

ШТАМ *MESORHIZOBIUM CICERI* ND-64 — ЕФЕКТИВНИЙ МІКРОСИМБІОНТ НУТУ СУЧАСНИХ СОРТІВ

О. В. Логоша, Ю. О. Воробей, І. В. Волкова, Т. О. Усманова

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН,
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14035, Україна; e-mail: olga.logosha94@gmail.com

Мета. Дослідити конкурентоспроможність, комплементарність нового штаму бульбочкових бактерій нуту *Mesorhizobium ciceri* ND-64, вивчити вплив інокуляції насіння на продуктивність та урожайність різних сортів нуту за їх вирощування в різних ґрунтово-кліматичних зонах України. **Методи.** Серологічний, газохроматографічний, польового дослідження та статистичні. **Результати.** Застосування нового штаму *M. ciceri* ND-64 для передпосівної бактеризації насіння нуту сортів Скарб, Адмірал, Одисей, Буджак, Триумф та Пам'ять за вирощування в умовах польових дослідів у Степовій зоні на фоні місцевої популяції бульбочкових бактерій сприяє достовірному збільшенню кількості азотфіксувальних бульбочок на 5–44 %, збільшенню маси бульбочок на 10–67 % та нітрогеназної активності на 26–150 %, якщо порівняти з позитивним контролем (інокуляція референтним штамом *M. ciceri* H-12). Використання *M. ciceri* ND-64 для передпосівної бактеризації насіння нуту за вирощування в Степовій зоні України також позитивно впливало на збільшення урожайності нуту — на 4–18 % проти позитивного контролю. Інокуляція новим штамом насіння нуту сортів Скарб, Триумф та Пам'ять сприяла утворенню більшої кількості бульбочок (на 57–89 %), зростанню маси бульбочок (в 2,2–2,9 рази) та їх нітрогеназної активності (в 2–4 рази) проти позитивного контролю за вирощування в зоні Полісся на полях, де відсутня популяція ризобій нуту. За цих умов показано збільшення структурних показників урожаю, найвищий приріст урожайності нуту, підвищення фотосинтетичної активності та вмісту білка в зерні за інокуляції *M. ciceri* ND-64. Отримання шляхом імунізації кролів специфічної антисироватки дозволило виявити серологічну спорідненість штамів *M. ciceri* ND-64, *M. ciceri* H-101, *Mesorhizobium* sp. ND-601 та *M. ciceri* ND-64, виділених із бульбочок нуту сортів Скарб та Пам'ять. За використання імунологічного методу в умовах польового дослідження визначено конкурентоспроможність *M. ciceri* ND-64. Встановлено, що у варіанті з інокуляцією штамом *M. ciceri* ND-64 100 % бульбочок утворено представниками цієї серогрупи. **Висновки.** Штам *M. ciceri* ND-64 є ефективним мікросимбіонтом рослин нуту, що зумовлено його вірулентністю, конкурентоспроможністю, азотфіксувальними властивостями. За результатами польових дослідів показано, що новий штам, комплементарний до всіх досліджуваних сортів, що відрізняються за розміром та формою насіння, типом куща та середньою висотою, формує ефективний симбіоз за вирощування рослин нуту як на фоні активної місцевої популяції ризобій, так і відсутності популяції *M. ciceri* в ґрунті. Симбіотичні показники за обробки насіння штамом *M. ciceri* ND-64 перевищують ці значення у варіантах з інокуляцією референтним штамом *M. ciceri* H-12 та штамми, виділеними з бульбочок кожного досліджуваного сорту. Отже, *M. ciceri* ND-64 може використовуватись як біоагент мікробного препарату для інокуляції нуту різних сортів з метою формування ефективного бобово-ризобіального симбіозу, підвищення продуктивності цієї культури та покращення якості насіння

Ключові слова: бобово-ризобіальний симбіоз, бульбочкові бактерії, *Mesorhizobium ciceri*, нут.

Вступ. Кількісний та якісний склад популяцій ризобій, сформованих у ґрунті під час вирощування бобових культур, часто не відповідає вимогам сільськогосподарського виробництва [1–2]. Аборигенні бульбочкові бактерії можуть поступатися за своєю активністю та ефективністю штамам, які селекціоновані за цими ознаками [3–4]. Тому включення в технології вирощування нуту інокуляції насіння високоефективними та конкурентоспроможними штамми *M. ciceri* є необхідним агрозаходом для отримання стабільних урожаїв культури [5–6].

З літературних джерел відомо явище комплементарності — здатності до формування ефективної симбіотичної системи між визначеними штамми бульбочкових бактерій і бобовими рослинами певних сортів [7–8]. Так, деяким видам ризобій притаманна сортова специфічність, обумовлена відповідністю їх генотипу до генотипу рослини-хазяїна [9–10]. Штам бульбочкових бактерій може утворювати ефективний симбіоз з рослинами одного сорту, водночас взаємодія з іншими сортами може бути менш ефективною [7; 11]. Зважаючи на активну селекцію нових сортів нуту, яка проводиться в Україні та за кордоном [12–13], актуальним є пошук ефективних штамів бульбочкових бактерій нуту шляхом комплементарного добору макро- та мікросимбіонтів, що сприятиме підвищенню врожайності цієї культури.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Протягом 2007–2014 років в Україні проведено дослідження комплементарності штамів *M. ciceri* до різних сортів нуту в умовах Степової зони. Так, вітчизняними дослідниками підібрано ефективні штамми *M. ciceri* до сортів Луганець, Смачний, Колорит, Розана, Олександрит, Пам'ять, Тріумф та Буджак [7; 14]. Серед зазначених сортів нуту на момент нашого дослідження в Державному реєстрі сортів рослин, придатних до поширення в Україні, були зареєстровані лише сорти Пам'ять, Буджак та Тріумф, а також нові сорти — Скарб та Одисей [15], до яких ще не підібрано комплементарні штамми *M. ciceri*. У зоні Полісся подібні дослідження взагалі раніше не проводилися.

У роботах іноземних вчених показано, що ризобії нуту можуть належати до різних серологічних груп та водночас не виявляють серологічної спорідненості з іншими видами бульбочкових бактерій [10; 16]. Серологічну різноманітність штамів ризобій нуту, поширених в агроценозах України, та їхню конкурентоспроможність майже не досліджено.

Матеріали і методи. У серії вегетаційних дослідів відібрано найефективніші штамми ризобій, виділені з бульбочок кожного досліджуваного сорту: *M. ciceri* ND-64 та *M. ciceri* ND-601 (з бульбочок нуту сорту Пам'ять), *M. ciceri* ND-101 (Скарб), *Mesorhizobium* sp. ND-25 (Адмірал), *Mesorhizobium* sp. ND-3 (Одисей), *Mesorhizobium* sp. ND-46 (Буджак), *Mesorhizobium* sp. ND-50 (Тріумф). Як позитивний контроль використовували референтний штам — *M. ciceri* Н-12 (виділений з бульбочок нуту сорту Совхозний 14).

Сорти нуту селекції Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннезнавства та сортовивчення (СГІ-НЦНС) Пам'ять, Тріумф, Буджак, Одисей та Скарб є офіційно зареєстрованими (табл. 1) та пристосованими до ґрунтово-кліматичних умов України, придатні до інтенсивної технології вирощування й мають достатній рівень толерантності до основних хвороб. Сорт нуту Скарб районований для вирощування в Лісостепу України [17].

Сорти нуту селекції Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннезнавства та сортовивчення (СГІ-НЦНС) Пам'ять, Тріумф, Буджак, Одисей та Скарб є офіційно зареєстрованими (табл. 1) та пристосованими до ґрунтово-кліматичних умов України, придатні до інтенсивної технології вирощування й мають достатній рівень толерантності до основних хвороб. Сорт нуту Скарб районований для вирощування в Лісостепу України [17].

Таблиця 1. Характеристика сортів нуту селекції СГІ-НЦНС

Назва сорту	Рік реєстрації	Районування, зона	Маса 1000 насінин, г	Характеристика сорту
Пам'ять	2002	Степ	315	середньонасінний
Тріумф	2005	Степ	405	крупнонасінний
Буджак	2008	Степ	410	крупнонасінний
Одисей	2014	Степ	415	крупнонасінний
Скарб	2017	Лісостеп	420	крупнонасінний
Адмірал	На випробуванні	Степ	380	крупнонасінний

Вплив інокуляції бульбочковими бактеріями насіння нуту сортів Скарб, Адмірал, Одисей, Буджак, Тріумф і Пам'ять оцінювали в умовах польового досліду СГІ-НЦНС (Одеська область). Грунтовий покрив представлений південним середньогумусним важкосуглинним чорноземом на лесових відкладеннях та характеризується такими агрохімічними показниками: товщина гумусного шару — 40–50 см, вміст гумусу — 3,5–4,5 %; сума поглинутих основ — 40–45 мг-екв. на 100 г ґрунту; вміст доступних форм елементів живлення (в мг-екв. на 100 г ґрунту): 3–4 — азоту, 10–15 — P_2O_5 та 20–30 — K_2O ; реакція ґрунтового розчину нейтральна або слаболужна (рН сольової витяжки — 6,0–7,2).

