DOI: 10.22616/lluthesis/2020.006

Latvijas Lauksaimniecības universitāte

Lauksaimniecības fakultāte

Augsnes un augu zinātņu institūts

Mg. agr., Mg. biol. Laila Dubova

promocijas darbs

SIMBIOTISKO ASOCIĀCIJU IETEKME UZ PUPU (*VICIA FABA* L.) PRODUKTIVITĀTI

INFLUENCE OF SYMBIOTIC ASSOCIATIONS ON YIELD FORMATION OF BEANS (*VICIA FABA* L.)

zinātņu doktora grāda (*Ph.D.)* iegūšanai
lauksaimniecības un zivsaimniecības zinātnes, mežzinātnes nozarē

Promocijas darba vadītāja *Dr. biol.* Ina Alsiņa

Promocijas darba autore ‘ *Mg. agr., Mg. biol.*. Laila Dubova

Jelgava
2020

Anotācija

Dubova L., 2020. *Simbiotisko asociāciju ietekme uz pupu (Vicia faba L.) produktivitāti.* Promocijas darbs. Latvijas Lauksaimniecības universitāte: Jelgava.

Tauriņzieži ir pasaulē plaši audzēti kultūraugi, kuri simbiozē ar mikroorganismiem saista atmosfēras slāpekli. Latvijā pēc pākšaugu audzēšanas apjomu samazināšanās gadsimtu mijā, pēdējos gados sējplatības strauji paplašinās. Kā būtisks veicinošais faktors pākšaugu popularitātes pieaugumam ir ES direktīvas, kas izvirza prasības laukaugu sējplatību dažādošanai. Pākšaugu audzēšanas intensificēšanās saistīta ar audzēšanas tehnoloģiju izmaiņām, gan audzētājiem pieejamo šķirņu klāstu. Pākšaugu labvēlīgā ietekme uz dažādiem vides procesiem nebūtu iespējama bez simbiotisko mikroorganismu starpniecības. Līdz ar pupu audzēšanas platību palielināšanos pildot Eiropas direktīvu prasības, kā arī mainoties audzēšanas tehnoloģijām un agroklimatiskajiem apstākļiem, aktualizējas nepieciešamība intensīvāk veikt pētījumus arī par pupu un mikroorganismu mijiedarbību. Aizvien aktualizējas nepieciešamība pilnveidot audzēšanas tehnoloģijas, iekļaujot bioloģiskos komponentus. Latvijā gumiņbaktērijas pētītas ilgstošā laika periodā, tomēr pētījumi norit ar svārstīgu intensitāti. Savukārt pētījumu par mikorizas sēņu nozīmi agroekosistēmās ir maz, bet gumiņbaktēriju un mikorizas sēņu mijiedarbība praktiski nav pētīta. Tāpēc intensificējot pākšaugu, tai skaitā pupu, audzēšanu, jānovērtē iespējas paaugstināt to produktivitāti ar videi draudzīgiem paņēmieniem – mikroorganismu asociācijām.

Darba mērķis ir izvērtēt simbiotisko asociāciju ietekmi uz pupu (*Vicia faba* L). ražu un tās kvalitāti.Mērka realizācijasi izvirzīti šādi uzdevumi:i zvērtēt LLU Augsnes un augu zinātņu institūta gumiņbaktēriju kolekcijā esošo *Rhizobium leguminosarum* celmu piemērotību efektīvas simbiozes nodrošināšanai pupām *Vicia faba* L.**,** novērtēt pupu *V. faba* L. mikorizācijas pakāpi inokulētos un neinokulētos sējumos,skaidrot vides faktoru ietekmi uz simbiotisko asociāciju veidošanos un efektivitāti, novērtēt, vai pupu ražas kvalitātes paaugstināšanai ir lietderīgi veikt sēklu dubultinokulāciju ar simbiotiskajiem mikroorganismiem.

Pētījumi veikti laika posmā no 2014. līdz 2019. gadam. Izmēģinājumi iekārtoti veģetācijas traukos kontrolētos apstākļos un lauka apstākļos. Izmantotas gumiņbaktērijas no LLU Augsnes un augu zinātņu institūtā esošās kolekcijas, mikorizas sēņu preparāts saņemts no Čehijas firmas Symbiom® un satur trīs mikorizas sēņu sugas – *Glomus intraradices, G.claroideum* un *G. mosseae.* Pētījums izstrādāts Eiropas Savienības 7. Ietvara programmas projekta EUROLEGUME (Enhancing of legumes growing in Europe through sustainable cropping for protein supply for food and feed) ietvaros.

Secināts, ka LLU Gumiņbaktēriju kolekcijas baktēriju celmi, vērtējot dehidrogenāžu aktivitāti un gumiņu veidošanos, uzrāda atšķirīgu aktivitāti un spēju veidot simbiozi ar pupām. Noskaidrots, ka vides faktoru inhibējošā efekta mazināšanai lietderīgi inokulācijai lietot gumiņbaktēriju asociācijas. Gumiņbaktēriju lietošana kopā ar mikorizas sēnēm stimulēja mikorizācijas intensitāti. Konstatēts, ka minerālā slāpekļa papildmēslojums neveicināja mikorizas sēņu iedzīvošanos pupu saknēs. Vidējā mikorizācijas pakāpe bija zemāka nekā ar dubultinokulāciju. Mikorizas sēņu klātbūtni varēja konstatēt visos analizētajos augšņu tipos. Atšķīrās mikorizācijas pakāpe (F %) un arbuskulu sastopamība (A %) sīksēklu un rupjsēklu pupā. Dubultinokulācijas variantos var konstatēt pozitīvu ietekmi uz augu ražu un tās kvalitāti, tomēr pozitīvā ietekme pa gadiem mainījās. Vairumā gadījumu izpaudās tikai pozitīva tendence.

Promocijas darba apjoms 105 lappuses (neskaitot izmantotās literatūras sarakstu). Darbā ir 8 tabulas un 54 attēli.

ANNOTATION

Dubova L., 2020. Influence of symbiotic associations on yield formation of beans (*Vicia faba* L.) Latvia University of Life Scienes and Technologies: Jelgava.

Legumes are widely grown crops, which simbiotically fix nitrogen from the atmosphere. Following the decline in legume production at the turn of the century, sown areas in Latvia have expanded rapidly in recent years. EU directives, which set requirements for the diversification of arable crops, are an important contributor to the growing popularity of legumes. The intensification of legume cultivation is linked to changes in cultivation technologies and to the amount of varieties available to growers. The beneficial effects of legumes on various environmental processes are possible with the interaction with symbiotic microorganisms. With the growth of bean-cultivation areas in compliance with the requirements of European directives, as well as with the changing cultivation technologies and agro-climatic conditions, the need to intensify research on the interaction of beans and microorganisms is becoming more and more important. In Latvia, rhizobia have been studied for a long period of time. However, the research has been carried out with varying intensity. There is little research done on the role of mycorrhizal fungi in agroecosystems, but the interaction between rhizobia and mycorrhizal fungi has not been studied at all in Latvia yet.

The aim of this study is to evaluate the effect of symbiotic associations on the bean (*Vicia faba* L). The following tasks have been set: to evaluate the suitability of *Rhizobium leguminosarum* strains of the Rhizobia collection of the LLU Institute of Soil and Plant Science for efficient symbiosis of faba beans; to clarify the influence of environmental factors on the formation and efficiency of symbiotic associations, to assess whether it is appropriate to double seed inoculation with symbiotic microorganisms in order to increase the quality of a bean crop.

The research has been carried out between 2014 – 2019. The trials were set up under controlled conditions in the vegetation pots and in field conditions. Rhizobia from the LLU Institute of Soil and Plant Science collection were used, mycorrhizal fungi preparation was obtained from the Czech company Symbiom® and contains three mycorrhizal fungal species - *Glomus claroideum*, *G. intraradices* and *G. mosseae*. The research was done within the framework of the European Union 7th Framework Program project EUROLEGUME (Enhancing legumes growing in Europe through sustainable cropping for protein supply for food and feed).

It was concluded that bacterial strains of the LLU Rhizobia Collection has different activity and ability to form symbiosis with beans. Evaluating dehydrogenase activity and nodule formation it has been found that to reduce the inhibitory effect of environmental factors, it is useful to use rhizobia associations for inoculation. The use of rhizobia together with mycorrhizal fungi stimulated mycorrhizal intensity. It was found that supplemental mineral nitrogen fertilizers did not promote colonisation of mycorrhizal fungi in bean roots, the mean mycorrhization rate was lower than with double inoculation. Mycorrhizal fungi were presented in all soil types analyzed. There was a difference in mycorrhizal rate (F %) and arbuscular incidence (A %) in small seed and coarse seed bean. Positive effects on crop yield and quality can be observed in the double-inoculation variants. However, the positive effect varied from year to year. In most cases, only a positive trend occurred.

The Ph.D. Thesis consists of 105 pages (apart from references). Thesis contains 8 tables and 54 figures.

SATURS

Darbā ievietoto tabulu un attēlu saraksts 5
Promocijas darbā lietoto saīsinājumu un apzīmējumu skaidrojums 8
IEVADS 9
1. LITERATŪRAS APSKATS 13
1.1 Pupas (*Vicia faba* L.) to vieta agroekosistēmā 13
1.1.1. Pupu (*Vicia faba* L.) morfoloģiskais un bioķīmiskais raksturojums 13
1.1.2. Pupu (*Vicia faba* L.) nozīme ilgtspējīgas agroekosistēmas funkcionēšanā 15
1.2. Simbiotiskās asociācijas 17
1.2.1. Bioķīmiskie signāli simbiotisko asociāciju veidošanās procesā 18
1.2.2. Gumiņbaktēriju un pākšaugu simbioze 20
1.2.2.1.Gumiņbaktērijas, to dzīves cikla raksturojums 21
1.2.2.2. Gumiņbaktēriju un pākšaugu simbiozes veidošanās 22
1.2.2.3. Abiotisko vides faktoru ietekme uz gumiņbaktēriju funkcionēšanu 27
1.2.3. Mikorizas sēņu un augu simbioze 31
1.2.3.1. Mikorizas veidi un izplatība 32
1.2.3.2.Arbuskulārā mikoriza (AM) 33
1.2.3.3. Mikorizas sēņu dzīves cikls 34
1.2.3.4. Barības vielu uzņemšana mikorizas sēnēs 36
1.2.4. Vielu apmaiņa starp simbiontiem 38
1.2.5. Simbiozi veidojošo mikroorganismu mijiedarbība ar augsnes mikroorganismiem 39
1.3.Trīspusējās simbiozes veidošanās un funkcionēšanas nosacījumi. 41
Kopsavilkums 45
2. MATERIĀLI UN METODES 47
2.1. Izmēģinājumos lietoto pupu (*Vicia faba* L.) šķirnes iun mikroorganismi 47
2.2. Veģetācijas trauku un laka izmēģinājumu raksturojums 48
2.3. Meteoroloģiskie apstākļi pupu veģetācijas laikā 51
2.4. Augu veģetatīvo, bioķīmisko un ražu veidojošo parametru noteikšana 53
2.5. Modeļeksperimenti simbiotiskās sitēmas efektivitātes novērtēšanai 54
2.6. Simbiotiskās sistēmas komponentu raksturojums 55
2.6.1.Gumiņbaktēriju aktivitātes raksturošana 55
2.6.2. Sakņu mikorizācijas pakāpes novērtēšana 56
2.7. Augsnes mikroorganismu skaita un aktivitātes novērtēšana pupu sakņu zonā 57
2.8. Datu statistiskā analīze 58
3. REZULTĀTI 59
3.1. Inokuluma varianta ietekme uz gumiņu veidošanos un aktivitāti 59
3.1.1. Gumiņbaktēriju tīrkultūru simbiotiskās aktivitātes salīdzinājums 59
3.1.2. Inokulācijas ietekme uz gumiņu veidošanos un aktivitāti 70
3.2. Mikorizas sēņu sastopamība pupu sakņu sistēmā 70
3.2.1. Inokulācijas ietekme uz mikorizas sēņu sastopamību pupu saknēs 69
3.2.2. Augsnes mikrobiotas un inokulātu mijiedarbība . 79
3.3. Simbiotisko asociāciju izveidošanās ietekme uz pupu (*Vicia faba* L.) augšanu un ražu... . 83
3.3.1. Simbiotisko asociāciju ietekme uz pupu veģetatīvajiem parametriem ziedēšanas fāzē 83
3.3.2. Simbiotisko asociāciju uietekmes novērtējums uz pupu ražu un tās kvalitāti 92
3.3.3. Inokulācijas efekta novērtējuma kopsavilkums 100
Secinājumi 103
Izmantotās literatūras saraksts 105
Pielikumi 121

