D. Co-inoculation of Bradyrhizobium spp. and Bacillus sp. on tarwi (Lupinus mutabilis Sweet) in the high Andean region of Peru. *Agronomy.* 2022. Vol. 12. 2132. <https://doi.org/10.3390/agronomy12092132>
29. Євлаш В. В., Газзаві-Рогозіна Л. В., Бикова А. С., Циганков О. В. Технічна мікробіологія: практикум. Харків : НТУ «ХП», ХДУХТ, 2019. 180 с.
30. 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. Vol. 43. P. 1185–1207. <https://doi.org/10.1104/pp.43.8.1185>
31. Крикунець В. М. Ацетиленвідновний метод у дослідженнях з фізіології бобово-ризобіального симбіозу. *Физиология и биохимия культурных растений.* 1993. Т. 25, № 5. С. 419–430.
32. Agudelo M. G., Ruiz B., Capela D., Remigi P. The role of microbial interactions on rhizobial fitness. *Front. Plant Sci.* 2023. Vol. 14. 1277262. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1277262>
33. Andrews M., Andrews M. E. Specificity in legume-rhizobia symbioses. *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18. P. 705. <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>
34. Ghosh P. K., Maiti T. K. Structure of extracellular polysaccharides (EPS) produced by rhizobia and their functions in legume-bacteria symbiosis: a review. *Achiev. Life Sci.* 2016. Vol. 10, № 2. P. 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.als.2016.11.003>

Отримано 28.09.2024

INFLUENCE OF MIXED CULTURES OF LUPIN AND FODDER GALEGA RHIZOBIA ON NODULATION, NITROGEN FIXATION, GROWTH AND YIELD COMPONENTS OF LUPIN

S. V. Omelchuk, L. M. Mykhalkiv, N. M. Melnykova, S. Ya. Kots

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

Objective. Evaluate root nodule formation, nitrogen fixation rates and lupine growth under seed inoculation with the microbial compositions of lupine and fodder galega nodule bacteria as well as to estimate lupine yield components. **Methods.** Yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) cv. Kruglyk was grown in small-scale field experiments. Lupine seeds were inoculated with *Bradyrhizobium lupini* strain 359a (rhizobia nodulating lupine) mixed with *Neorhizobium galegae* strains 0702, 0703, or MC-1 (rhizobia nodulating fodder galega). The number and weight of nodules as well as shoot weight at both the six-leaf (BH31) and budding (BH51) stages were determined. The number and weight of seeds per plant and 1000-seed weight were also examined. The rate of nitrogen fixation was measured by acetylene reduction assay. **Results.** The binary consortia of lupine and fodder galega nodule bacteria differed from each other in their effects on the establishment of the symbiosis of lupine with *B. lupini* and on the aboveground growth of plants. The extent of effects of the consortia depended on their composition. The combined inoculation with *B. lupini* 359a and *N. galegae* 0702 led to an increase in the number and weight of root nodules at the six-leaf growth stage as compared to control (inoculation with 359a only). At the same time the mentioned mixed culture promoted the aboveground growth of lupine during the period of experiments. The application of *B. lupini* strain 359a in combination with *N. galegae* strain MC-1 resulted in an increase in the number of root nodules and low nitrogen fixation rates. But besides that, an insignificant stimulating effect on lupine shoot weight was observed for a binary consortium consisting of 359a and MC-1. There were no differences in efficacy between a single-strain (*B. lupini* 359a) and a two-strain (*B. lupini* 359a + *N. galegae* 0703) inoculation of plants. The tested mixed cultures of nodule bacteria did not significantly influence nodule weight, nitrogen fixation rates at the budding stage, seed number and seed weight. **Conclusion.** The results indicate that the binary consortia of lupine and fodder galega nodule bacteria possess the potential to affect symbiotic parameters and lupine growth at the early growth stages. Additionally, it is shown that the composition of microorganisms in mixed cultures plays an important role in determining their efficiency. The combined inoculation with *B. lupini* strain 359a and *N. galegae* strain 0702 shows the prospect for its application on lupine cultivation but additional studies of the effects of this microbial consortium involving a broad range of plant cultivars as well as different soil types are needed.

Key words: *Bradyrhizobium lupini*, *Neorhizobium galegae*, lupin, symbiotic system, nodulation, nitrogen fixation, aboveground mass, yield components.

REFERENCES

1. Mazur, V. A., & Pantsyreva, H. V. (2020). *Rid Lupinus L. v Ukraini: henofond, introduksiia, napriamy doslidzhen ta perspektyvy vykorystannia* [Genus *Lupinus* L. in Ukraine: gene pool, introduction, directions of research and prospects of use]. Vinnytsia: VNAU [in Ukrainian].
2. Ačko, D. K., & Flajšman, M. (2023). Production and utilization of *Lupinus* spp. In M. Ha-sanuzzaman (Ed.). *Production and utilization of legumes — progress and prospects* (pp. 1–21). London: IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.110227>
3. Gonta, A. I. (2004). Zhovtyi liupyn — vysokoiakisnyi korm i rezerv bilka [Yellow lupin as a high-quality forage and protein reserve]. *Kormy i kormovyrobnytstvo — Fodders and fodder production*, 53, 99–103 [in Ukrainian].