Польові дослідження також проводили на дослідних ділянках Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва Національної академії аграрних наук України (ІСМАВ НААН) в зоні Полісся (Чернігівська область). Грунтовий покрив — чорнозем вилугуваний неглибокий легкосуглинковий на лесовидних суглинках, характеризується такими агрохімічними показниками: вміст гумусу в орному шарі — 3,6 %, рухомих форм фосфору (за Кірсановим) — 210–240 мг P_2O_5 на 1 кг ґрунту, обмінного калію (за Кірсановим) — 160–170 мг K_2O на 1 кг ґрунту, рН водне — 6,5.

Для інокуляції насіння нуту в дослідах використовували рідку культуру бактерій, яку вирощували на качалці за 220 об./хв. протягом 3 діб. Розводили стерильною водою із розрахунку 10^6 клітин/насінину, титр визначали в камері Горяєва [18]. Насіння контрольного варіанту зволожували водою (1–2 % від маси).

Для кожного сорту схема досліду включала інокуляцію суспензією референтного штаму *M. ciceri* Н-12 (позитивний контроль), варіант з використанням активного штаму, виділеного з бульбочок відповідного сорту, а також бактеризацію *M. ciceri* ND-64 — найефективнішим штамом за результатами вегетаційних дослідів.

Облікова площа ділянок польових дослідів складала 10 м². Повторність дослідів — 4-разова, розміщення варіантів — рендомізоване. Попередник — овес ярий. Протруйники та гербіциди не застосовували, бур'яни

знищували вручну [19].

Нітрогеназну активність бульбочок визначали ацетиленовим методом на газовому хроматографі «Chrom-4» з полум'яно-іонізаційним детектором [20].

Визначення масової частки хлорофілів *a* і *b* проводили спектрофотометричним методом. З метою отримання витяжки зелених пігментів свіжі листки розтирали у фарфоровій ступці з етиловим спиртом і кварцовим піском. Після ретельної гомогенізації листків додавали ще 10 мл спирту, отриманий розчин відфільтровували за допомогою скляного фільтру й колби Бунзена. Доводили об'єм розчину до 25 мл. Мірну пробірку з отриманою витяжкою закривали гумовою пробкою, вміст добре перемішували та визначали за допомогою фотоелектроколориметра КФК-3 оптичну густина рідини [21].

Поліклональні імунні О-антисироватки до штаму *M. ciceri* ND-64 отримували за методичними рекомендаціями досліджень бульбочкових бактерій [22; 23]. Ризобії вирощували на агаризованому бобовому середовищі за 28 °С. У логарифмічній фазі росту бактеріальну масу змивали з агару фізіологічним розчином, осаджували центрифугуванням. До осаду клітин бульбочкових бактерій додавали 5 мл фізіологічного розчину та 5 мл 2,5 %-го розчину глютарового альдегіду і на добу залишали в холодильній камері. Через добу бактеріальні клітини (антиген) відмивали від глютарового альдегіду фізіологічним розчином шляхом центрифугування. Осад ресуспендували фізіологічним розчином і доводили титр антигену до $2 \cdot 10^9$ клітин/мл.

Сироватка до штаму була одержана шляхом імунізації кролів за схемою: чергування введення щораз більшої дози антигену підшкірно й внутрішньошкірно спочатку з тижневим інтервалом, а потім — через 3 дні. Відбір крові здійснювали через тиждень після останньої імунізації (табл. 2). Розроблена схема дозволила одержати високоактивну антисироватку *M. ciceri* ND-64 з титром у гомологічних реакціях аглютинації 1:10 000.

Специфічність антисироватки перевіряли в реакції аглютинації за методом Грубеля-Відаля [24]. Як антигени використовували повільно- та швидко рослі бульбочкові бактерії різних видів, що зберігаються у Колекції корисних ґрунтових мікроорганізмів

ІСМАВ НААН. Бактеріальну масу досліджуваних штамів змивали з агару фізіологічним розчином, кип'ятили та зберігали в холодильнику. Титр антигенів у реакції аглютинації становив $1 \cdot 10^6$ клітин/мл.

Таблиця 2. Схеми імунізації кролів штамом *M. ciceri* ND-64

№ ін'єкції	Кількість антигену, мл	Титр антигену, клітин/мл	Спосіб введення антигену
Імунізація			
1	1	10^6	Підшкірно
2	1	10^7	Внутрішньошкірно
3	1	10^8	Підшкірно
4	1	10^9	Внутрішньошкірно
5	2	10^9	Підшкірно

Конкурентоспроможність штаму *M. ciceri* ND-64 вивчали в умовах польового дослідження та визначали за допомогою реакції аглютинації. Для цього відбирали бульбочки, які формувалися на контрольних рослинах та на рослинах, інюльованих штамми *M. ciceri* Н-12 та *M. ciceri* ND-64. Кожну бульбочку руйнували скляною паличкою в окремому пеніциліновому флаконі з 1–2 мл фізіологічного розчину. Отриманий гомогенат використовували як антиген у реакції аглютинації. З кожного варіанта аналізували 40 бульбочок. Негативним контролем у реакції аглютинації були фізіологічний розчин + антиген (гомогенат бульбочок), позитивним — антисироватка + антиген, отриманий із чистої культури бульбочкових бактерій *M. ciceri* ND-64, проти якої отримана антисироватка [18].

Визначення вмісту азоту та білка в насінні нуту проводили в Лабораторії агрохімічних, токсиколого-радіологічних досліджень екологічної безпеки ґрунтів та якості продукції Львівської філії ДУ «Держґрунтохорона» за ДСТУ 7169:2010 [25].

Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за допомогою методів математичної статистики та з використанням комп'ютерної програми Statistica 6.0 та ANOVA1.

Обговорення результатів. Упродовж 2016–2017 років нами виділено 69 ізолятів

Mesorhizobium sp. з бульбочок нуту шести сортів, відібраних у південному регіоні країни (Одеська область), де в ґрунті сформувалась активна популяція ризобій унаслідок багаторічного (понад 10 років) вирощування нуту, а також у нових районах вирощування цієї культури на полях західного регіону країни (Львівська область) [26].

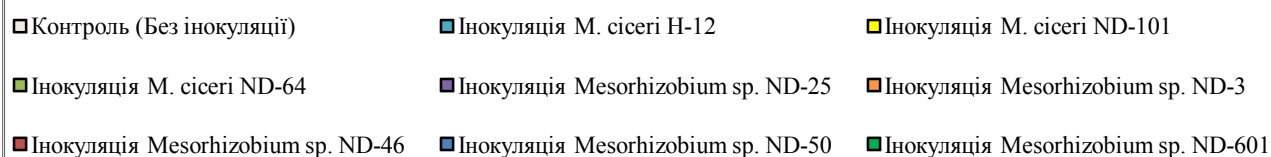
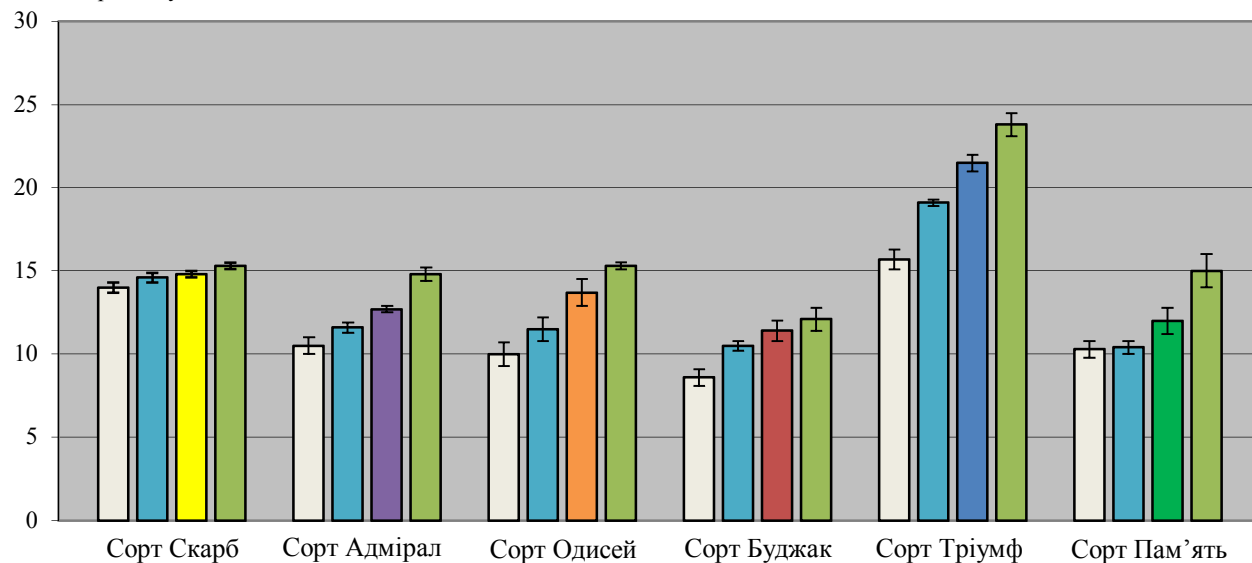
За результатами серії вегетаційних дослідів на стерильному субстраті для кожного досліджуваного сорту відбирали штамми — найефективніші мікросимбіонти, виділені з бульбочок рослин відповідного сорту. Найефективніший симбіоз формувался за інюляції насіння нуту сорту Пам'ять штамом *M. ciceri* ND-64, що сприяло утворенню на коренях рослин бульбочок на 82 % більше за позитивний контроль (інюляцію референтним штамом *M. ciceri* Н-12).