Darbā ievietoto tabulu saraksts

Nr.	Nosaukums	Lpp.
1.1	Gumiņbaktēriju un mikorizas sēņu dzīves ciklu salīdzinājums (pēc Denison, Kiers, 2011)	42
2.1.	Gumiņbaktēriju efektivitātes izmēģinājumos iekļautie baktēriju celmi un izmēģinājuma vietas dažādos gados	47
2.2.	Veģetācijas trauku izmēģinājumos lietotā substrāta agroķīmiskais raksturojums	49
2.3.	Augsnes agroķīmiskais raksturojums lauka izmēģinājumos	40
2.4.	Modeļeksperimentu saraksts un pieņemtā numerācija	54
3.1.	Vidējais flavonoīdu daudzums (mg CE mL^{-1}) dīgstošo sēklu eksudātā	65
3.2.	Augu parametri šķirnei ‘Bartek’ izmēģinājumā VT2017 ar inokulātu variantiem	92
3.3.	Vidējais proteīna daudzums lakstos un sēklās veģetācijas trauku izmēģinājumos šķirnei ‘Bartek’	94

Darbā ievietoto attēlu saraksts

Nr.	Nosaukums	Lpp.
1.1.	Ražas kvalitāti un kvantitāti ietekmējošo pamatfaktoru mijiedarbība	17
1.2	Simbiontu mijiedarbībai nozīmīgie flavonoīdi (Hassan, Mathesius, 2012).	19
1.3.	Indeterminato (A) un determinanto (B) gumiņu pamatuzbūve (Hirsch, 1992)	24
1.4.	Mikorizas sēņu pamatstruktūras (pārveidots no Moore, Robson, Trinci, 2011)	35
2.1.	Mēneša nokrišņu summa veģetācijas perioda laikā	52
2.2.	Mēneša vidējā gaisa temperatūra veģetācijas perioda laikā	52
2.3.	Mikorizu kolonizācijas klases un arbuskulu daudzums (attēls no Mycorrhiza manual, 2001)	56
2.4.	Krāsu kartes skala	58
3.1.	Dehidrogenāžu aktivitāte baktēriju tīrkultūru suspensijā	60
3.2.	100 gumiņu masa šķirnei ‘Bartek’ ar dažādiem gumiņbaktēriju celmiem	60
3.3.	Gumiņbaktēriju (RP023, RP301, RV407 un RP501) uz pupu ‘Bartek’saknēm izveidoto gumiņu parametri	60
3.4.	Dehidrogenāžu aktivitāte (DHA) gumiņos un 100 gumiņu masa inokulētiem (RV407) un neinokulētiem augiem	61

3.5.	100 gumiņu masa izteikta % pret kontroles varianta gumiņu masu izmēģinājumos LI2014_A un LI2014_B	63
3.6.	Dīgstošas lauka pupas +4 (a) un +20 °C (b) temperatūrā	63
3.7.	Pupu dīgļsaknes augšana dažādu mikrosimbiontu kombinācijas klātbūtnē	64
3.8.	Inokulāta varianta ietekme uz 100 gumiņu masu dažādos temperatūras režīmos diedzētām pupām	66
3.9.	100 gumiņu masa izteikta % pret kontroles varianta gumiņu masu 2014., 2015. un 2016. gada veģetācijas trauku un 2014., 2015. g. lauka izmēģinājumos šķirnei 'Bartek'	67
3.10.	Gumiņu masa un sausna šķirnei 'Bartek' atšķirīga granulometriskā sastāva substrātā	68
3.11.	100 gumiņu masa izteikta % pret kontroles varianta gumiņu masu izmēģinājumā LI2016_A	69
3.12.	100 gumiņu masa izteikta % pret kontroles varianta gumiņu masu izmēģinājumā LI2017	70
3.13.	Pupu sakņu fragments bez mikorizas sēņu struktūrām (a), fragmenti, kuros dominē hifas (b), vezikulas (c) un arbuskuli (d)	71
3.14.	Mikorizas sēņu kolonizācijas intensitātes sakņu sistēmā (M%) un arbuskulu daudzuma sakņu sistēmā (A%) attiecība pupu saknēs inokulētiem (gumiņbaktērijas, mikoriza) un neinokulētiem augiem veģetācijas trauku izmēģinājumos	72
3.15.	Mikorizas sēņu kolonizācijas intensitāte sakņu sistēmā (M%) un arbuskulu daudzums pupu sakņu sistēmā (A%) attiecībā pret mikorizu sastopamību sakņu sistēmā (F%) šķirnēm Lielplatone, Fuego un Bartek lauku izmēģinājumos 2015. gadā	73
3.16.	Mikorizas sēņu struktūru sastopamība un arbuskulu biežums pupu sakņu sistēmā variantos ar dažādiem inokuluma variantiem lauku izmēģinājumos 2015. gadā	74
3.17.	Mikorizas struktūru sastopamība sakņu sistēmā (F%), sakņu kolonizācijas intensitāte (M%) un arbuskulu sastopamība (A%) ar dažādiem gumiņbaktēriju celmiem inokulētām pupām 'Karmazyn'un 'bartek'izmēģinājumos LI2014_A un LI2014_B	75
3.18.	Mikorizas sēņu iedzīvošanās un sēņu struktūrelementu sastopamības korelācija pupu saknēs dažādās audzēšanas vietās 2015. gadā	76
3.19.	Mikorizas sēņu struktūru sastopamība pupām 'Fuego' un 'Lielplatone' izmēģinājumā LI2017	77
3.20.	Mikorizas sēņu struktūru sastopamība dažādu šķirņu pupu saknēs inokulētiem un neinokulētiem augiem atkarībā no šķirnes (A kolonna) un inokulācijas (B kolonna)	78
3.21.	Arbuskulu veidošanās intensitātes korelācija ar proteīna saturu pupu sēklās un 100 sēklu masu	79
3.22.	Mikroorganismu biomasa un augsnes elpošanas intensitāte i LI2016_A zmēģinājumā pirms ražas novākšanas.	81
3.23.	Mikroorganismu biomasa un augsnes elpošanas intensitāte LI2017 izmēģinājumā pirms ražas novākšanas	82
3.24.	Gumiņbaktēriju skaita izmaiņas izmēģinājuma LI2017 augsnē	83
3.25.	Veģetatīvo parametru vidējā attiecība inokulētajos variantos pret kontroles variantu izmēģinājumos LI2014_A un LI2014_B šķirnei 'Bartek'	85

3.26.	Veģetatīvo parametru attiecība inokulētajos variantos pret kontroles variantu izmēģinājumos LI2014_A un LI2014_B šķirnei ‘Karmazyn’	85
3.27.	Sausnes un proteīna saturs lakstos pupām ‘Bartek’ ziedēšanas laikā LI2014 izmēģinājumā	86
3.28.	Pupu lakstu masa un sausne dažādi inokulētos variantos šķirnēm ‘Lielplatone’ un ‘Fuego’ izmēģinājumā LI2015_A	87
3.29.	Pupu lakstu masa un sausna dažādi inokulētos variantos šķirnēm ‘Bartek’ un ‘Karmazyn’ izmēģinājumā LI2015_A	87
3.30.	Vidējā lakstu masa, garums un sausna dažādi inokulētos variantos šķirnēm ‘Boxer’ un ‘Fuego’ izmēģinājumā LI2015_B.	88
3.31.	Veģetatīvie parametri šķirnēm ‘Lielplatone’ un ‘Fuego’ izmēģinājumā LI2016_A.	89
3.32.	Veģetatīvie parametri šķirnēm ‘Lielplatone’ un ‘Fuego’ LI2017 izmēģinājumā	90
3.33.	Veģetatīvo parametru novērtējums ballēs pret kontroli izmēģinājumā LI2017	90
3.34.	Raža un proteīna saturs lakstos pupām 'Bartek'ziedēšanas laikā LI2015 izmēģinājumā	95
3.35.	Pupu sēklu raža un proteīna saturs šķirnēm ‘Lielplatone’ un ‘Fuego’ izmēģinājumā LI2015_A	95
3.36.	Pupu sēklu raža un proteīna saturs šķirnēm ‘Bartek’ un ‘Karmazyn’ izmēģinājumā LI2015_A	96
3.37.	Proteīna saturs lakstos veģetācijas periodā un sēklās dažādi inokulētos variantos šķirnēm ‘Boxer’ un ‘Fuego’ izmēģinājumā LI2015_B	97
3.38.	Proteīna saturs pupu lakstos un sēklās šķirnēm ‘Fuego’ un ‘Lielplatone’ izmēģinājumā LI2016_A	97
3.39.	Pupu sēklu raža un proteīna saturs sēklās šķirnēm ‘Lielplatone’ un ‘Fuego’ LI2016_A izmēģinājumā	98
3.40.	Raža un proteīna saturs sēklās LI2016_B izmēģinājumā	99
3.41.	Raža un proteīna saturs sēklās šķirnēm ‘Lielplatone’ un ‘Fuego’ LI2017 izmēģinājumā	99
3.42.	Proteīna saturs (%) pupu sēklās ar dažādiem inokulātu variantiem	100
3.43.	Krāsu karte lauka izmēģinājumu rezultātiem šķirnei ‘Lielplatone’	101
3.44.	Krāsu karte lauka izmēģinājumu rezultātiem šķirnei ‘Fuego’	102
3.45.	Krāsu karte lauka izmēģinājumu rezultātiem šķirnēm ‘Bartek’ un ‘Karmazyn’ 2015. gadā	102

Promocijas darbā lietoto saīsinājumu un apzīmējumu skaidrojums

Saīsinājums	Skaidrojums
FAO	Apvienoto Nāciju Organizācijas Pārtikas un lauksaimniecības organizācija (*Food and Agriculture Organisation of the United Nations*).
AM	Arbuskulārā mikoriza
VAM	Vezikulāri arbuskulārās mikoriza
EKM	Ektomikoriza
R	Inokulācijas varianti ar gumiņbaktērijām
M	Inokulācijas varianti ar mikorizas sēnēm
RM	Dubultinokulācijas varianti
kvv	Koloniju veidojošās vienības
VT	Veģetācijas trauku izmēģinājums
LI	Lauka izmēģinājums
PI	Augu vitalitātes indekss
F_V/ F_M	Maksimālais kvantu iznākums II fotosistēmā.
F_V/ F_0	II fotosistēmas efektivitāte
QE	Kvercetīna ekvivalents
CE	Katehīna ekvivalents

IEVADS

Tauriņzieži ir pasaulē plaši audzēti kultūraugi, kuri simbiozē ar mikroorganismiem saista atmosfēras slāpekli. Tos plaši izmanto gan pārtikai, gan lopbarībai. Pēc FAO[1](2017) datiem Pasaulē pupu sēklu raža bija 4.1 miljons tonnu, kas apmēram par pustonnu pārsniedza 1994. gada ražu. Dažādos pasaules reģionos atšķirīgā apjomā audzē pākšaugus, tomēr Latvijā pēc pākšaugu audzēšanas apjomu samazināšanās gadsimtu mijā, laika periodā no 2014. līdz 2017. gadam sējplatības strauji paplašinājās, kam sekoja sējplatību samazināšanās. Kā būtisks veicinošais faktors pākšaugu popularitātes pieaugumam ir ES direktīvas, kas izvirza prasības laukaugu sējplatību dažādošanai. Laikā no 2007. līdz 2014. gadam lauka pupu sējplatības palielinājušas 20 reižu (Balodis, Gaile, Kreita u.c., 2016). Tomēr strauja pākšaugu audzēšanas intensificēšanās saistīta arī ar dažādiem izaicinājumiem. Kā norāda Zute un Treikale (Zute, Treikale, 2015), vairāku gadu desmitu laikā mainījušās gan audzēšanas tehnoloģijas, gan audzētājiem pieejamo šķirņu klāsts. Nepietiekošā pieredze atbilstoši pašreizējai situācijai apgrūtina augstu un kvalitatīvu ražu iegūšanu.