4. Patyka, V. P., & Petrychenko, V. F. (2004). Mikrobnazotfiktsatsiia u suchasnomu kormovyrobnytstvi [Microbe nitrogen fixation in modern feed production]. *Kormy i kormovyrobnytstvo — Fodders and fodder production*, 53, 3–11 [in Ukrainian].
5. Bronovytska, M. A. (2014). Osoblyvosti formuvannia natsionalnykh sortovykh resursiv liupynu (*Lupinus L.*): stan i perspektyvy [Peculiarities of developing national varietal resources of lupin (*Lupinus L.*): state and prospects]. *Sortovyvchennia ta okhorona prav na sorty roslyn — Plant Varieties Studying and Protection*, 2, 30–35 [in Ukrainian]. [https://doi.org/10.21498/2518-1017.2\(23\).2014.56120](https://doi.org/10.21498/2518-1017.2(23).2014.56120)
6. Notz, I., & Reckling, M. (2022). Why farmers grow lupin. *Legume Hub*. Leibniz Centre for Agricultural Landscape Research. <https://www.legumestranslated.eu>
7. Hasan, A., Tabassum, B., Hashim, M., & Khan, N. (2024). Role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as a plant growth enhancer for sustainable agriculture: a review. *Bacteria*, 3, 59–75. <https://doi.org/10.3390/bacteria3020005>
8. Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabhathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L. L., & Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech.*, 5, 355–377. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0241-x>
9. Melnykova, N. N., Mykhalkiv, L. M., Omelchuk, S. V., & Beregoenko, S. K. (2018). Rizosfernye mikroorganizmy kak faktor regulirovaniya formirovaniya bobovo-rizobial'nogo simbioza [Rhizosphere microorganisms as a factor influencing the rhizobia-legume symbiosis]. *Fiziologiya rasteniy i genetika — Plant Physiology and Genetics*, 50, 299–321 [in Russian]. <https://doi.org/10.15407/ifrg.2018.04.299>
10. Antoun, H., Beauchamp, C. J., Goussard, N., Chabot, R., & Lalonde, R. (1998). Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus L.*). *Plant Soil*, 204, 57–67. <https://doi.org/10.1023/A:1004326910584>
11. Sanchez, A. C., Gutierrez, R. T., Santana, R. C., Urrutia, A. R., Fauvart, M., Michiels, J., & Vanderleyden, J. (2014). Effects co-inoculation of native Rhizobium and Pseudomonas strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris L.* genotypes under Cuban soil conditions. *Eur. J. Soil Biol.*, 62, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.03.004>
12. Melnykova, N. M. (2019, September). Vplyv bulbochkovykh bakterii kozliatnyka na prorstannia nasinnia ta rist prorstkiv soi [Effect of fodder galega nodule bacteria on seed germination and soybean seedlings growth]. Proceedings of the All Ukrainian Scientific and Practical Conference Actual problems in agricultural microbiology (pp. 70–72), Chernihiv [in Ukrainian].
13. Melnykova, N. M., & Kots, S. Ya. (2019). Vplyv bulbochkovykh bakterii kozliatnyka na formuvannia i funktsionuvannia symbiozu soia — Bradyrhizobium japonicum 634b [Effect of goat's-rue rhizobia on the formation and functioning of the soybean — Bradyrhizobium japonicum 634b symbiosis]. *Silskohospodarska mikrobiologhiia — Agricultural Microbiology*, 29, 29–36 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.35868/1997-3004.29.29-36>
14. Bomfim, C. A., Coelho, L. G. F., do Vale, H. M. M., de Carvalho, M. I., Megias, M., Olleiro, F. J., & dos Reis Junior, F. B. (2021). Brief history of biofertilizers in Brazil: from conventional approaches to new biotechnological solutions. *Braz. J. Microbiol.*, 52, 2215–2232. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00618-9>
15. Jesus, E. C., Leite, R. A., Bastos, R. A., Aragao, O. O. S., & Araujo, P. A. (2018). Co-inoculation of Bradyrhizobium stimulates the symbiosis sufficiency of Rhizobium with common bean. *Plant Soil*, 425, 201–215. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3541-1>
16. Leite, R. A., Martins, L. C., Ferreira, L. V. S. F., Barbosa, E. S., Alves, B. J. R., Zilli, J. E. ... & Jesus, E. C. (2022). Co-inoculation of Rhizobium and Bradyrhizobium promotes growth and yield of common beans. *Appl. Soil Ecol.*, 172, 104356. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104356>
17. de Carvalho, R. H., Jesus, E. C., Favero, V. O., Stralio, R., & Araujo, A. P. (2020). The co-inoculation of Rhizobium and Bradyrhizobium increases the early nodulation and development of common beans. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 20, 860–864. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00171-8>
18. Kyei-Boahen, S., Nleya, T., Hynes, R. K., & Walley, F. L. (2005). Single and multistrain rhizobial inocula for Pinto and black bean cultivars. *J. Plant Nutr.*, 28, 1679–1692. <https://doi.org/10.1080/01904160500250664>
19. Somasegaran, P., & Bohloul, B. B. (1990). Single strain versus multistrain inoculation: effect of soil mineral N availability on rhizobial strain effectiveness and competition for nodulation on chickpea, soybean, and dry bean. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3298–3303. <https://doi.org/10.1128/aem.56.11.3298-3303.1990>
20. 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82, 5259–5268. <https://doi.org/10.1128/AEM.01116-16>
21. do Nascimento, T. R., Sena, P. T. S., Oliveira, G. S., da Silva, T. R., Dias, M. A. M., de Freitas, A. D. S., & Fernandes Junior, P. I. (2021). Co-inoculation of two symbiotically efficient Bradyrhizobium strains improves cowpea development