Ефективність бактеризації насіння нуту сортів української селекції досліджували в умовах польового дослідження в південному регіоні України. У фазу цвітіння визначали кількість бульбочок, їх масу та нітрогеназну активність. Аналіз отриманих даних показав, що *M. ciceri* ND-64 формувал найефективніший симбіоз з рослинами всіх досліджуваних сортів, якщо порівняти зі штамми, виділеними з бульбочок цих сортів та референтним штамом *M. ciceri* Н-12. Його застосування сприяло достовірному збільшенню кількості бульбочок на 10–52 % і 5–44 % проти абсолютного й позитивного контролів, збільшенню маси бульбочок на 22–130 % і 10–67 % відповідно, та нітрогеназної активності на 26–150 % проти референтного штаму *M. ciceri* Н-12 (рис. 1. А, Б, В).

Отримані нами дані узгоджуються з результатами досліджень, проведених в різних країнах [1; 7; 27–29], згідно з якими інюляція насіння нуту ефективними штамми бульбочкових бактерій сприяє збільшенню показників симбіотичної активності, навіть за вирощування рослин на ґрунтах з активними аборигенними популяціями ризобій.

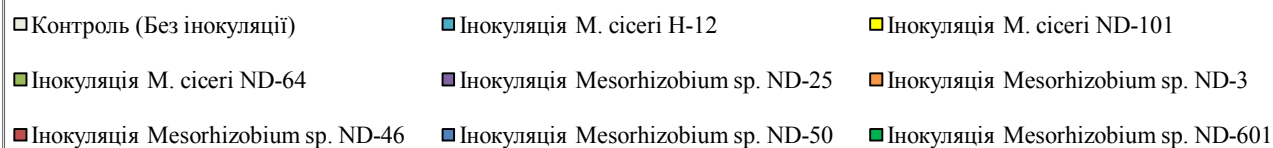
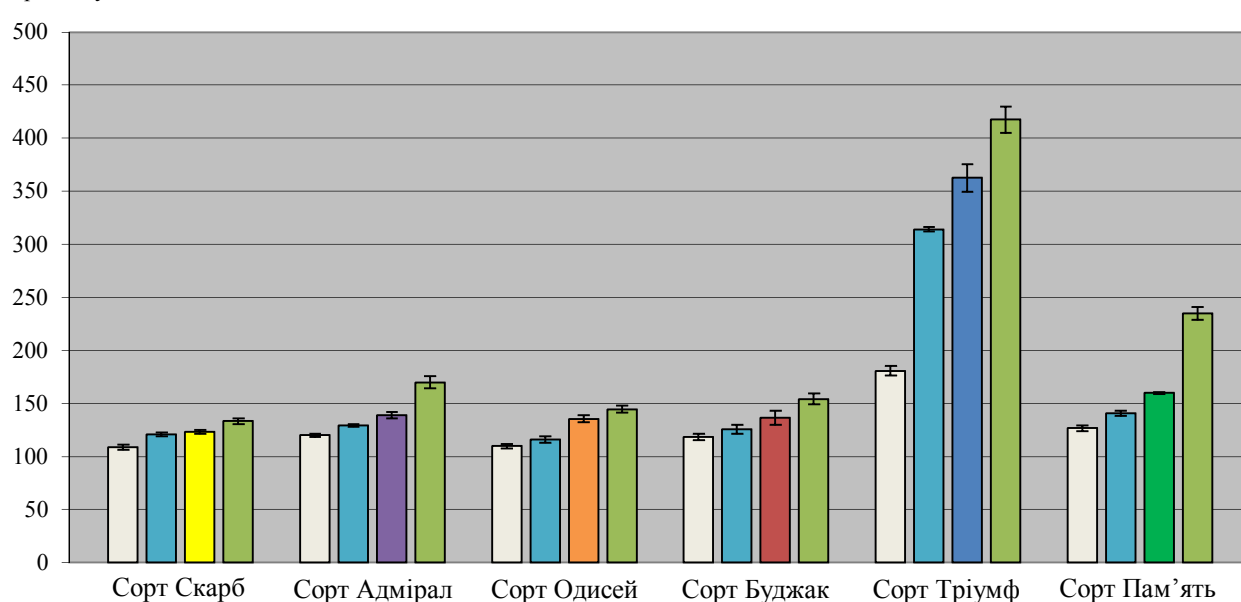
З літературних даних відомо, що існує залежність між активністю нітрогенази та масою бульбочок у варіантах з інюляцією ефективними штамми [3; 6; 30]. За результатами наших досліджень також показано, що нітрогеназна активність бульбочок нуту та їх маса була найвищою у варіантах з інюляцією *M. ciceri* ND-64.

Кількість бульбочок,
одиниць/рослину

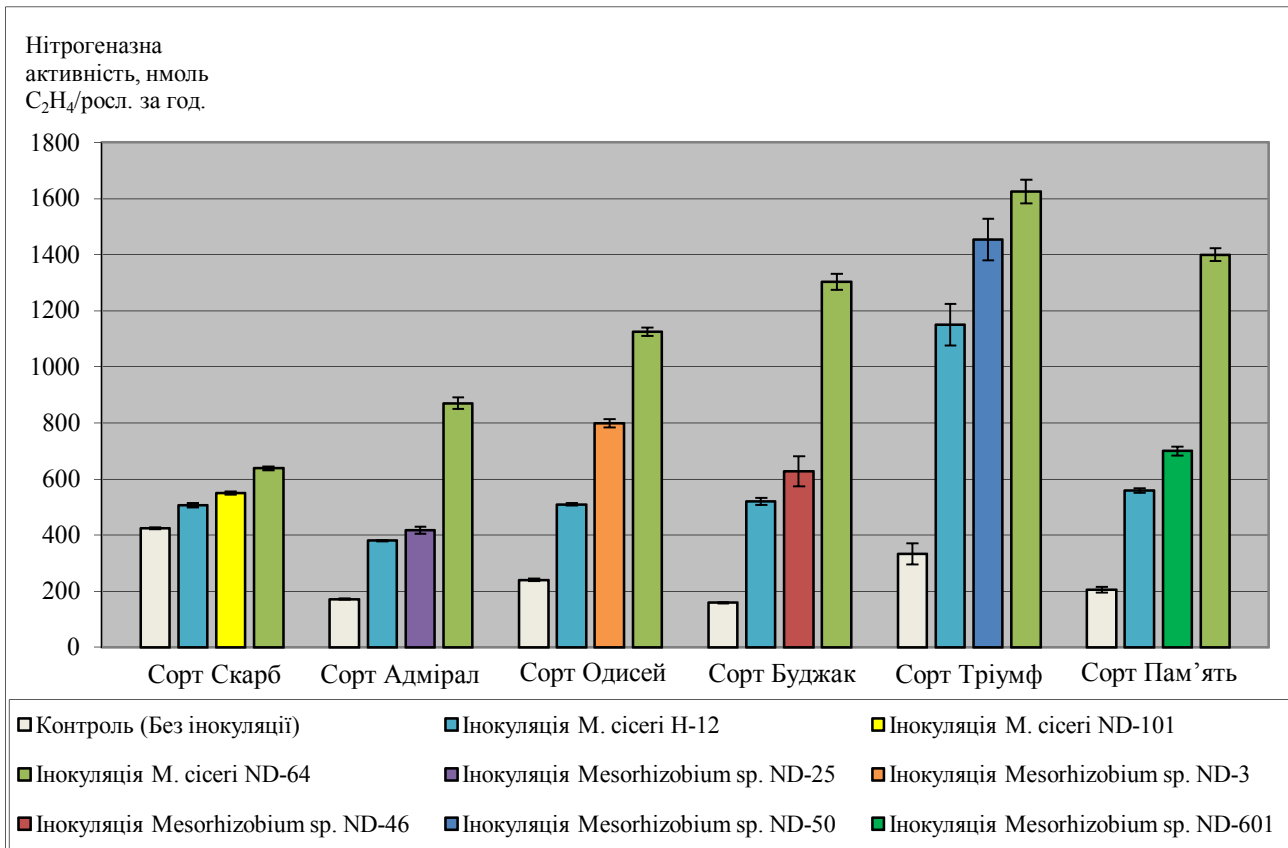


А)

Маса бульбочок,
г/рослину



Б)



В)

Рис. 1. Симбіотична активність нових штамів бактерій роду *Mesorhizobium* за вирощування нуту в зоні Степу (СГІ-НЦНС, Одеська обл., 2018 р.): А) — кількість бульбочок; Б) — маса бульбочок; В) — нітрогеназна активність.