Aktualizējas arī nepieciešamība dažādot pākšaugu pielietojuma jomas. Vēsturiski pupas pārsvarā audzēja kā proteīna avotu lopbarībā un tikai nelielos apjomos dārza pupas – cilvēku uzturam. Pašlaik pākšaugu pielietojums paplašinās un attīstās arī to pārstrādes jomas, lai uzlabotu iespējas pākšaugu produkciju vairāk iekļaut cilvēka uzturā. Tauriņzieži tai skaitā arī pupas aizvien vairāk tiek novērtētas arī no vides kvalitātes skatupunkta, jo to iekļaušana augu maiņā, ne tikai samazina nepieciešamo minerālā slāpekļa patēriņu, bet samazina N_2O emisiju no augsnes, ko izraisa mikrobioloģiskie procesi, kā arī uzlabo augsnes struktūru, ir labas priekšaugs citiem kultūraugiem (Köpke, Nemecek, 2010).

Pākšaugu labvēlīgā ietekme uz dažādiem vides procesiem nebūtu iespējama bez simbiotisko mikroorganismu starpniecības. Kopš gumiņbaktēriju atklāšanas 19.gs. beigās, 20 gadsimtā risinājās plašs pētniecības darbs, lai izzinātu šo mikroorganismu īpašības un pielietojuma aspektus. Pētījumi par gumiņbaktēriju izplatību un efektivitāti intensīvi notika arī Latvijā. Pārsvarā pētīja gumiņbaktēriju ietekmi uz āboliņu, lupīnu un lucernu – augiem, kurus plaši lietoja lopbarības ieguvei. Pupas un to simbiozes veidošanās pētīta mazāk intensīvi, un 21 gs. sākumā samazinoties to audzēšanas platībām, samazinājās arī gumiņbaktēriju pētījumu apjoms. Līdz ar pupu audzēšanas platību palielināšanos pildot Eiropas direktīvu prasības, kā arī mainoties audzēšanas tehnoloģijām un agroklimatiskajiem apstākļiem, aktualizējas nepieciešamība intensīvāk veikt pētījumus arī par pupu un mikroorganismu mijiedarbību. Lauksaimniecībā lieto aizvien modernākas un intensīvākas metodes, bet tajā pašā laikā lauksaimnieciskajai ražošanai jākļūst videi draudzīgākai, samazinot arī minerālmēslojuma lietošanu. Aizvien aktualizējas nepieciešamība pilnveidot audzēšanas tehnoloģijas, iekļaujot bioloģiskos komponentus. Jāņem vērā kompleksa vides un cilvēka saimnieciskās darbības ietekme, jo kultūraugu raža atkarīga ne tikai no ģenētiski noteiktajiem ierobežojumiem un iespējām vai atbilstošas agrotehnikas, bet arī virknes vides faktoru, kuri ietekmē agrocenozē esošo organismu mijiedarbību.

1 FAO; www.fao.org/faostat.org/statistics

Promocijas darba aktualitāte

Latvijā gumiņbaktērijas tiek pētītas ilgstošā laika periodā, tomēr pētījumi norit ar svārstīgu intensitāti. Savukārt pētījumu par mikorizas sēņu nozīmi agroekosistēmās ir maz, bet gumiņbaktēriju un mikorizas sēņu mijiedarbība praktiski nav pētīta. Tāpēc intensificējot pākšaugu, tai skaitā pupu, audzēšanu, jānovērtē iespējas paaugstināt to produktivitāti ar videi draudzīgiem paņēmieniem – mikroorganismu asociācijām.

Izzinot mijiedarbības mehānismus un ietekmējošos faktorus, iespējams, labāk nodrošināt nepieciešamos apstākļus kultūraugu augšanai agroekosistēmā, lai iegūtu ne tikai augstu, bet arī kvalitatīvu ražu, vienlaikus nenodarot kaitējumu videi.

Darba mērķis:

Izvērtēt simbiotisko asociāciju ietekmi uz pupu (*Vicia faba* L). ražu un tās kvalitāti.

Darba uzdevumi:

1. Izvērtēt LLU Augsnes un augu zinātņu institūta gumiņbaktēriju kolekcijā esošo *Rhizobium leguminosarum* celmu piemērotību efektīvas simbiozes nodrošināšanai pupām *Vicia faba* L.
2. Novērtēt pupu *V. faba* L. mikorizācijas pakāpi inokulētos un neinokulētos sējumos.
3. Skaidrot vides faktoru ietekmi uz simbiotisko asociāciju veidošanos un efektivitāti.
4. Novērtēt, vai pupu ražas kvalitātes paaugstināšanai ir lietderīgi veikt sēklu dubultinokulāciju ar simbiotiskajiem mikroorganismiem.

Promocijas darba hipotēze

Izveidojoties atbilstošai un efektīvai simbiotiskajai asociācijai starp pupām un mikrosimbiontiem, iespējams paaugstināt pupu ražu un tās kvalitāti.

Aizstāvāmās tēzes:

1. Gumiņbaktēriju celmu efektivitāte ir atšķirīga. Efektivitāti ietekmē ne tikai augsnes apstākļi, bet arī kultūraugs.
2. Augsnē mikorizas sēņu izplatība nav viendabīga. Mikorizācijas pakāpe atkarīga no audzētā kultūrauga un vides apstākļiem.
3. Vides apstākļi nosaka fizioloģisko procesu norisi augā, kā rezultātā mainās auga un rizosfēras mikroorganismu mijiedarbība. Auga, gumiņbaktēriju un mikorizas sēņu bioķīmiskā mijiedarbība nosaka simbiotiskās sistēmas veidošanās iespējamību un efektivitāti.
4. Efektīva simbiotiskā asociācija starp pupām un mikrosimbiontiem labvēlīgi ietekmē augu augšanu un rezultātā iespējams paaugstināt pupu ražu un tās kvalitāti.

Promocijas darba aprobācija

Zinātniskie raksti, kuri indeksēti Scopus un/ vai Web of Science datu bāzēs

1. Dubova L., Senberga A., Alsina I., Strauta L., Cinkmanis I. (2019). Development of symbiotic interactions in the faba bean (*Vicia faba* L.) roots. *Agronomy Research*, Vol. 17, No. 4, p. 1577–1590.
2. Dubova L., Alsiņa I., Ruža A., Šenberga A. (2018). Impact of faba bean (*Vicia faba* L.) cultivation on soil microbiological activity. *Agronomy Research*, Vol. 16. No.5, p. 2016–2025.
3. Senberga A., Dubova L., Alsina I. (2018). Germination and growth of primary roots of inoculated bean (*Vicia faba*) seeds under different temperatures. *Agronomy Research*, Vol. 16, No.1, p. 243–253.
4. Karkanis A., Ntatsi G., Lepse L., Fernández J.A., Vågen I.M., Rewald B., Alsiņa I., Kronberga A., Balliu A., Olle M., Bodner G., Dubova L., Rosa E., Savvas D. (2018). Faba bean cultivation – revealing novel managing practices for more sustainable and competitive European cropping systems. *Frontiers in Plant Science*, 9, art. No. 1115.
5. Dubova L., Šenberga A., Alsiņa I. (2017). Inoculated broad beans (*Vicia faba* L.) as a precrop for spring onions (*Allium cepa*). *Research for Rural Development*, Vol. 2, p. 33 – 39.
6. Dubova L., Ruža A., Alsiņa I. (2016). Soil microbiological activity depending on tillage system and crop rotation. *Agronomy Research*, Vol. 14, No. 4, p. 1274–1284.
7. Alsina I., Dubova L., Karlovska A., Steinberga V., Strauta L. (2016). Evaluation of effectiveness of *Rhizobium leguminosarum* strains on broad beans. *Acta Horticulturae*, No. 1142: Proceedings of the VI Balkan symposium on Vegetables and Potatoes, p. 417 – 422.
8. Dubova L., Šenberga A., Alsina I. (2015). The effect of double inoculation on the broad beans (*Vicia faba* L.) yield quality. *Research for Rural Development*, p. 34 – 39.

Publikācijas semināru rakstu krājumos

1. Šenberga A., Dubova L., Alsiņa I. (2018). Dīgstošu pupu sēklu simbiotiskā gatavība. *Ražas svētki "Vecauce – 2018": Latvijai – 100, Lauksaimniecības izglītībai – 155.* Zinātniskā seminars rakstu krājums. Jelgava, LLU, 65. – 68.lpp. ISBN 9789984483061.
2. Šenberga A., Dubova L., Alsiņa I., Strauta L. (2017). *Rhizobium* sp. – a Potential Tool for Improving Protein Content in Peas and Faba Beans. *Rural sustainability research*, Vol. 37, No. (332), DOI:10.1515/plua-2017-0001, ISSN – 2256-0939.
3. Dubova L., Šenberga A., Alsiņa I., Sergejeva D. (2016). Simbiotiskās sistēmas efektivitātes izvērtējums pupu (*Vicia faba* L.) sējumos. *Ražas svētki "Vecauce – 2016: Lauksaimniecības zinātne nozares attīstībai*, Jelgava, LLU, 20. – 23.lpp. ISBN 9789984482408.

Mutiskie referāti konferencēs

1. Dubova L., Ruža A., Alsiņa I. Augsnes mikrobioloģiskā aktivitāte dažādos augsnes apstrādes un augu maiņas variantos. *Līdzsvarota lauksaimniecība:zinātniski praktiskā konference*, Jelgava, Latvija, Latvijas Lauksaimniecības universitāte. Lauksaimniecības fakultāte. Latvijas Agronomu biedrība. Latvijas Lauksaimniecības un meža Zinātņu akadēmija. – Jelgava. 2018. gada 22. februāris. Ziņojums sekcijā.
2. Šenberga A., Dubova L., Alsiņa I. Gumiņbaktēriju celmu efektivitātes pētījumi. *LU 76. konference*.- 2018. gada 2. februāris. Ziņojums sekcijā.
3. Dubova L., Šenberga A., Alsiņa I. Inoculated broad beans (*Vicia faba*) as a precrop for spring onions (*Allium cepa*). *23th Annual International Scientific Conference "Research for Rural Development 2017"*, Jelgava, 2017. gada maijā. Ziņojums sekcijā.

4. Dubova L., Alsiņa I., Ruža A., Šenberga A. Impact of faba bean (*Vicia faba* L.) cultivation on soil microbiological activity. NJF konference "Legumes from field to fork", Tartu, Igaunijā no 28.11. līdz 30.11.2017. Ziņojums sekcijā.
5. Dubova L., Alsiņa I., Strauta, L., Karlovska, A., Šenberga A. The effect of symbiotic associations on the productivity of *Vicia faba* L. and *Pisum sativum* L. *25th NJF Congress 'Nordic View to Sustainable Rural Development*. Rīga, Latvia, 16 – 18th of June, 2015. Ziņojums sekcijā.
6. Dubova L., Šenberga A., Alsina I. The effect of double inoculation on the broad beans (*Vicia faba* L.) yield quality. International Scientific Conference *Research for Rural Development*. Jelgava, *LLU*2015. 13.–15. maijs. Ziņojums sekcijā.