- better than a single bacterium application. *3 Biotech.*, *11*. 4. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02534-5>
22. Krutylo, D. V. (2017). Efektyvnist spilnoi inokulatsii soi shtamamy Bradyrhizobium japonicum z riznoi u shvydkistiu rostu [Efficiency of joint inoculation of soybean by strains of Bradyrhizobium japonicum with different growth rate]. *Visnyk aharnoi nauky — Bulletin of Agricultural Science*, *95*, 5–9 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201710>
23. Krutylo, D. V. (2017). Symbiotychni vzaie-movidnosyny mizh shtamamy Bradyrhizobium japonicum riznykh henetychnykh hrup i roslynamy soi [Symbiotic relationship between Bradyrhizobium japonicum strains of different genetic groups and soybean plants]. *Mikrobiolohichnyi zhurnal — Microbiol. J.*, *79*, 82–94 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/microbiolj79.06.082>
24. 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 Soil.*, *87*, 293–302. <https://doi.org/10.1007/BF02181868>
25. Lindstrom, K. (1989). Rhizobium galegae, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, *39*, 365–367. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-3-365>
26. Melnykova, N. M. (2019). Vplyv polisakharidiv ryzobii na prorostannia nasinnia soi ta bulbochkoutvorennia pry formuvanni soievo-ryzobialnoho symbiozu [Effect of rhizobial exopolysaccharides on soybean seed germination and nodule development in the soybean-rhizobia symbiosis]. *Fyziolohiya rastenyi y henetyka — Plant Physiology and Genetics*, *51*, 436–446 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/frg2019.05.436>
27. Sulewska, H., Ratajczak, K., Niewiadomska, A., & Panasiewicz, K. (2019). The use of microorganisms as bio-fertilizers in the cultivation of white lupine. *Open Chem.*, *17*, 813–822. <https://doi.org/10.1515/chem-2019-0089>
28. Monroy-Guerrero, M., Memenza-Zegarra, M., Taco, N., Mostacero, E., Ogata-Gutierrez, K., Huaranga-Joaquin, A., & Zuniga-Davila, D. (2022). Co-inoculation of Bradyrhizobium spp. and Bacillus sp. on tarwi (Lupinus mutabilis Sweet) in the high Andean region of Peru. *Agronomy*, *12*, 2132. <https://doi.org/10.3390/agronomy12092132>
29. Yevlash, V. V., Hazzavi-Rogozina, L. V., Bykova, A. S., & Tsygankov, O. V. (2019). *Tekhnichna mikrobiolohiia: praktykum* [Technical microbiology: manual]. Kharkiv: NTU “KhPI”, HDUHT [in Ukrainian].
30. 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>
31. Krykunets, V. M. (1993). Atsetylenvidnovnyi metod u doslidzhenniakh z fiziolohii bobovoryzobialnoho symbiozu [Acetylene reduction method in research on physiology of legume-Rhizobium symbiosis]. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rastenyi — Physiol. Biochem. Cult. Plants*, *25*, 419–430 [in Ukrainian].
32. Agudelo, M. G., Ruiz, B., Capela, D., & Remigi, P. (2023). The role of microbial interactions on rhizobial fitness. *Front. Plant Sci.*, *14*, 1277262. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1277262>
33. Andrews, M., & Andrews, M. E. (2017). Specificity in legume-rhizobia symbioses. *Int. J. Mol. Sci.*, *18*, 705. <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>
34. Ghosh, P. K., & Maiti, T. K. (2016). Structure of extracellular polysaccharides (EPS) produced by rhizobia and their functions in legume-bacteria symbiosis: a review. *Achiev. Life Sci.*, *10*, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.als.2016.11.003>

Received 28.09.2024