Інокуляція насіння нуту ефективними штамми ризобій сприяє зростанню врожайності культури [1; 28; 31]. За даними вітчизняних та закордонних вчених, окремі штами ризобій можуть формувати ефективний симбіоз лише з певними сортами нуту [7; 11; 14]. За даними наших досліджень, за вирощування нуту на ґрунтах з активною популяцією бульбочкових бактерій (Одеська область) найбільш ефективною виявилась обробка насіння суспензією *M. ciceri* ND-64, що сприяло підвищенню урожайності на 4–18 % і 13–39 % проти позитивного й абсолютного контролів для всіх досліджуваних сортів (табл. 3). Це свідчить про комплементарність цього штаму до крупнонасінних сортів нуту: Скарб, Адмірал, Одисей, Буджак та Тріумф і середньонасінного сорту Пам'ять.

З літературних джерел відомо, що тип ґрунту та наявність аборигенної популяції бульбочкових бактерій може впливати на ефективність формування симбіозу [4, 27–29]. У зв'язку з цим ми також досліджували ефективність нових штамів роду *Mesorhizobium* та їхню здатність до утворення ком-

плементарних пар з рослинами сортів Скарб, Тріумф та Пам'ять в умовах Полісся на дослідному полі, де раніше не вирощували цю культуру, і в ґрунті не сформувалася популяція ризобій нуту. Найвищі показники симбіотичної активності спостерігали за інокуляції насіння бактеріальною суспензією *M. ciceri* ND-64. Так, кількість бульбочок зростала на 57–89 % до показників позитивного контролю, маса бульбочок — у 2,2–2,9 раза, а їх нітрогеназна активність — у 2–4 рази (рис. 2. А, Б, В).

Інокуляція насіння нуту суспензією *M. ciceri* ND-64 за вирощування в зоні Полісся також сприяла найбільшому приросту структурних показників та врожайності всіх досліджуваних сортів, що свідчить про їх комплементарність даному штаму. Так, за бактеризації насіння нуту штамом *M. ciceri* ND-64 спостерігали підвищення висоти рослин (на 6–17 %), кількості бобів (на 19–62 %) та насінин (на 25–64 %), маси насінин з рослини (на 28–40 %) та збільшення врожайності на 28–35 % щодо показників контрольного варіанту (табл. 4).

Таблиця 3. Вплив інокуляції на врожайність нуту різних сортів (СГІ-НЦНС, Степова зона, 2018 р.)

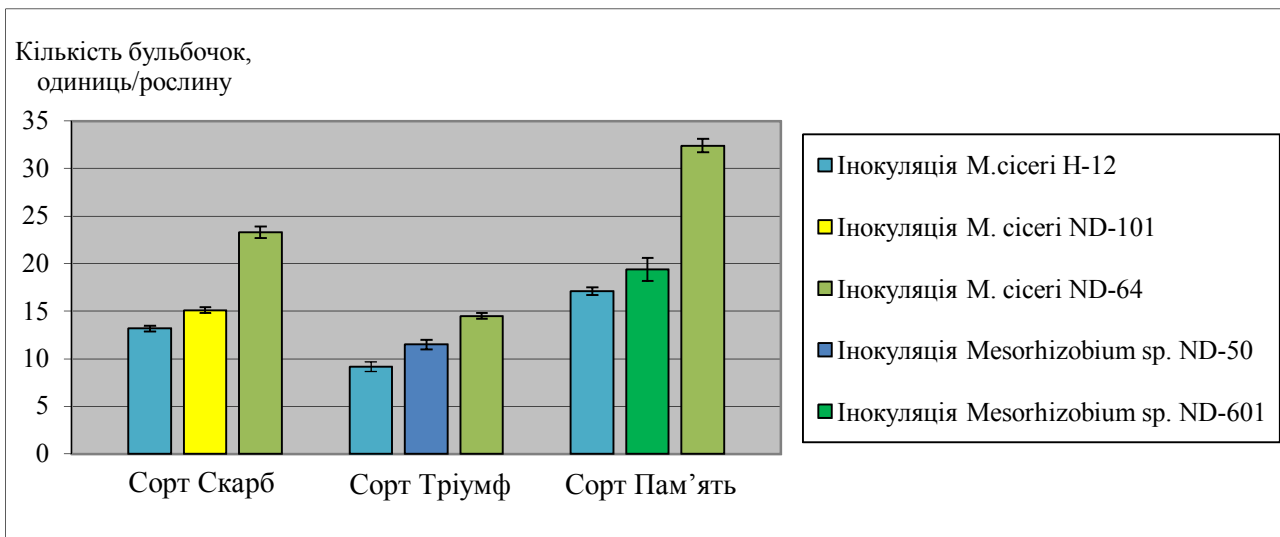
Сорти	Варіанти дослідів	Урожайність, т/га	Приріст (до контролю)	
			т/га	%
Скарб	Контроль (без інокуляції)	1,44 ± 0,11	–	–
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> Н-12	1,69 ± 0,07	0,25	17,4
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-101	1,82 ± 0,04	0,38	26,4
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	2,00 ± 0,09	0,56	38,9
Адмірал	Контроль (без інокуляції)	1,56 ± 0,03	–	–
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> Н-12	1,71 ± 0,05	0,15	9,6
	Інокуляція <i>Mesorhizobium</i> sp. ND-25	1,77 ± 0,08	0,21	13,5
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	1,92 ± 0,04	0,36	23,1
Одисей	Контроль (без інокуляції)	1,65 ± 0,03	–	–
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> Н-12	1,86 ± 0,06	0,21	12,7
	Інокуляція <i>Mesorhizobium</i> sp. ND-3	1,94 ± 0,05	0,29	17,6
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	2,06 ± 0,05	0,41	24,9
Буджак	Контроль (без інокуляції)	1,68 ± 0,03	–	–
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> Н-12	1,89 ± 0,04	0,21	12,5
	Інокуляція <i>Mesorhizobium</i> sp. ND-46	1,92 ± 0,01	0,24	14,3
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	2,04 ± 0,07	0,36	21,4
Тріумф	Контроль (без інокуляції)	1,66 ± 0,04	–	–
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> Н-12	1,85 ± 0,05	0,19	11,4
	Інокуляція <i>Mesorhizobium</i> sp. ND-50	1,77 ± 0,03	0,11	6,6
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	2,15 ± 0,04	0,49	29,5
Пам'ять	Контроль (без інокуляції)	1,62 ± 0,04	–	–
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> Н-12	1,76 ± 0,05	0,14	8,6
	Інокуляція <i>Mesorhizobium</i> sp. ND-601	1,79 ± 0,06	0,17	10,5
	Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	1,83 ± 0,05	0,21	13,0

Відомо, що існує позитивний зв'язок між показниками інтенсивності процесу фотосинтезу в листках інокульованих рослин та здатністю до фіксування молекулярного азоту бульбочковими бактеріями [32]. Нами показано, що інокуляція насіння нуту *M. ciceri* ND-64 сприяє підвищенню вмісту хлорофілу *a* і *b* в листках на 33 % і 42 % проти абсолютного та позитивного контролів (табл. 5).