Stenda referāti konferencēs

1. Dubova L., Senberga A., Alsina I., Strauta L., Cinkmanis I. (2019). Development of symbiotic interactions in the faba bean (*Vicia faba* L.) roots. *10th International Conference on Biosystems Engineering 2019.* May 8–10, 2019. Tartu, Estonia.
2. Senberga A., Dubova L., Alsina I. Germination and growth of primary roots of inoculated bean (*Vicia faba*) seeds under different temperatures. *9th International conference "Biosystems Engineering 2018"*. May 9–11, 2018. Tartu, Estonia.
3. Dubova,L., Alsiņa,I., Ruža, A., Šenberga, A. (2018). Soil microbiological activity in differently cultivated bean (*Vicia faba* L.) fields. *Ecology of soil microorganisms 2018*. 17.–21. jūnijs. Helsinki, Somija,
4. Senberga A., Dubova L., Alsina I. Dīgstošu pupu sēklu simbiotiskā gatavība = The symbiotic readiness of germinating bean seeds. (2018). *Ražas svētki "Vecauce – 2018"*. Jelgava, Latvijas Lauksaimniecības universitāte, 2018.
5. Alsina I., Dubova L., Šenberga A. (2017). Is the inoculation of field beans in Latvian Agroclimatic conditions sufficiently effective? *NJF konferencē "Legumes from field to fork"*. Tartu, Igaunija.
6. Šenberga A., Dubova L., Alsiņa I. Germination and growth of primary roots of inoculated faba bean (*Vicia faba*) seeds under different temperatures. *NJF konferencē "Legumes from field to fork"*. Tartu, Igaunija.
7. Dubova L., Šenberga A., Alsiņa I., Liepiņa M., Strauta L. (2017). Interaction of rhizobia, arbuscular mycorrhizal fungi and beans (*Vicia faba* L.) in different soils of Latvia. *Scientific conference "Advances in grain legume breeding, cultivation and uses for a more competitive value-chain"*. 27. – 28. septembris. 2017. Novi Sad, Serbia.
8. Šenberga A., Dubova L., Alsiņa I., Elferts, D. (2017). Rhizobia and mycorrhiza fungi inoculum evaluation for the pea and bean growth promotion. Interaction of rhizobia, arbuscular mycorrhizal fungi and beans (*Vicia faba* L.) in different soils of Latvia. *Scientific conference "Advances in grain legume breeding, cultivation and uses for a more competitive value-chain"*. 27. – 28. septembris. 2017. Novi Sad, Serbia.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Pupas (*Vicia faba* L.), to vieta agroekosistēmā

1.1.1. Pupu (*Vicia faba* L.) morfoloģiskais un bioķīmiskais raksturojums

Pākšaugi ir daudzveidīga un nozīmīga segsēkļu dzimta, kas iekļauj vairāk, kā 650 ģintis un 18000 sugas. Pākšaugus (*Fabaceae*) iedala trīs apakšdzimtās: *Mimosoideae, Caesalpinoideae* un *Papilionoideae*. Vairums kultivēto pākšaugu ir no *Papilionoideae*. Pasaulē audzē apmēram 250 Mha pākšaugu, kuri fiksē apmēram 90 Tg N_2 gada laikā, un to produktivitāte, teorētiski, ir neatkarīga no slāpekļa daudzuma augsnē. (Cleveland, Townsend, Schimel et al., 1999). Pākšaugi ir nozīmīgi pārtikas un lopbarības augi kā mērenajā, tā arī tropiskajā zonā. Atkarībā no pākšaugu galvenā izmantošanas veida tos iedala pārtikas (sēklas) un lopbarības (sēklas vai biomasa) pākšaugos (Cooper, 2007).

Pupas (*Faba bona* Medik., sin. *F.vulgaris* Moench, *Vicia faba* L.) ir viengadīgs vasarāju tipa augs. Pupām ir labi izteikta mietsakne, stublājs atkarībā no šķirnes, līdz 200 cm garš, četršķautņains, noturīgs, var būt ar indeterminantu augšanu (Bond, Lawes, Hawtig et al., 1985). Lapas parasti pāra plūksnaini saliktas. Ziedi sakopoti ķekaros lapu žāklēs uz īsa kāta. Pārsvarā ziedi gaiši iesārti ar tumšiem plankumiem uz vainaglapām, bet sastopamas šķirnes ar baltiem ziediem. Vienam augam var būt 10 un vairāk ziedkopu, ziedu skaits ziedkopā 2 līdz 12. Ziedu un ziedkopu skaitu ietekmē audzēšanas apstākļi, daļēji arī šķirnes īpašības (Duc, Bo, Baum et al., 2010). Pupas ir pašapputes augs, bet novērojama arī svešappute. Pupu ziedus apmeklē kukaiņi, tai skaitā arī bites un kamenes (Bishop, Jones, Lukac et al., 2016). Pupu auglis ir liela līdz 20 cm gara, plata cilindriska pāksts, kurā nogatavojas 3 līdz 5 sēklas. Ziedēšanas un sēklu veidošanās laikā jutīgas pret nelabvēlīgiem vides apstākļiem. Tāpēc, atkarībā no apstākļiem ziedēšanas un apputeksnēšanās laikā, dažkārt pākstis veido tikai trešdaļa ziedu (Dantun, Grashoff, 1984; Duc, 1997).
Sēklām ir biezs apvalks, kurš bieži vien nosaka pupu izmantošanas veidu.

Pēc sēklu izmēra pupas iedala trīs pasugās:

1. sīksēklu pupas (*F. vulgaris* var. *minor* Beck.), kuras mēdz saukt par lopbarības vai lauka pupām. 1000 sēklu masa 200 līdz 600 g. Galvenokārt audzē kā laukaugu ar intensīvu apsaimniekošanu, jo ražu iespējams novākt mehanizēti;
2. pupas ar vidēji rupjām sēklām (*F. vulgaris* var. *equina* Pers.), kuras sauc arī par zirgu pupām. 1000 sēklu masa 600 – 800 g. Audzē mazākās platībās nekā pārējās pupas. Latvijā lielākās platībās neaudzē;
3. rupjsēklu pupas (*F. vulgaris* var. *major* Harz.), sauc arī par dārza vai cūku pupām. 1000 sēklu masa pārsniedz 800 g. Prasīgākas audzēšanas apstākļu ziņā, kā arī grūti novākt mehanizēti. Galvenokārt audzē, kā vērtīgu dārzeni cilvēku uzturam. (Jurševskis, Holms, Freimanis, 1988; Augkopība...., 2004).

Eiropas reģionā pupas pārtikā lieto mazāk nekā dienvidu reģionos - Āfrikā, daļā Āzijas, kā arī Latīņamerikā pupas ir lēts proteīna un enerģijas avots, kas aizstāj dzīvnieku izcelsmes produktus (Alghamdi, 2009).

Kā visi augi, kuri pieder *Fabaceae* dzimtai, pupas sēklās uzkrāj ievērojamu daudzumu proteīna. Pupu uzturvērtība, vēsturiski, tiek saistīta ar augsto proteīna saturu, kas atkarībā no genotipa, var sasniegt 25 līdz 35%. Lielākā proteīna daļa līdz 60 – 80% ir globulīni, albumīni (7 – 20%) un glutelīni (6 – 15%) (Duc, 1997; Larralde, Martinez, 1991; Hossain, Mortuza, 2006). Pupu sēklas ir bagātas ar nozīmīgām aminoskābēm - lizīnu, aspargīnu, leicīnu un arginīnu. Dažādiem pākšaugiem iespējamas variācijas aminoskābju daudzumā un pamatstruktūrā. Nozīmīgu rezerves olbaltumvielu daļu veido **globulīni**, kuri uzkrājas sēklai nobriestot, bet dīgšanas laikā apgādā jauno dīgstu ar amonija joniem un oglekļa savienojumu skeletu. Globulīni - nešķīst ūdenī, bet šķīst sāļu šķīdumos, disociējot subvienībās. Sastāv

galvenokārt no vicilīna un legumīna. Vicilīns, sēklai nogatavojoties, veidojas pirms legumīna un dominē gatavās sēklās. Pupu izmantošanas veidu nosaka arī citas proteīnu grupas. **Albumīni** – bioloģiski aktīvi ūdenī šķīstoši proteīni, kuri satur augstākā koncentrācijā metionīnu un cisteīnu, kuri piedalās dīgļlapu šūnu metabolismā. **Prolamīni** – spirtā šķīstoši proteīni, kuros neietilpst lizīns un triptofāns, bet ir augsts leicīna, prolīna un glutamīnskābes līmenis. **Glutelīns** šķīst NaOH, ar prolamīnam līdzīgu sastāvu, bet augstāku glicīna, metionīna un histidīna saturu. Proteīna frakciju attiecība pupu sēklās variē arī starp šķirnēm un, to izmaiņas apstrādājot sēklas, intensīvi pētīta uztura zinātnieki (Abusin, Hassan, Babiker, 2009; Krupa, 2008), jo neapstrādātās pupās ir virkne savienojumu, kuri samazina, vai ierobežo pupu lietošanu uzturā. Tādi savienojumi ir – lektīni, saponīni, alkaloīdi, tripsīna inhibitori, lipoksigenāze, fitīnskābe, tanīni (Alghamdi, 2009; Bora, 2014).

Lektīni plaši izplatīti augu valsts savienojumi, sastopami ne tikai pākšaugu sastāvā. Veido apmēram 2 – 10 % no sēklu olbaltumvielām. Pupas satur lektīnu – favīnu. Neskatoties uz to ka, lektīni var izraisīt eritrocītu aglutināciju, tie būtiski nesamazina pupu uzturvērtību, jo termiskā apstrāde tos inaktivē (Martín-Cabrejas et al., 2009; Sharma, Sehgal 1992).

Saponīni sastāv no steroīdu vai triterpēnu aglikona, kurš saistās pie mono- vai oligosaharīda ar estera vai ētera saiti. Saturs sēklās mainās atkarībā no auga vecuma, auga daļas, kā arī audzēšanas apstākļiem. Saponīniem ir gan pozitīva ietekme – samazina holesterīna līmeni, imunostimulatori, samazina kardiovaskulāro slimību risku, gan virkne nevēlamu efektu – izraisa hemolītisko efektu, ietekmē gludās muskulatūras aktivitāti un gremošanas fermentu aktivitāti (Cheeke, 1971). Sēklu diedzēšana, mērcēšana vai termiska apstrādāšana samazina saponīnu daudzumu par 24 – 81% (Martín-Cabrejas, Aguilera, Pedrosa et al., 2009; Rochfort, Panozzo, 2007).

Vicīns un **konvicīns** ir pirimidīna glikozīdi. Tie ir iesaistīti auga aizsardzības mehānismos pret patogēniem (Griffiths, Ramsay 1996). Izplatīti visā augā, bet sēklās sasniedz attiecīgi 5 mg un 2 mg g^{-1} sausu sēklu (Arbid, Marquardt 1985).

Pupu sēklās nozīmīgu daļu aizņem ne tikai olbaltumvielas, bet arī ciete, kuras daudzums var sasniegt 44% no sausnes, 3.5 – 4.0% šķīstošie cukuri, bet tauku saturs līdz 2% (Cre´pon, Marget, Peyronnet et al., 2010).

Pupas ir nozīmīgs kultūraugs dažādos ģeogrāfiskajos reģionos, tāpēc atkarībā no klimatiskajiem apstākļiem katrā konkrētajā reģionā atšķiras kultivēšanas laiki un paņēmieni. Dienvidu reģionos, kur vasarā ir sauss un karsts klimats, pupas audzē rudens - ziemas mēnešos, pretstatā mērenā klimata reģioniem, kur pupas sēj pavasarī. Tāpēc mēdz izdalīt pavasara un ziemas pupas. Tā kā pupas audzē pārsvarā sēklu ieguvei, tad ziedēšana, ziedēšanas ilgums un sēklu veidošanās ir kritiski posmi ražas veidošanās procesā. Pavasara, ziemas un Vidusjūras tipa pupām ir atšķirīga fenoloģija, nepieciešamais fotoperiods, ziedēšanas inducēšanas laiks. Ja ziedēšanas fotoindukcijas pētījumos ir sasniegts zināms progress, tad molekulārā fizioloģijā un gēnu darbībā vēl ir daudz neskaidrību (Patrick, Stoddard, 2010). Pupas ir neitrālās dienas augi, ziedu apputeksnēšanos, sēklu lielumu un skaitu pākstī nosaka regulatorie mehānismi jau sēklu veidošanās laikā. Fotosintēzes procesa inhibēšanās var izraisīt ne tikai sēklu izmēra samazināšanos, bet arī atsevišķu sēklu augšanas apturēšanu pākstī (Toker, 2004). Dīgļlapu biomasas palielināšanās turpinās, līdz sēkla sāk nogatavoties, tad biosintēzes produktu pieplūdums samazinās (Weber, Borisjuk, Wobus, 2005; Gallardo, Thompson, Burstin, 2008).

1.1.2. Pupu (*Vicia faba* L.) nozīme ilgtspējīgas agroekosistēmas funkcionēšanā

Pākšaugus Latvijā lielākās platībās audzē galvenokārt lopbarībai, un sējumu platības dažādos periodos ir bijušas ļoti atšķirīgas. Kā norāda Balodis ar līdzautoriem (Balodis, Gaile, Kreita u.c. 2016), tad lopbarībai pupas Latvijā plaši audzētas laika periodā no 1940. līdz 1970. gadam. Šajā laikā notika arī intensīvs pētniecības darbs par pupu agrotehniku. No 2000. līdz 2010. gadam kopējā pākšaugu sējplatība svārstījās no 1.4 līdz 2.9 tūkstošiem hektāru. Turpmākajos gados, līdz 2014. gadam, pākšaugu sējplatības palielinājās nedaudz (līdz 11 tūkstošiem hektāru). Turpretī ar 2015. gadu viens no veidiem, kā izpildīt ES regulas Nr. 1307/2013 prasības, bija pākšaugu audzēšana. Tāpēc pākšaugu, tai skaitā pupu, sējplatības palielinājās līdz 31.6 tūkstotim hektāru 2015. gadā un 41.8 tūkstotim hektāru 2016. gadā (Cetrālā Statistikas pārvalde (CSP)[2]), no kuriem pupas bija 31.4 tūkstotis hektāru (t.i. 75% no visiem pākšaugiem). Pēc 2017. gada pākšaugu sējplatības samazinājās 2015. gada līmenī, tomēr pākšaugi joprojām ir nozīmīgs kultūraugs, lai gan Eiropas Regula pieļauj audzēt ilggadējos zālājus, lai dažādotu audzētos kultūraugus, atbilstoši "zaļināšanas" prasībām un ieviestu ekoloģiski nozīmīgas platības (ENP). Latvijā pārsvarā audzē sīksēklu pupas lopbarībai, bet rupjsēklu pupas pārtikai tikai nelielās platībās.

Audzējot pupas, galvenokārt pozicionē tās kā proteīniem bagātu uzturu un lopbarību. Tomēr to loma agroekosistēmā ir plašāka:

- simbiotiski saistītais slāpeklis akumulējas augos un augsnē,
- pākšaugu audzēšana samazina fosilās enerģijas patēriņu augu produkcijas ražošanā, jo samazinās nepieciešamība lietot minerālo slāpekļa mēslojumu,
- iekļaujot pupas augu maiņas sistēmā, uzlabojas arī augsnes bioloģiskā daudzveidība, tādejādi palielinot agroekosistēmas elastīgumu.

Pupu galvenā un visvairāk pētītā lauksaimnieciskā nozīme ir spēja saistīt atmosfēras slāpekli simbiozē ar gumiņbaktērijām. Tādejādi, apgādājot cilvēkus ar proteīnu bagātu uzturu un dzīvniekus ar barību, vienlaikus tiek samazināta atkarība no energoietilpīgā slāpekļa mēslojuma lietošanas. Atšķirībā no citiem pākšaugiem, pupas var uzturēt augstā līmenī simbiotisko slāpekļa saistīšanu, pat, ja augsnē ir augsts pieejamā slāpekļa līmenis (Köpke, Nemecek, 2010). Kā pamatojumu tam norāda, ka pupām, salīdzinot ar citiem pākšaugiem, un, sevišķi lopbarībai audzējamiem, sakņu sistēma nav ļoti smalki sazarota, tāpēc veidojas mazāks sakņu blīvums. Līdz pat 96% no augā uzņemtā N pupās var veidot simbiotiski saistītais no atmosfēras. Literatūrā minētais simbiotiski saistītā slāpekļa daudzums lauka apstākļos variē starp 15 (Schwenke, Peoples, Turner et al., 1998) un 648 kg N ha^{-1} (Sprent, 2007). Rezultātu svārstību plašo diapazonu nosaka specifiskie audzēšanas apstākļi, genotipiskās izmaiņas, kā arī atšķirīgās slāpekļa noteikšanas metodes. Attiecīgi 4 t ha^{-1} pupu sēklu ar slāpekļa daudzumu 4.5% atbilst 180 kg N ha^{-1} simbiotiski fiksētā slāpekļa. Optimālos apstākļos konstatētais dienas līmenis ir 4 – 5 kg N ha^{-1} (Köpke, Nemecek, 2010).

Kaut arī pupas labvēlīgos apstākļos var saistīt ievērojamu daudzumu atmosfēras slāpekļa, nav viennozīmīga viedokļa par augsnē ar augu atliekām atstāto slāpekļa daudzumu. Atlikums parasti ir atkarīgs no pupu audzēšanas mērķa un tehnoloģijas. Pupu ieguldījums augsnes kopējā N bilancē bieži vien ir zemāks nekā zaļmēslojumam audzētajiem tauriņziežiem. Novērots, ka raža ar augstu N savienojumu saturu, limitē N savienojumu uzkrāšanos augsnē, pat tad, ja augu atliekas pēc ražas novākšanas tiek iestrādātas augsnē (Schwenke, Peoples, Turner et al., 1998). Atšķirīgi dati par slāpekļa bilanci augsnē un pākšaugu pienesumu ar gumiņbaktēriju starpniecību veidojas, jo vecākos pētījumos ņēma vērā tikai slāpekļa bilanci virszemes daļās, bet ignorēja slāpekļa daudzuma izmaiņas un cēloņus augsnē. Jaunākos aprēķinos ņem vērā auga sugu, edafiskos faktorus, kuri ietekmē slāpekļa iznesi ar ražu, kā arī slāpekļa daudzuma palielināšanu ar mēslojumu vai nokrišņiem (Kessel,

2 Centrālā Statistikas pārvalde, www.goc.scp.lv

Hartley, 2000). Audzējot auglīgā augsnē Vācijā lauka pupām aprēķinātais slāpekļa atlikums, ieskaitot dzinumus (aprēķināts iekļaujot arī sezonālo lapu krišanu), saknes, gumiņus, kā arī augsnes nitrātus, nepārsniedza 125 – 168 kg N ha^{-1} (Köpke, Nemecek, 2010). Pienesums augsnes N bilancē ar saknēm un gumiņiem bija tikai 6 – 28 kg N ha^{-1} robežās un nebija augstāks par nitrātu daudzumu, kuri veidojas augsnē – apmēram 60 kg N ha^{-1}. Aizvien biežāk pētījumos ņem vērā ne tikai sakņu un gumiņu pēcražas atliekas, bet arī visā veģetācijas periodā atmirušās saknes, eksudātus un mikorizas sēņu hifas. Šajā gadījumā rezultāti uzrādīja augstāku pupu slāpekļa pienesumu augsnē, salīdzinot ar vecākiem datiem. Slāpekļa bilanci novērtē un salīdzina dažādiem pākšaugiem, Khāna ar līdzautoriem (Khan, Peoples, Schwenke et al., 2003) un Lopez-Ballido (Lo'pez-Bellido, Lo'pez-Bellido, Redondo et al., 2006) aprēķinos slāpekļa daudzums augu atliekās pupām bija vidēji 30 – 36 kg N ha^{-1}, bet aunazirņiem līdz 56 kg N ha^{-1}. Pākšaugu kultivēšana palielina kopējo augsnes slāpekļa daudzumu tikai tad, ja saistītais slāpekļa daudzums, ir lielāks nekā iznese ar ražu, aprēķināts, ka, vidēji 45 – 75% augu virszemes biomasas slāpeklis tiek novākts ar ražu (Beck, Wery, Saxena et al., 1991).

Simbiozes veidošana ar gumiņbaktērijām un atmosfēras slāpekļa saistīšana nav vienīgais pākšaugu pienesums agroekosistēmas ilgtspējīgā funkcionēšanā. Kā noskaidrots virknē pētījumu, pākšaugi reducē nezāļu un kaitīgo organismu daudzveidību, kā arī uzlabo augsnes kvalitāti. (Kessel, Hartlay, 2000).

Dienvidu reģionos, kur pupas audzē plašākos apmēros nekā Eiropā, bieži lieto arī jauktos sējumus un pupu audzēšanu starpkultūrā. Audzējot kviešiem un miežiem starpkultūrā pupas, kuru sēklu blīvums bija 37.5% no kopējā sēklu apjoma, ieguva lielāku ražu, tajā pašā laikā sējumos novēroja mazāku nezāļu daudzumu (Agegnehu, Ghizaw, Sinebo, 2006).

Saimniecībās ar intensīvu agrotehniku bieži vien netiek ievērota augu maiņa vai augu maiņā iekļauti tikai divi kultūraugi. Šādās saimniecībās augu maiņu, papildinot ar pākšaugiem, ne tikai uzlabojās augsnes slāpekļa bilance, bet novēroja arī labvēlīgu ietekmi uz augsnes struktūru. Laukos, kur ievēro augu maiņu, samazinās augu sakņu izdalījumu un augu atlieku fitotoksiskais un alelopātiskais efekts. Iekļaujot pupas augu maiņā starp graudaugiem, tiek izjaukti augiem patogēno organismu dzīves cikli (Köpke, Nemecek, 2010). Apkopojot vairākus pētījumus Eiropas mērenā klimata daļā, Nemeceks (Nemecek, Richthofen, Dubois et al, 2008) secināja, ka audzējot pākšaugu samzinās slāpekļa emisijas amonija un slāpekļa oksīda veidā, jo pākšaugiem, salīdzinot ar graudaugiem, ir iespējams mazāk lietot slāpekļa minerālmēslojumu. Konstatēja, ka pākšaugu sējumos samazinās augsnes paskābināšanās intensitāte. Tomēr literatūrā norādīts, ka sējumos, kur pākšaugi intensīvi saista atmosfēras slāpekli, pastāv pastiprināta slāpekļa savienojumu ieskalošanās dziļākajos augsnes slāņos (Köpke, Nemecek, 2010).

Pupas, tāpat kā visi pākšaugi, veido simbiotiskas asociācijas ar mikroorganismiem. Sakņu izdalījumi un mikroorganismu bioloģiski aktīvie izdalījumi būtiski ietekmē rizosfēras mikroorganismu daudzveidību un aktivitāti. Pākšaugu simbioze ar gumiņbaktērijām izmaina slāpekļa bilanci augsnē, bet augu nodrošinājumu ar fosforu uzlabo ne tikai simbioze ar mikorizas sēnēm, bet arī sakņu izdalījumu stimulētie brīvi dzīvojošie rizosfēras mikroorganismi (Maltais-Landry, 2015).

Aprēķināts, ka zirņi un pupas ar vienu tonnu produkcijas un atbilstošu salmu daudzumu iznes: 52.2 kg slāpekli (N); 9.5 kg fosforu (P_2O_5) un 21.7 kg kāliju (K_2O) (Lauku kultūraugu..., 2013). Simbiozē ar gumiņbaktērijām zirņi un pupas ļauj sevi nodrošināt ar slāpekli, tāpēc mēslojumu plāno tikai augu attīstības sākumā. Zirņiem un pupām virsmēslojumā slāpekļa mēslojumu parasti neplāno, bet nodrošina visus priekšnosacījumus gumiņbaktēriju darbībai. Tomēr jāņem vērā, ka gumiņbaktēriju efektīvai darbībai nepieciešama arī virkne mikroelementu. Kā nozīmīgākie ir B, Mo. Laukos, kuros augsnes reakcija ir skāba (līdz pH KCl 6.5), gumiņbaktēriju darbības efektivitāte samazinās.