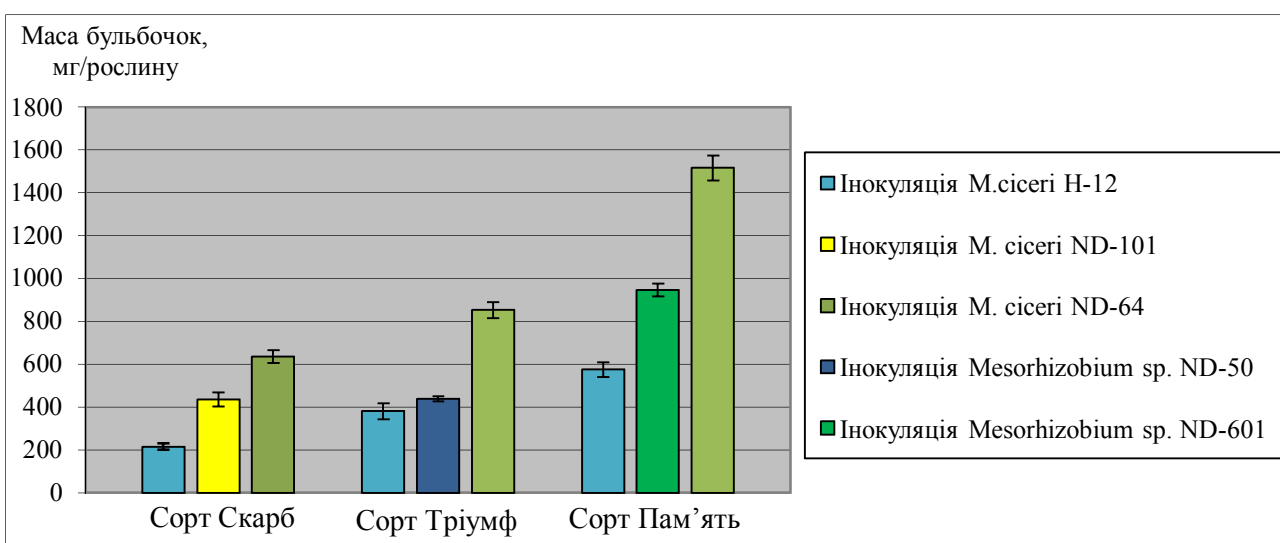
Використання для бактеризації бобових культур мікробних препаратів на основі ефективних штамів ризобій сприяє підвищенню азотфіксуючої активності бульбочок, що забезпечує зростання вмісту в насінні азоту й білка [27]. Нами показано, що інокуляція насіння нуту сорту Пам'ять сус-

пензією *M. ciceri* ND-64 сприяє зростанню вмісту азоту в насінні на 0,2 % і 0,4 %, масової частки білка — на 1,3 % і 2,5 % щодо показників позитивного та абсолютного контролів за фактичної вологості насіння. В перерахунку на суху речовину цей показник становив 1,6 % і 2,8 % (табл. 6).

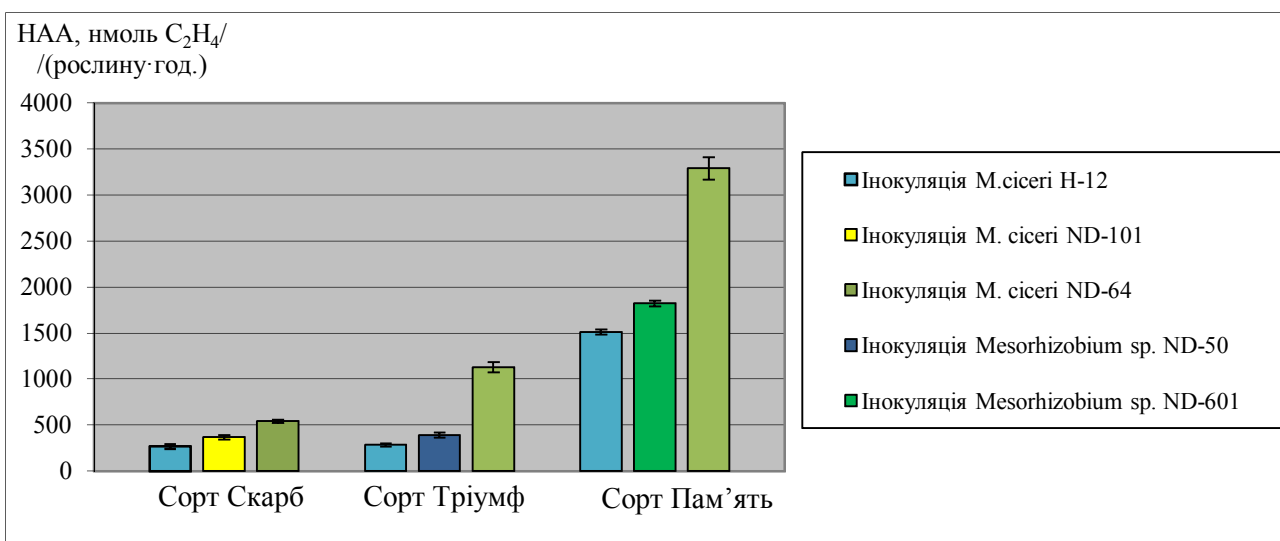
Раніше нами встановлено, що штами ризобій нуту, виділені з місцевих популяцій Степової та Лісостепової зон України, істотно розрізняються за морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками [26], що зумовило проведення серологічних досліджень за використання отриманої нами імунної антисироватки до найбільш ефективного штаму *M. ciceri* ND-64.



А)



Б)



В)

Рис. 2. Симбіотична активність нових штамів бактерій роду *Mesorhizobium* за вирощування нуту в зоні Полісся (ІСМАВ НААН, Чернігівська обл., 2018 р.): А) — кількість бульбочок; Б) — маса бульбочок; В) — нітрогеназна активність.

Таблиця 4. Вплив інокуляції на структурні показники урожаю нуту (ІСМАВ НААН, зо-на Полісся, 2018 р.)

Варіанти дослідів	Висота рослин, см	Кількість бобів, од./рослину	Кількість насінин, од./рослину	Маса насінин, г/рослину	Урожайність, т/га
Сорт Скарб					
Контроль (без інокуляції)	52,5 ± 0,7	25,1 ± 0,9	13,4 ± 0,7	4,0 ± 0,2	1,21 ± 0,02
Інокуляція <i>M. ciceri</i> Н-12	56,0 ± 0,7	30,4 ± 1,4	15,1 ± 0,7	4,3 ± 0,2	1,39 ± 0,06
Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-101	57,6 ± 0,7	31,7 ± 1,1	17,6 ± 1,0	4,8 ± 0,2	1,45 ± 0,04
Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	61,6 ± 1,0	39,0 ± 3,0	19,2 ± 2,0	5,4 ± 0,6	1,63 ± 0,07
Сорт Тріумф					
Контроль (без інокуляції)	54,5 ± 0,7	24,1 ± 0,9	11,4 ± 0,7	3,0 ± 0,2	1,19 ± 0,02
Інокуляція <i>M. ciceri</i> Н-12	55,1 ± 1,0	30,8 ± 1,5	13,3 ± 0,7	3,6 ± 0,3	1,38 ± 0,02
Інокуляція <i>Mesorhizobium</i> sp. ND-50	55,9 ± 2,0	29,8 ± 1,7	12,9 ± 1,1	3,9 ± 0,4	1,42 ± 0,05
Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	56,2 ± 1,6	31,4 ± 1,8	16,8 ± 1,0	4,4 ± 0,3	1,64 ± 0,04
Сорт Пам'ять					
Контроль (без інокуляції)	102,3 ± 0,8	26,4 ± 0,7	16,1 ± 0,6	4,1 ± 0,2	1,24 ± 0,03
Інокуляція <i>M. ciceri</i> Н-12	108,2 ± 1,0	32,3 ± 1,0	17,5 ± 0,9	4,8 ± 0,3	1,45 ± 0,04
Інокуляція <i>Mesorhizobium</i> sp. ND-601	108,4 ± 1,3	35,5 ± 1,9	18,5 ± 1,3	4,9 ± 0,4	1,50 ± 0,02
Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	108,8 ± 1,1	42,9 ± 2,3	20,2 ± 2,0	5,3 ± 0,5	1,59 ± 0,05

Таблиця 5. Вміст хлорофілу в листках рослин нуту сорту Пам'ять

Варіанти дослідів	Сума хлорофілів <i>a + b</i> , мг/100 г
Контроль (без інокуляції)	149,4 ± 2,1
Інокуляція <i>M. ciceri</i> Н-12	159,6 ± 1,5
Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	212,3 ± 3,4

Для серологічної ідентифікації бульбочкових бактерій використовують їхню властивість утворювати не лише видоспецифічні антигени, а й ізоантигени, характерні для штамів одного виду, що впливає на формування специфічної антигенної структури у деяких штамів або груп штамів ризобій [10; 33]. Вивчення серологічних ознак мікросимбіон-

тів нуту дає можливість здійснювати їх серологічне типування та дослідити конкурентоспроможність ефективного штаму у різних ґрунтово-кліматичних умовах [34].