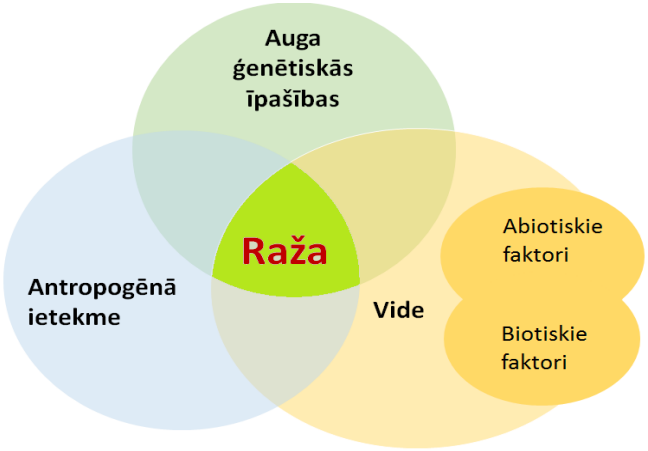
1.2. Simbiotiskās asociācijas

Terminu simbioze vai "divu atšķirīgu organismu koeksistence" ieviesa A. De Bary (Anton de Bary) 1879. gadā (Bradford, Schwab, 2012). Izdala trīs simbiozes pamatveidus: a) komensālismu (mijiedarbība ar labumu vienam partnerim, bet neitrālu otram), b) antagonismu (vai parazītismu, kur viens simbionts izmanto otru) un c) mutuālismu (kur ieguvums ir abiem simbiontiem). Evolūcijas procesā simbiozei bija nozīmīga loma, veidojot augsti organizētu dzīvesstilu un jaunus mijiedarbību veidus starp organismiem. Simbiotiskajām attiecībām ir ne tikai dažādas izpausmes, bet arī atšķirīgs attiecību ciešums starp simbiozes partneriem. Attiecību ciešums var izpausties kā obligātas vai daļēji obligātas simbiozes veidošanās. Pēc simbiotiskās asociācijas partneru atkarības līmeņa vienam no otra, simbioze var būt obligāta vai fakultatīva gan no ekoloģijas, gan ģenētikas viedokļa. Organismi, kuriem simbioze ir obligāta no ekoloģijas viedokļa, nevar bez simbiozes izveidošanas ieņemt jaunu izplatības teritoriju, bet organismiem, kuriem obligāta simbioze ģenētiski, ir zaudējuši kādus būtiskus gēnus, kuri nepieciešami organisma funkciju veikšanai (Vance, 2001).

Augu un mikrosimbiontu attiecības parasti ir fakultatīvas vai ekoloģiski obligātas. Tās veidojas, balstoties uz barības vielu (slāpekļa, fosfora, fotosintēzes produktu) apmaiņu, vai paaugstina auga izturību pret patogēniem. Dabiskajās ekosistēmās parasti konstatējami abi attiecību veidi, jo augi var veidot vienlaicīgi attiecības ar vairākiem mikrosimbiontiem (Vance, 2001; Lum, Hirsch, 2003).

Agrīnos ekoloģijas pētījumos terminus simbiotiskas un mutuālistiskas attiecības mēdza lietot līdzvērtīgi, mutuālismam veltot nepelnīti maz uzmanības. Sākotnēji terminu simbioze lietoja ne tikai apzīmējot ķērpjus, bet arī parazītiskas attiecības, tomēr vairums zinātnieku, šo terminu lieto, lai apzīmētu labvēlīgu asociāciju veidošanos. Izzinot dažādu organismu mijiedarbību ekosistēmās, mutuālistiskās attiecības tiek pētītas un novērtētas aizvien plašāk. Noskaidrots, ka lielākā daļa augu veido mutuālistiskas attiecības ar citu grupu organismiem. Šādas simbiotiskās attiecības veidojas ne tikai starp augiem un apputeksnētājiem kukaiņiem, bet plaši sastopamas simbiotiskās attiecības ar baktērijām un sēnēm. (Shtark, Borisov, Zhukov et al., 2010).

Mutuālisms ir īpaša ekoloģiska un evolucionāra divu vai vairāku organismu stratēģija, nodrošinot to fizioloģisko funkcionēšanu. Šādas attiecības nav pielīdzināmas atsevišķu brīvi dzīvojošu organismu adaptācijai konkrētos vides apstākļos. Evolūcijas procesā, veidojoties mutuālistiskām attiecībām, organismi var zaudēt kādas īpašības, bet pilnveidot citas, kuras palīdz pilnvērtīgāk realizēt mijiedarbību. Ieguvums no šāda veida attiecībām var būt dažāds, bet vairumā gadījumu, vismaz viens no partneriem izmanto otru barības resursu iegūšanai, bet otrs iegūst drošāku vidi augšanai un attīstībai (Boucher et al., 1982).



1.1.att. **Ražas kvalitāti un kvantitāti ietekmējošo pamatfaktoru mijiedarbība**
(L.Dubova pēc literatūras datiem)

Neskatoties uz to ka, mutuālistiskas attiecības ir labvēlīgas simbiontiem, pozitīva ietekme vērojama tikai tad, ja katra iegūtais labums pārsniedz to ieguldījumu attiecību veidošanā. Starp augu un mikroorganismu, šāda veida attiecībās veidojas jauni šūnu un audu veidi (fizioloģiski vai strukturāli) vai pat orgāni (piemēram, tauriņziežiem gumiņi) (Shtark, Borisov, Zhukov et al., 2010).

Augu un mikroorganismu simbiotiskās attiecības ir aktuālas arī agroekosistēmas, kur kultūraugu raža ir atkarīga no daudzu faktoru mijiedarbības (1.1. att.).

Agroekosistēmās, papildus biotiskajiem un abiotiskajiem faktoriem, būtiska ietekme ir cilvēka saimnieciskajai darbībai, kura var izmainīt arī dažādu bioloģisko procesu norisi. Simbiotisko attiecību veidošanos un darbības efektivitāti var izmainīt gan dažādie augsnes apstrādes paņēmieni, lietotie minerālmēslojumi un ķīmiskie augu aizsardzības līdzekļi, kā arī sēklu inokulēšanai lietotie mikroorganismi. Joprojām aktuāli ir pētījumi par augu un patogēno mikroorganismu mijiedarbības bioloģiju, aizvien aktuāli ir tauriņziežu un gumiņbaktēriju mijiedarbības saimnieciskās un ekoloģiskās nozīmes pētīšana. Aktuāli ir pētījumi par augu un mikorizas sēņu simbiozi ne tikai dabīgajās ekosistēmās, bet arī agroekosistēmās.

1.2.1. Bioķīmiskie signāli simbiotisko asociāciju veidošanās procesā

Simbiotisko asociāciju veidošanā iesaistīto bioķīmisko signālu klāstā vienu no būtiskākajām lomām veic flavonoīdi. Tie ir plaši sastopama augu sekundāro metabolītu grupa, kura piedalās dažādās regulatorajās reakcijās, darbojas kā transkripcijas signāli starp augu un mikroorganismiem. Intensīvāki pētījumi par flavonoīdu darbību aizsākās 20. gadsimta beigās un pavēra jaunu pētījumu lauku, lai izprastu augu un mikroorganismu mijiedarbības mehānismus rizosfērā (Hartwig, Maxwell, Joseph et al., 1990).

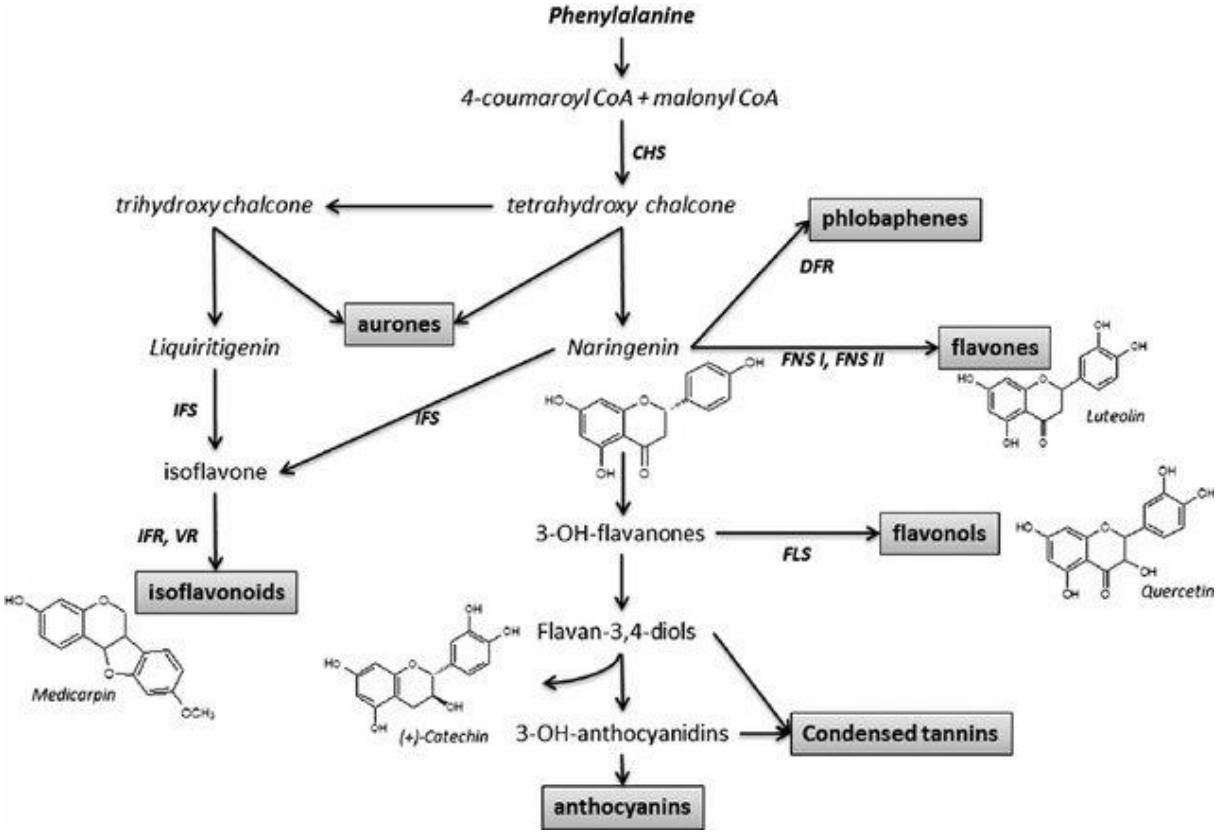
Virkne flavonoīdu ir fitoaleksīni – vielas, kuras augos veidojas mazās koncentrācijās (pikomolāri). Tie sintezējas un izdalās rizosfērā kā aizsardzības mehānisms pret patogēnajām baktērijām un sēnēm. Neskatoties uz antifungālām, antibakteriālām un antioksidantu īpašībām, flavonoīdi ir atzīti par agrīnajiem mijiedarbības signāliem rizosfērā. Tos izdala ne tikai auga saknes, bet arī sēklas (Maj, Wielbo, Marek-Kozaczuk et al., 2010). Augs izdala flavonoīdus no mazajām saknītēm un spurgaliņām, veidojot hemotrofiskos signālus, lai sēņu hifas augtu tieši uz sakņu pusi. Mikorizas palīgbaktērijas (MPB) bieži vien inducē pastiprinātu flavonoīdu izdalīšanos, tādejādi atvieglo sēnei sakņu kolonizēšanu (Frey-Klett, Garbaye, Tarkka, 2007). Tādejādi rizosfērā esošā mikroorganismu populācija var ietekmēt gan gumiņu veidošanos, gan mikorizas kolonizācijas intensitāti. Konstatēts, ka *Bradyrhizobium japonicum* celma, kuram ir MPB īpašības, izdalītais *Nod* faktors stimulēja flavonoīdu izdalīšanos no sojas (*Glycine max*) dīgļsaknes un tādējādi sekmēja mikorizas veidošanos (Xie, Staehelin, Vierheilig, et al., 1995).

Rizosfērā izdalītie flavonoīdi ir nozīmīgas signālmolekulas arī trīspusējās simbiozes veidošanās procesā, koordinējot to gēnu darbību, kuri inducē mikrobiālā simbionta gēnu transkripciju. Specifiski gēni nepieciešami, lai veidotos gumiņi un notiktu N_2 saistīšana (Schultze, Kondorosi, 1998; Day, Poole, Tyermanc e al., 2001). Daži no šiem signāliem stimulē mikorizālo kolonizāciju (Xie, Staehelin, Vierheilig, et al., 1995). Pētījumos ir konstatēts, ka mikorizas sēnes un gumiņbaktērijas stimulē flavonoīdu akumulāciju saknēs (Duc, Trouvelot, Gianinazzi-Pearson et al., 1989; Larose, Chenevert, Moutoglis et al., 2002).

Flavonoīdi ir fenilpropanoīdu (phenylpropanoid pathway) un acetāta-malonāta metabolisma ceļa sekundārie produkti. Tādejādi visi flavonoīdi ir fenilalanīna atvasinājumi šikimskābes metabolisma ceļā (1.2. att.). Tie ir policikliski aromātiski savienojumi, kurus izdala augi rizosfērā (Shaw, Morris, Hooker, 2006).

Flavonoīdu struktūra sastāv no diviem aromātiskajiem gredzeniem un heterocikliskā gredzena. Specifiskas izmaiņas šajā pamatstruktūrā ir pamatā iedalījumam dažādās flavonoīdu klasēs: kalkonos, flavanonos, flavonos, flavonolos, izoflavonoīdos, un antocianidīnos

(Harborne, Wiliams, 2000). Augos identificēti vairāk nekā 4000 dažādu flavonoīdu (Perret, Staehelin, Broughton, 2000; Hassan, Mathesius, 2012). Flavonoīdu maisījumi vai citi sakņu izdalītie savienojumi darbojas kā signāli, kas ietekmē gumiņbaktēriju spēju izdzīvot rizosfērā, veidot gumiņus un gumiņbaktēriju konkurētspēju (Maj, Wielbo, Marek-Kozaczuk et al., 2010; Cooper, 2007).



1.2.att. **Simbiontu mijiedarbībai nozīmīgie flavonoīdi**
(Hassan, Mathesius, 2012)

Visiem flavonoīdiem nepiemīt spēja inducēt gumiņu veidošanos regulējošos gēnu ekspresiju. Salīdzinot struktūru dažādiem *nod*-inducējošiem flavonoīdiem konstatēts, ka hidroksilēšana C7 un C4 pozīcijā ir nozīmīga *nod*-inducējošai aktivitātei. Domājams, ka saimniekaugus no nesaimniekaugiem mikroorganismi atšķir, pamatojoties uz izdalītajiem specifiskajiem flavonoīdiem (Hirsch, 1999; Garg, Gentaljani, 2007). Vairākiem tauriņziežiem konstatēti flavonoīdi, kuri inducē *nod* gēna aktivitāti. Piemēram, luteolīns ir specifisks *Sinorhizobium meliloti*, naringerīns – *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* un *Bradyrhizobium* sp. (Hartwig, Phillips, 1991; Maj, Wielbo, Marek-Kozaczuk et al., 2010). Flavonoīdi var arī inhibēt gumiņu veidošanās procesu, tomēr ir arī pētījumi, ka gumiņu veidošanās procesu var palielināt, apstrādājot sēklas ar eksogēnajiem *nod*-gēna inducētājiem. Piemēram, pupām gumiņu veidošanās ar *Rhizobium etli* un *Rhizobium tropici* izmainījās, apstrādājot ar kvercetīnu, bet pupām un lēcām gumiņu veidošanās, kā arī sausnas uzkrāšanās augā palielinājās, ja *R. leguminosarum* apstrādāja ar hesperitīnu un naringerīnu (Begum, Leibovitch, Migner et al., 2001; Maj, Wielbo, Marek-Kozaczuk et al., 2010)

Pētīta arī flavonīdu darbība gumiņbaktēriju un pākšaugu simbiozes veidošanās procesā. Flavonoīdi izdalās no sēklapvalka un saknēm, bet to sintēzes un eksudācijas procesa kontrole saknēs un sēklās ir atšķirīga. Lucernas dīgļsakne izdala trīs *nod* gēnus aktivizējošus flavonoīdus koncentrācijā 1 – 3 pmol no auga stundā, bet, mērcējot sēklas, pirmo četru stundu laikā luteolīns izdalās koncentrācijā 70 pmol stundā (Hartwig, Phillips, 1991). Visvairāk flavonoīdi izdalās ap saknes galu (Hatrwig, Maxwell, Joseph et al., 1990; Graham, 1991),

optimālo koncentrāciju sasniedzot pie spurgaliņu zonas, kur ir piemērotākā vieta gumiņbaktēriju infekcijas norisei (Zuanazzi,Cleargeot, Quirion et al, 1998).

1.2.2. Gumiņbaktēriju un pākšaugu simbioze

Tauriņziežiem ir spēja saistīt atmosfēras slāpekli, veidojot simbiozi ar saimniekauga specifiskajām augsnes baktērijām, kuras vispārēji zināmas kā gumiņbaktērijas (*rhizobia*). *Rhizobiales* kārtā apvienotas α-proteobaktēriju dzimtes *Rhizobiacae, Bradyrhizobiaceae, Phyllobacteriaceae.* Nozīmīgākās dzimta apvieno vairākas ģintis *Rhizobium, Neorhizobium, Sinorhizobium,* u.c ģintis). Ģinti *Rhizobium* pirmo reizi raksturoja Franks 1889. gadā (Velazquez, Garcia- Fraile, Ramirez-Bahena et al., 2005; Parte, 2018).

Gumiņbaktērijas ir atmosfēras slāpekli saistošas baktērijas, kuras veido gumiņus uz tauriņziežu saknēm. Gumiņbaktērijas ir 0.5 – 1.0 × 1.2 – 3.0 µm lielas aerobas nūjiņveida baktērijas. Neveido sporas. Pēc šūnapvalka uzbūves – gram - negatīvas. Baktērijas ir kustīgas, tām ir 1 – 6 peritrihi izvietotas flagellas. Optimālā augšanas temperatūra 25 – 30 °C, bet optimālais pH 6 – 7, lai gan atsevišķas sugas var dzīvot arī skābākā augsnē. Šūnas dalīšanās laiks 1.5 – 5.0 stundas. Gumiņbaktērijām ir hemoorganotrofais barošanās veids, tās var izmantot vienkāršos ogļhidrātus, kā enerģijas avotu, kā arī organisko skābju sāļus, tomēr celulozi un cieti neizmanto. Slāpekļa avots, ja baktērijas dzīvo bez simbiozes ar augu, ir amonija, nitrāta vai aminoskābju slāpeklis (Somasegaran, Hoben, 1994).

Simbiotiskais slāpeklis (N_2) pākšaugos var veidot līdz pat 97% no kopējā slāpekļa daudzuma (Peoples, Craswell, 1992). Aprēķināts, ka gumiņbaktērijas, atkarībā no sugas, var saistīt, līdz 300 kg N uz ha (Peoples, Herridge, Ladha, 1995). Globāli gumiņbaktēriju devums slāpekļa bilances atjaunošanā augsnē ir kā minimums 70 – 90 miljoni tonnu slāpekļa gadā. No kurām puse ir mērenajos un subtropu reģionos, bet otra puse - tropu zonā (Brockwell, Bottomley, Thies, 1995; Graham, 2008*).*

Slāpekļa mēslojums šodien ir modernās lauksaimniecības neatņemama sastāvdaļa un ieņem pirmo vietu starp investīcijām lauksaimniecības ražas palielināšanā. Tomēr N mēslojums vienlaikus rada vides piesārņojumu ne tikai lietošanas rezultātā, bet slodze videi tiek radīta jau mēslojuma ražošanas procesā. Iegūstot augstas ražas, ar produkciju no augsnes tiek iznests liels apjoms dabīgo N rezervju, tādejādi noplicinot augsni. Konstatēts, ka ilgstoši augstu N devu lietošana var samazināt ražu (Bohlool, Ladha, Garrity et al., 1992).

Vides kvalitātes un ekonomiskie nosacījumi liek meklēt jaunas metodes un paņēmienus, kas ļautu lauksaimniecībai attīstīties ilgtspējīgi gan no ekonomiskā, gan lauksaimniecības skatupunkta. Bioloģiskā atmosfēras slāpekļa saistīšana (BNS) darbojas, kā atjaunojams, videi draudzīgs slāpekļa avots, kurš var daļēji aizvietot vai, aizstāt pilnībā minerālā slāpekļa mēslojumu lietošanu (Peoples, Herridge, Ladha, 1995). BNS izmantošana samazina nepieciešamību lietot minerālā slāpekļa mēslojumu, kas kā papildus ieguvums izpaužas uz globālo slāpekļa savienojumu apriti, siltumefektu, kā arī virszemes un gruntsūdeņu piesārņojumu. Pākšaugu un citu simbiotiski N_2 fiksējošo augu starpsējumi *(intercroping*) ir videi draudzīgs veids, kā uzlabot augsnes un vides kvalitāti, reducējot papildus minerālā slāpekļa ievadi sistēmā. Bioloģiski saistīto slāpekli augi var izmantot tieši, tas ir mazāk pakļauts izskalošanās riskam un denitrifikācijai (Garg, Geentaljani, 2007).

Evektīvas simbiozes rezultātā, baktērijas apgādā augu ar papildu slāpekli, augam iespējams paaugstināt fotosintēzes intensitāti. Gumiņbaktēriju un pākšaugu mijiedarbības pētījumi vērsti uz simbiozes efektivitātes paaugstināšanu, jo uz efektīvo gumiņu rēķina fotosintēzes produktus iegūst arī baktērijas mazāk efektīvajos gumiņos (Denison, 2000).

Bioloģisko slāpekļa saistīšanu var veikt gan brīvi dzīvojošie mikroorganismi, piemēram, *Azotobacter, Beijerinckia, Clostridium, Bacillus, Klebsiella, Chromatium, Rhodospirillum,* gan simbiozi ar augiem veidojošie mikroorganismi. No lauksaimniecības skatupunkta, apmēram 80% bioloģiski fiksētā N_2 iegūts simbiozē starp pākšaugiem un α-proteobaktērijām

no kārtas *Rhizobiales*, dzimtas *Rhizobiaceae*, kas iekļauj sugas no ģintīm *Rhizobium, Bradyrhizobium, Sinorhizobium, Azorhizobium* un *Mesorhizobium* (Farrand, Van Berkum, Oger, 2003; Graham, 2008).

Pētījumi par gumiņbaktēriju praktisko pielietojumu kultūraugu audzēšanā aizsākās līdz ar *Rhizobium* baktēriju fizioloģijas izpēti. Pētījumi par par gumiņbaktērijām intensīvi notika arī Latvijā. Intensīvākie pētījumu posmi sakrīt ar periodiem, kad plaši audzēja tauriņziežus. Galvenais uzsvars pētījumiem gan sākotnējā periodā, gan atsākoties 21. gadsimtā, ir kultūraugu ražas kvalitātes un kvantitātes paaugstināšana, gan vides problēmu risināšana. Sākot ar pagājušā gadsimta piecdesmitajiem gadiem, intensīvi pētīta gumiņbaktēriju izplatība Latvijas augsnēs. Pārsvarā pētīja lopbarībai audzējamos tauriņziežus. Latvijas Lauksaimniecības universitātē (iepriekš Latvijas Lauksaimniecības akadēmijā) noritēja intensīvs darbs par āboliņa, lucernas un lupīnas gumiņbaktērijām. Analizēta dažādu *Rhizobium* sugu saimniekaugu loks un slāpekļa saistīšanas efektivitāte. Pētījumus par āboliņa grupas *Rhizobium* baktēriju izplatību veica profesors A.Kalniņš, noskaidrojot arī, ka labāka baktēriju dzīvotspējas saglabāšanās ir velēnu karbonātu augsnēs. Savukārt profesors. V.Klāsens (1967), pētot zirņu – vīķu – pupu grupas baktēriju izplatību, noteica, ka visvairāk šīs grupas baktērijas sastopamas velēnu karbonātu augsnēs (vidēji 10^4 baktērijas 1 g augsnes), bet podzolētās augsnēs būtiski mazāk – gumiņbaktēriju skaits nepārsniedza 1000 šūnas 1 g augsnes. Skaidroja arī pēc tauriņziežiem audzēto kultūraugu ietekmi uz *Rhizobium* saglabāšanos augsnē. Tomēr pētījumi bija vērsti vairāk uz noteikta auga un baktēriju sugas mijiedarbību, jo metodiski ir grūti novērtēt visu augsnes un īpaši rizosfēras mikroorganismu mijiedarbību un aktivitātes izmaiņas.