Встановлено, що отримана нами антисироватка не реагує зі штамми, які належать до повільнорослих ризобій видів *Bradyrhizobium japonicum* та *Bradyrhizobium lupini*, інтенсивнорослих бульбочкових бактерій родів *Rhizobium* та *Ensifer*, а також з більшістю штамів роду *Mesorhizobium* (табл. 7). Варто зазначити, що штамми *M. ciceri* ND-101, *Mesorhizobium* sp. ND-601, виділені з бульбочок нуту сортів Скарб та Пам'ять, виявилися серологічно спорідненими до штаму *M. ciceri* ND-64, до якого отримано антисироватку. Штами *M. ciceri* 065, *M. ciceri* НС-6 виявляли

Таблиця 6. Вплив інокуляції насіння штамми *M. ciceri* на якість насіння нуту

Варіанти дослідів	Вологість, %	Вміст азоту за фактичної вологості, %	Масова частка білка за фактичної вологості, %	Масова частка білка в перерахунку на суху речовину, %
Контроль (без інокуляції)	10,5	2,20	13,7	15,3
Інокуляція <i>M. ciceri</i> Н-12	9,7	2,38	14,9	16,5
Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	10,5	2,59	16,2	18,1
НІР ₀₅	0,01	0,10	0,09	0,05

Таблиця 7. Результати реакції аглютинації бульбочкових бактерій різних видів з антисироваткою до *M. ciceri* ND-64

Штами мікроорганізмів	Рослина-господар	Антисироватка до <i>M. ciceri</i> ND-64
<i>M. ciceri</i> ND-64	Нут	+++
<i>M. ciceri</i> ND-101		++
<i>M. ciceri</i> H-12		–
<i>M. ciceri</i> H-18		–
<i>M. ciceri</i> 065		+
<i>M. ciceri</i> HC-6		+
<i>M. ciceri</i> 522		–
<i>Mesorhizobium</i> sp. ND-25		–
<i>Mesorhizobium</i> sp. ND-3		–
<i>Mesorhizobium</i> sp. ND-46		–
<i>Mesorhizobium</i> sp. ND-50		–
<i>Mesorhizobium</i> sp. ND-601		+++
<i>Mesorhizobium</i> sp. NZ-11		–
<i>Mesorhizobium</i> sp. NZ-25		–
<i>M. loti</i> ЛД-1-2	Лядвенець	–
<i>M. loti</i> ЛД-8		–
<i>Mesorhizobium</i> sp. АКЦ-4	Акація	–
<i>Mesorhizobium</i> sp. АКЦ-2		–
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> B-1967	Соя	–
<i>Rhizobium leguminosarum</i> B-1964	Горох	–
<i>Ensifer meliloti</i> ДН-15	Буркун	–
<i>Ensifer meliloti</i> 425a	Люцерна	–
<i>Bradyrhizobium lupini</i> 367a	Люпин	–

Примітка: +, ++, +++ — ступені аглютинації.

слабку позитивну реакцію з отриманою антисироваткою. Отже, ризобії *M. ciceri* ND-101, *Mesorhizobium* sp. ND-601, *M. ciceri* 065, *M. ciceri* HC-6, які характеризуються помірною швидкістю росту на бобовому агарі (колонії з'являються на 4–6-у добу культивування), належать до однієї серогрупи зі штамом *M. ciceri* ND-64. Водночас штамми з помірною швидкістю росту *M. ciceri* H-12, *M. ciceri* H-18, *M. ciceri* 522 та швидкорослі штамми роду *Mesorhizobium* (колонії з'являються на 2–3-ю добу) належать до інших серологічних груп.

Тривале вирощування бобової культури в ґрунтах сприяє формуванню місцевої популяції ризобій. Однак мікросимбіонти можуть втрачати свою активність та ефективність унаслідок мутаційних процесів [3; 6].

Тому для формування ефективного симбіотичного апарату необхідно проводити інокуляцію насіння високоефективними та конкурентоспроможними штамми.

Для визначення конкурентоспроможності нового штаму бульбочкових бактерій нуту нами проведено аналіз гомогенатів бульбочок (відібраних з дослідного поля ІСМАВ НААН, де почала формуватися популяція ризобій нуту завдяки 3-річному вирощуванню цієї культури) в реакції аглютинації.

Показано, що в контрольному варіанті переважна кількість бульбочок (78,2 %) утворена бактеріями — представниками серогрупи *M. ciceri* ND-64 (табл. 8). Всі бульбочки, утворені внаслідок інокуляції *M. ciceri* ND-64, на 100 % належали до серогрупи цього ж штаму.

Таблиця 8. Конкурентоспроможність штаму *M. ciceri* ND-64 в умовах польового досліджу (ІСМАВ НААН, чорнозем вилугуваний, 2019 р.)

Варіанти досліджу	Частка бульбочок, утворених представниками серогрупи <i>M. ciceri</i> ND-64, %
Без інокуляції (контроль)	78,2
Інокуляція <i>M. ciceri</i> Н-12	12,4
Інокуляція <i>M. ciceri</i> ND-64	100
НІР ₀₅	5

Отже, селекціоновано ефективний високівірulentний конкурентоспроможний штам *M. ciceri* ND-64, комплементарний до більшості сортів нуту української селекції, який характеризується високою нітрогеназною активністю в симбіозі та сприяє підвищенню продуктивності, урожайності та якості насіння нуту.

Висновки. Штам *M. ciceri* ND-64 є ефективним мікросимбіонтом рослин нуту, що зумовлено його вірулентністю, конкурентоспроможністю, симбіотичними властивостями. За результатами польових дослідів показано, що новий штам характеризується здатністю до формування активного симбіозу з рослинами всіх досліджуваних сортів, що відрізняються за розміром та формою насіння, типом куща та середньою висотою.

Варто зазначити, що ефективний симбіоз формується за вирощування рослин нуту як на фоні активної місцевої популяції ризобій цієї культури, так і за відсутності популяції *M. ciceri* в ґрунті. Симбіотичні показники за обробки насіння штамом *M. ciceri* ND-64 перевищують відповідні значення у варіантах з інокуляцією референтним штамом *M. ciceri* Н-12 та штамми, виділеними з бульбочок кожного досліджуваного сорту.

З огляду на вищезазначене, ми рекомендуємо цей штам як біоагент мікробного препарату для інокуляції нуту різних сортів з метою формування ефективного бобово-ризобіального симбіозу, підвищення продуктивності цієї культури та покращення якості насіння.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Дідович С. В., Толкачов М. З., Бутвіна О. Ю. Ефективність симбіотичної азотфіксації в агроценозах України. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2008. Вип. 8. С. 117–125.
2. Lori M., Symnaczyk S., Mader P., De Deyn G., Gattinger A. Organic farming enhances soil microbial abundance and activity — a metaanalysis and meta-regression. *PLOS One*. 2017. Vol. 12. № 7. e0180442.
3. Sadowsky M. J., Graham P. H. Soil Biology of the Rhizobiaceae. In: Spaink H. P., Kondorosi A., Hooykaas P. J. J. (eds). *The Rhizobiaceae*. Springer, Dordrecht. 1998. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-5060-6>
4. Elias N. V., Herridge D. F. Naturalised populations of mesorhizobia in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cropping soils: effects on nodule occupancy and productivity of commercial chickpea. *Plant and soil*. 2014. Vol. 387. №1–2. P. 233–249. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2298-z>
5. Santos M. S., Nogueira M. A., Hungria M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express*. 2019. Vol. 9. № 205.
6. Andrews M., Andrews M. E. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *International journal of molecular sciences*. 2017. Vol. 18(4). № 705. <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>
7. Січкач В. І., Хухлаєв І. І., Бушулян О. В., Дідович С. В., Коблай С. В., Лаврова Г. Д., Ганжело О. І. Інтенсифікація азотфіксувального потенціалу зернобобових культур шляхом комплементарного добору макро- і мікросимбіонтів. *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету. Серія: Біологія*. 2014. Вип. 3(60). С. 165–169.
8. Duchene O., Vian J.-F., Celette F. Intercropping with legume for agroecological cropping systems: Complementarity and facilitation processes and the importance of soil microorganisms. A review. *Agriculture, ecosystems & Environment*. 2017. Vol. 240. P. 148–161. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.02.019>
9. Проворов И. А. Взаимосвязь между таксономией бобовых и специфичностью их взаимодействия с клубеньковыми бактериями. *Ботанический журнал*. 1992. Т. 77. № 8. С. 21–32.
10. Suneja P., Dudeja S. S., Dahiya P. Deciphering the phylogenetic relationships among rhizobia nodulating chickpea: A Review. *Journal of applied biology & Biotechnology*. 2016. Vol. 4(03). P. 061–070. <https://doi.org/10.7324/JABB.2016.40310>

11. Pandey R. P., Srivastava A. K., Gupta V. K., O'Donovan A., Ramteke P. W. Enhanced yield of diverse varieties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by different isolates of *Mesorhizobium ciceri*. *Environmental sustainability*. 2018. Vol. 1(4). P. 425–435. <https://doi.org/10.1007/s42398-018-00039-9>
12. Бушулян О. В., Сичкарь В. И., Бушулян М. А., Пасичник С. М. Результаты перспективы селекции нута в Украине. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2015. В. 4 (16). С. 49–54.
13. Gangola M. P., Bãga M., Gaur P. M., Chibbar R. N. Chickpea — nutritional quality and role in alleviation of global malnourishment. *Legume Perspectives*. 2014. Vol. 3. P. 33–35. <https://doi.org/10.1111/j.1757-837x.2012.00143.x>
14. Дідович С. В. Формування та функціонування симбіозу *Mesorhizobium ciceri* – *Cicer arietinum* в агроценозах південного Степу України: автореф. дис. ... канд. с.-г. наук / Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН, Чернігів, 2007.
15. Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні на 2018 р.
16. Gaur Y. D., Sen A. N. Cross inoculation group specificity in *Cicer-Rhizobium* symbiosis. *New phytologist*. 1979. Vol. 83. P. 745–754. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1979.tb02305.x>
17. Бушулян О. В. Селекція нуту — історія та перспективи. Збірник наукових праць СГІ-НЦНС. 2012. Вип. 20(60). С. 126–131.
18. Берестецкий О. А. Методические рекомендации по получению новых штаммов клубеньковых бактерий и оценке их эффективности. Л. : 1979. 33 с.
19. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта с основами статистической обработки результатов исследований. М. : Агропромиздат, 1985. 352 с.
20. Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C. The acetylene-ethylene assay for nitrogen fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*. 1968. Vol. 43(8). P. 1185–1207. <https://doi.org/10.1104/pp.43.8.1185>
21. Грицаєнко З. М., Грицаєнко А. О., Карпенко В. П. Методи біологічних та агрохімічних досліджень рослин і ґрунтів. К. : НІЧЛАВА, 2003. 320 с.
22. Методи культивування та тривалого зберігання бульбочкових бактерій у колекціях: методичні рекомендації. Чернігів : ІСМАВ НААН, 2015. 36 с.
23. Методы исследований клубеньковых бактерий. Методические рекомендации для курсов повышения квалификации научных сотрудников по сельскохозяйственной микробиологии. Л., 1981. 48 с.
24. Кэбот Э., Мейер Б. Экспериментальная иммунология. М.: Медицина, 1968. 677 с.
25. ДСТУ 7169:2010. Корми, комбікорми, комбікормова сировина. Методи визначення вмісту азоту і сирого протеїну. К. : Держспоживстандарт України, 2010. 16 с.
26. Логоша О. В., Воробей Ю. О., Усманова Т. О., Стрекалов В. М. Характеристика властивостей бульбочкових бактерій нуту, поширених в агроценозах Лісостепової та Степової зон України. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2019. Вип. 29. С. 21–28. <https://doi.org/10.35868/1997-3004.29.21-28>
27. Zaman S., Abdul Mazid M., Kabir G. Effect of *Rhizobium* inoculant on nodulation, yield and yield traits of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in four different soils of Greater Rajshahi. *Journal of life and earth science*. 2011. Vol. 6. P. 45–50. <https://doi.org/10.3329/jles.v6i0.9720>
28. Imran A., Mirza M. S., Shah T. M., Malik K. A., Hafeez F. Y. Differential response of kabuli and desi chickpea genotypes toward inoculation with PGPR in different soils. *Frontiers in microbiology*. 2015. Vol. 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00859>
29. Khaitov B., Kurbonov A., Abdiev A., Adilov M. Effect of chickpea in association with *Rhizobium* to crop productivity and soil fertility. *Eurasian journal of soil science*. 2016. Vol. 5(2). P. 105–112. <https://doi.org/10.18393/ejss.2016.2.105-112>
30. Rupela O. P. A visual rating system for nodulation of chickpea. *International chickpea newsletter*. 1990. Vol. 22. P. 22–25.
31. Gul R., Khan H., Khan N., Khan F. U. Characterization of chickpea germplasm for nodulation and effect of rhizobium inoculation on nodules number and seed yield. *Journal of animal and plant sciences*. 2014. Vol. 24(5). P. 1421–1429.
32. Bidiarani N., Prasanna R., Babu S., Hossain F., Saxena A. K. Enhancement of plant growth and yields in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) through novel cyanobacterial and biofilmed inoculants. *Microbiological research*. 2016. Vol. 188–189. P. 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.005>
33. Крутило Д. В., Волкова І. В. Серологічне різноманіття бульбочкових бактерій сої у ґрунтах України. *Агроекологічний журнал*. 2012. № 4. С. 66–71.
34. Крутило Д. В. Конкурентоспроможність штамів бульбочкових бактерій сої з повільним та інтенсивним ростом. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2011. Вип. 14. С. 64–76.

Отримано 02.09.2020

MESORHIZOBIUM CICERI ND-64 STRAIN — EFFECTIVE MICROSYMBIONT OF MODERN CHICKPEA VARIETIES

O. V. Lohosha, Yu. O. Vorobei, I. V. Volkova, T. O. Usmanova

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv
e-mail: olga.logosha94@gmail.com

Objective. Study the competitiveness, complementarity and symbiotic activity of a new strain of chickpea nodule bacteria *Mesorhizobium ciceri* ND-64, study the influence of seed inoculation on the productivity and yield of chickpea varieties of Ukrainian selection under their cultivation in different soil and climatic zones of Ukraine. **Methods.** Serological, gas chromatography, field experiment and statistical. **Results.** The use of a new strain of *M. ciceri* ND-64 for pre-sowing bacterization of chickpea seeds of varieties Skarb, Admiral, Odysei, Budzhak, Triumf and Pamiat upon growing in field experiments in the Steppe zone against the background of the local population of nodule bacteria contributes to a significant increase in nitrogen-fixing nodules by 5 % to 67 %, an increase in the mass of nodules by 10 % to 67 % and nitrogenase activity 26 % to 150 % compared with the positive control (inoculation with the reference strain of *M. ciceri* H-12). The use of *M. ciceri* ND-64 for pre-sowing bacterization of chickpea seeds under cultivation in the Steppe zone of Ukraine also had a positive effect on increasing the yield of chickpea — by 4 % to 18 % compared to the positive control. Inoculation with a new strain of chickpea seeds of varieties Skarb, Triumf and Pamiat contributed to the formation of higher number of nodules (by 57 % to 89 %), increased mass of nodules (2.2–2.9 times) and their nitrogenase activity (2–4 times) compared with the positive control upon cultivation in the Polissia zone on the fields where there is no population of chickpea rhizobia. Under these conditions, an increase in structural parameters of yield, the highest gain in chickpea yield, increase in photosynthetic activity and protein content in grain upon inoculation with *M. ciceri* ND-64 was shown. Obtaining a specific antisera by immunization of rabbits allowed to detect serological relatedness of *M. ciceri* ND-64, *M. ciceri* H-101, *Mesorhizobium* sp. ND-601 and *M. ciceri* ND-64, isolated from chickpea nodules of Skarb and Pamiat varieties. The competitiveness of *M. ciceri* ND-64 was determined using the immunological method in the field experiment. It was found that 100 % of nodules have been formed by the representatives of *M. ciceri* ND-64 in the variant where this serological group was applied for inoculation in the variant with inoculation of the strain *M. ciceri* ND-64 100 % of the nodules were formed by representatives of this serogroup. **Conclusion.** *M. ciceri* ND-64 strain is an effective microsymbiont of chickpea plants, due to its virulence, competitiveness, nitrogen-fixing properties. According to the results of field experiments, it was shown that the new strain, complementary to all studied varieties differing in seed size and shape, type of bush and average height, forms an effective symbiosis for growing chickpea plants both against the active local population of rhizobia and upon the absence of *M. ciceri* population in the soil. Symbiotic parameters upon seed treatment with suspension of *M. ciceri* ND-64 exceed these values in the variants with inoculation using the reference strain of *M. ciceri* H-12 and strains isolated from the nodules of each study variety. Therefore, *M. ciceri* ND-64 can be used as a bioagent of a microbial preparation for inoculation of chickpea of different varieties in order to form an effective bean-rhizobial symbiosis, increase the productivity of this culture and improve seed quality.

Keywords: bean-rhizobial symbiosis, nodular bacteria, *Mesorhizobium ciceri*, chickpea.

REFERENCES

1. Didovych, S. V., Tolkachov, M. Z., & Butvina, O. Ju. (2008). Efektyvnist' symbiotychnoi' azotfiktsacii' v agrocenozah Ukrainy [Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in agrocenoses of Uk-

raine]. *Silskogospodarska mikrobiologija — Agricultural Microbiology*, 8, 117–125 [in Ukrainian].

2. Lori, M., Symnaczik, S., Mäder, P., De Deyn, G., & Gattinger, A. (2017). Organic farming enhances soil microbial abundance and activity —

- A meta-analysis and meta-regression. *PLOS One*, 12(7), e0180442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180442>
3. Sadowsky, M. J., & Graham, P. H. (1998). *Soil Biology of the Rhizobiaceae*. In: Spaink H. P., Kondorosi A., Hooykaas, P. J. J. (Eds.) *The Rhizobiaceae*. Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-5060-6>
 4. Elias, N. V., & Herridge, D. F. (2014). Naturalised populations of mesorhizobia in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cropping soils: effects on nodule occupancy and productivity of commercial chickpea. *Plant and Soil*, 387(1–2), 233–249. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2298-z>
 5. Santos, M. S., Nogueira, M. A., & Hungria, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express*. 2019. Vol. 9. № 205.
 6. Andrews, M., & Andrews, M. E. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. (2017). *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 705. <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>
 7. Sichkar, V. I., Huhlaje, I. I., Bushuljan, O. V. Didovich, S. V., Kobljaj, S. V., Lavrova, G. D., & Ganzhelo, O. I. (2014). Intensifikacija azotfiksuval'nogo potencialu zernobobovih kul'tur shljahom komplementarnogo doboru makro- i mikrosimbiontiv [Intensification of nitrogen-fixing potential of legumes by complementary selection of macro- and microsymbionts]. *Naukovi zapiski Ternopil's'kogo nacional'nogo pedagogichnogo universitetu. Serija: Biologija — Scientific Notes of Ternopil National Pedagogical University. Series: Biology*, 3(60), 165–169 [in Ukrainian].
 8. Duchene, O., Vian, J.-F., & Celette, F. (2017). Intercropping with legume for agroecological cropping systems: Complementarity and facilitation processes and the importance of soil microorganisms. A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 240, 148–161. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.02.019>
 9. Provorov, I. A. (1992). Vzaimosvyaz' mezhdu taksonomiej bobovykh ispetsifichnost'yu ikh vzaimodeystviya s kluben'kovymi bakteriyami. [The relationship between the taxonomy of legumes and the specificity of their interaction with nodule bacteria]. *Botanicheskij zhurnal — Botanical journal*, 77(8), 21–32 [in Russian].
 10. Suneja, P., Dudeja, S. S., & Dahiya, P. (2016). Deciphering the phylogenetic relationships among rhizobia nodulating chickpea: A Review. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 4(03), 61–70. <https://doi.org/10.7324/JABB.2016.40310>
 11. Pandey, R. P., Srivastava, A. K., Gupta, V. K., O'Donovan, A., & Ramteke, P. W. (2018). Enhanced yield of diverse varieties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by different isolates of *Mesorhizobium ciceri*. *Environmental Sustainability*, 1(4), 425–435. <https://doi.org/10.1007/s42398-018-00039-9>
 12. Bushuljan, O. V., Sichkar, V. I., Bushuljan, M. A., & Pasichnik, S. M. (2015). Rezul'taty perspektivy selekcii nuta v Ukraine [Results of the perspective of chickpea breeding in Ukraine]. *Zernobobovye i krupjanye kul'tury — Legumes and Cereals*, 4(16), 49–54 [in Ukrainian].
 13. Gangola, M., Khedikar, Y., Gaur, P., Båga, M., Varshney, R., & Chibbar, R. (2012). Variation in important seed constituents among various chickpea genotypes. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 4(3), 139–139. <https://doi.org/10.1111/j.1757-837x.2012.00143.x>
 14. Didovych, S. V. (2007). Formation and functioning of symbiosis of *Mesorhizobium ciceri* — *Cicer arietinum* in agrocenoses of the southern steppe of Ukraine (Unpublished candidate thesis). Institute of Agricultural Microbiology and Agro-industrial Manufacture, NAAS, Chernihiv [in Ukrainian].
 15. *Derzhavnij reiestr sortiv roslin, pridatnih dlja poshirennja v Ukrainy na 2018 r.* [State register of plant varieties suitable for dissemination in Ukraine in 2018].
 16. Gaur, Y. D., Sen, A. N. (1979). Cross inoculation group specificity in *Cicer-Rhizobium* symbiosis. *New Phytologist*, 83(3), 745–754. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1979.tb02305.x>
 17. Bushuljan, O. V. (2012). Selekcija nutu — istorija ta perspektyvy [Chickpea breeding — history and prospects]. *Zbirnyk naukovykh prac' SGINCNS — Collection of scientific works of PBGINCNS*, 20(60), 126–131 [in Ukrainian].
 18. Berestetskiy O. A. (1979). *Metodicheskie rekomendatsii po polucheniyu novykh shtammov kluben'kovykh bakteriy i otsenke ikh effektivnosti* [Methodological recommendations for obtaining new strains of nodule bacteria and assessing their effectiveness]. Leningrad [in Russian].
 19. Dosphehov, B. A. (1985). *Metodika polevogo opyta s osnovami statisticheskoy obrabotki rezul'tatov issledovanij* [Methods of field experience with the basics of statistical processing of research results]. Moskva: Agropromizdat [in Russian].
 20. 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 Physiology*, 43(8), 1185–1207. <https://doi.org/10.1104/pp.43.8.1185>
 21. Gricayenko, Z. M., Gricayenko, A. O., & Karpenko, V. P. (2003). *Metodi biologichnih ta agrohimiichnih doslidzen' roslin i gruntiv* [Methods of biological and agrochemical studies of plants and soils]. Kiyv: NICH LAVA [in Ukrainian].
 22. *Metodi kul'tivuvannja ta trivalogo zberigannja bul'bochkovykh bakterij u kolekcijah: metodichni rekomendaciyi* [Methods of cultivation and

long-term storage of nodule bacteria in collections: guidelines]. Chernigiv: IAMAM NAAS, 2015.

23. *Metody issledovaniy kluben'kovykh bakterij. Metodicheskie rekomendacii dlja kursov povyshnija kvalifikacii nauchnyh sotrudnikov po sel's'kohozjajstvennoj mikrobiologii* [Methods of research of nodule bacteria. Methodical recommendations for advanced training courses for researchers in agricultural microbiology]. Leningrad, 1981. 48 p. [in Russian].

24. Kebot, E., Meyer, B. (1968). *Jeksperimental'naya immunologiya* [Experimental immunology]. Moskva: Medicina [in Russian].

25. DSTU 7169:2010. (2010). *Kormi, kombikormi, kombikormova sirovina. Metodi viznachennja vmistu azotu i sirogo proteinu* [Feeds, compound feeds, compound feed raw materials. Methods for determining the content of nitrogen and crude protein] Kyiv: Derzhspozhivstandart Ukraini [in Ukrainian].

26. Logosha, O. V., Vorobej, Ju. O., Usmanova, T. O., & Strekalov V. M. (2019). Harakteristika vlastivostej bul'bochkovykh bakterij nutu, poshirenih v agrocenozah Lisostepovoi ta Stepovoi zon Ukraini [Characteristics of properties of chickpea nodule bacteria common in agrocenoses of the Forest-Steppe and Steppe zones of Ukraine]. *Sil's'kogospodars'ka mikrobiologija — Agricultural Microbiology*, 29, 21–28. <https://doi.org/10.35868/1997-3004.29.21-28> [in Ukrainian].

27. Zaman, S., Mazid, M. A., & Kabir, G. (1970). Effect of rhizobium inoculant on nodulation, yield and yield traits of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in four different soils of greater rajshahi. *Journal of Life and Earth Science*, 6, 45–50. <https://doi.org/10.3329/jles.v6i0.9720>

28. Imran, A., Mirza, M. S., Shah, T. M., Malik, K. A., & Hafeez, F. Y. (2015). Differential re-

sponse of kabuli and desi chickpea genotypes toward inoculation with PGPR in different soils. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00859>

29. Khaitov, B., Kurbonov, A., Abdiev, A., & Adilov, M. (2016). Effect of chickpea in association with Rhizobium to crop productivity and soil fertility. *Eurasian Journal of Soil Science (EJSS)*, 5(2), 105. <https://doi.org/10.18393/ejss.2016.2.105-112>

30. Rupela, O. P. (1990). A visual rating system for nodulation of chickpea. *International Chickpea Newsletter*, 22, 22–25.

31. Gul, R., Khan, H., Khan, N., & Khan, F. U. (2014). Characterization of chickpea germplasm for nodulation and effect of rhizobium inoculation on nodules number and seed yield. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 24(5), 1421–1429.

32. Bidyarani, N., Prasanna, R., Babu, S., Hossain, F., & Saxena, A. K. (2016). Enhancement of plant growth and yields in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) through novel cyanobacterial and bio-filmed inoculants. *Microbiological Research*, 188–189, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.005>

33. Krutilo, D. V., Volkova, I. V. (2012). Serologichne riznomanittja bul'bochkovykh bakterij soi u gruntah Ukraini [Serological diversity of soybean nodule bacteria in the soil of Ukraine]. *Agroekologichnij zhurnal — Agroecological journal*, 4, 66–71 [in Ukrainian].

34. Krutilo, D. V. (2011). Konkurentospromozhnist' shtamiv bul'bochkovykh bakterij soi z povil'nim ta intensivnim rostom [Competitiveness of strains of soybean nodule bacteria with slow and intensive growth]. *Sil's'kogospodars'ka mikrobiologija — Agricultural Microbiology*, 14, 64–76 [in Ukrainian].

Received 02.09.2020