1.2.2.1. Gumiņbaktērijas, to dzīves cikla raksturojums

Veidojoties gumiņam, baktēriju dalīšanās norit intensīvāk nekā augsnē. Laboratorijas un lauka izmēģinājumos noskaidrots, ka sojas gumiņā ir vidēji 10^8 līdz 10^9 *Bradyrizobium japonicum* šūnas, kas ir vienas vai dažu šūnu pēcnācēji. Gumiņā baktēriju dalīšanās var notikt veiksmīgāk, jo simbiozes izveidošanās nodrošina, ka baktēriju šūnās uzkrājas ar enerģiju bagāta rezerves viela - polihidroksibutirāts (PHB) un fosfāti, kas dod labākas izdzīvošanas iespējas apstākļos, kad baktērijas ir izkļuvušas no gumiņa, bet nav ārējs nodrošinājums ar oglekļa savienojumiem. Novērots, ka ar uzkrātajām rezervēm *Sinorhizobium meliloti* var trīskāršot populācijas blīvumu, bet *B. japonicum* – pieckāršot. Gumiņbaktēriju izturību nosaka vispirms to spēja vairoties gumiņā un tikai pēc tam devums saimniekaugam. Tomēr saimniekauga un baktērijas intereses pārklājas. Vienā augā esošajiem gumiņbaktēriju celmiem iespējama simbiotiskās sadarbības ierobežošana, ja tās nesaista pietiekoši daudz slāpekli. Mazāk efektīvajām baktērijām saimniekaugs ierobežo oglekļa savienojumu piegādi. Gumiņi, kuri nesaista pietiekoši daudz slāpekli, nesaņem no saimniekauga nepieciešamos resursus, tāpēc gumiņi ir mazāki. (Laguerre, Depret, Bourion et al., 2007). Veidojoties traucējumiem starp baktēriju un saimniekaugu, samazinās baktērijām pieejamie resursi, tās var sākt izmantot gumiņa audus (Denison, Kiers, 2011).

Tā kā gumiņbaktērijas var ilgstošu laika periodu augsnē dzīvot kā saprotrofie organismi, rūpīgi jāizvēlas sēklu inokulēšanai paredzētos celmus. Ja gumiņbaktērijas ir ienestas augsnē, nākamās inokulācijas var nedot vēlamo efektu (Kessel, Hartlay, 2000), bet, lauksaimniekam veicot pākšaugu sēklu inokulāciju, jāiegūst augstāka sēklu raža vai proteīna saturs sēklās. Atbildes reakcija uz inokulāciju ir specifiska, tāpēc simbiozes efektivitāti nosaka ne tikai izvēlētā baktēriju celma konkurētspēja augsnē, bet arī saimniekauga suga vai pat šķirne. To ietekmē arī konkrētās vietas biotisko un abiotisko faktoru mijiedarbība. (Graham, Vance, 2003; Carter, Rawlings, Orme-Johnson et al., 1980). Novērota tādu pazīmju genotipiskā mainība, kā gumiņu skaits un masa vai nitrogenāzes aktivitāte, tāpēc tās var izmantot saderīgāko saimniekauga un gumiņbaktēriju celma atlases procesā. No augsnes ar augstu

dabīgās gumiņbaktēriju populācijas blīvumu iespējams atlasīt baktēriju celmus, kuri ir efektīvi ar plašu pākšaugu genotipu spektru (Peoples, Brockwell, Herridge et al., 2009).

Inokulēšanai paredzēto baktēriju atlase vērsta uz visefektīvāko celmu izvēli, tomēr starp baktēriju celmiem iespējams novērot ļoti būtiskas efektivitātes atšķirības. Līdzīgi ir ar supernodulācijas genotipu atlasi. Pazīmes mainās lauka apstākļos dažādās pākšaugu audzēšanas sistēmās. Ja augsnē ir pietiekoši daudz N auga vajadzībām, pat ja simbioze izveidojusies starp saderīgiem partneriem, saistīsies maz N_2. Mazāk efektīva baktēriju celma slāpekļa saistīšanas apjoms palielinās, ja pieaug saimniekauga vajadzība pēc slāpekļa. Secināts, ka nitrogenāzes aktivitāte ir mainīga un pielāgojas auga vajadzībai pēc slāpekļa. Līdz ar to saistītā N_2 apjoms vairāk atkarīgs no saimniekauga vajadzības pēc slāpekļa, nevis baktērijas saistīšanas kapacitātes. Tāpēc, efektīvākais paņēmiens simbiotiski saistītā slāpekļa apjoma palielināšanai, ir izmainīt audzēšanas apstākļus, lai augs veidotu pieprasījumu pēc slāpekļa (Hirsch, 1992).

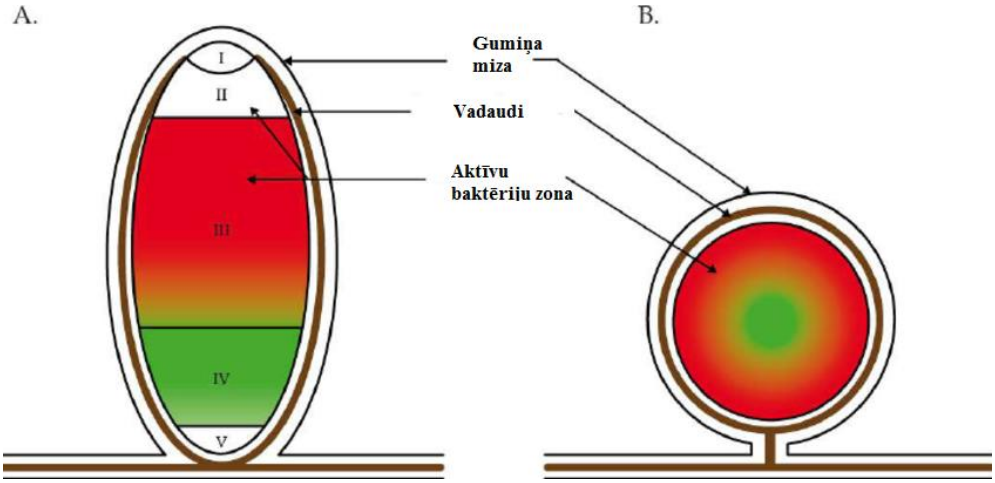
Kā norāda Denisons un Kiers (Denison, Kiers, 2011) jautājums par gumiņbaktēriju nokļūšanu augsnē, gumiņiem novecojot, ir maz pētīts. Brockwells (Brockwell Bottomley, Thies, 1995) konstatējis, ka sojas gumiņiem novecojot, augsnē baktēriju skaits palielinājās līdz 2.5 10^5 šūnu 1 g augsnes. Domājams, ka šis pieaugums ir saistāms ar baktērijām, kuras ir izkļuvušas no gumiņa, nevis baktēriju dalīšanos rizosfērā, jo baktēriju skaita pieaugums lielāks konstatēts no aktīvākiem, pilnvērtīgākiem gumiņiem. Daudziem saimniekaugiem, tai skaitā lucernai, baktērijas zaudē spēju vairoties, līdzko diferencējas par bakteroīdiem. Tomēr tipiskā lucernas gumiņā daļa šūnu nediferencējas un saglabā spēju dalīties.

Pēc gumiņbaktēriju izkļūšanas no gumiņiem to izdzīvošanu augsnē ietekmē virkne biotisko un abiotisko faktoru. Dažus mēnešus pēc izkļūšanas baktēriju skaits samazinās, jo tās ir barība vienšūņiem (*Protozoa*), kā arī ne mazāk nozīmīga ir vides faktoru ietekme. Vienu gadu bez saimniekauga baktēriju skaits augsnē var saglabāties pastāvīgā līmenī. Ja pēc pupām trīs gadus audzē kviešus, pupām piemērotu gumiņbaktēriju populācija joprojām paliek vismaz tūkstoš reizes augstāka nekā augsnē, kur audzēti tikai kvieši. Citā lauka izmēģinājumā zirņu gumiņbaktērijas saglabāja paaugstinātu skaitu piecus gadus pēc zirņu audzēšanas. Konstatēti arī gumiņi, no kuriem baktēriju izkļūšana ilgst vairākus mēnešus Kā vienu no faktoriem, kurš palīdz gumiņbaktēriju populācijai saglabāt augstu blīvumu periodos starp saimniekaugiem, min arī nesaimniekaugu sakņu izdalījumus. Konstatēts, ka gumiņbaktērijas var vairoties, tām dzīvojot kā endofītiem nesaimniekaugu šūnās. Augsnē gumiņbaktērijas var ietilpt vairāku sugu baktēriju veidotās asociācijās uz augsnes daļiņām vai veidot dažu šūnu klāsterus (Denison, Kiers, 2011).

1.2.2.2. Gumiņbaktēriju un pākšaugu simbiozes veidošanās

Simbiozē starp pākšaugiem un gumiņbaktērijām izveidojas gumiņi, jauna augsti organizēta struktūra, kur bakteroīdiem ir piemērota vide, lai pārveidotu N_2 augiem izmantojamajā amonija formā. Gumiņu forma un uzbūve atšķiras dažādu grupu augiem. Atkarībā no tā vai gumiņos, pēc to izveidošanās, meristēmas saglabājas aktīvas vai nē, izšķir gumiņus ar determinanto un indeterminanto augšanas veidu (Nap, Bisseling, 1990; Hirsch, 1992; Rashid, Krehenbrink, Akhtar, 2015). Indeterminanto gumiņu uzbūve ir sarežģītāka un tam var izdalīt piecas zonas (1.3.att.). Pretstatā indeterminantajiem gumiņiem, kuriem ir noturīga meristēma, kā rezultātā gumiņam bieži vien ir cilindriska vai zarota forma, determinantajiem meristēma ir aktīva ierobežotu laiku, tāpēc gumiņi vairumā gadījumu ir nenoteiktas formas. Tipiski determinantie gumiņi veidojas sojai. Gumiņš sāk veidoties no meristēmas šūnām mizā, bet šūnu dalīšanās apstājas apmēram 10 dienas pēc inficēšanās. Gumiņam ir radiāls attīstības gradients un arī gumiņa novecošanās sākas no centra. (Hirsch, 1992; Puppo, Groten, Bastian et al., 2005). Gumiņu novecošanās process ir gan ģenētiski regulēts, gan to ietekmē vides faktori ar auga starpniecību. Piemēram, novecošanās var sākties

pirms termiņa, ja augam ir sausuma stress, apgaismojuma trūkums vai augu mēslošanā lietots minerālmēslojums nitrātu formā (Puppo, Groten, Bastian et al., 2005).



1.3.att. **Indeterminato (A) un determinanto (B) gumiņu pamatuzbūve** (Hirsch, 1992)
Zonas:
I – apikālā meristēma,
II – Starpzona, kur baktērijas no infekcijas pavediena iekļūst augu šūnās un veidojas bakteroīdi,
III – slāpekļa fiksēšanas zona ar pilnībā diferencētiem bakteroīdiem,
IV – novecošanās zona,
V – zona, kur brīvi dzīvojošās gumiņbaktērijas no vecajiem infekcijas pavedieniem var atkārtoti inficēt saknes

Papilionoideae apakšdzimtas augiem, kas satur daudzas ekonomiski nozīmīgas ģintis, kā *Trifolia, Vicia*, kā arī lielākajā tauriņziežu ģintī *Astragalu*s gumiņi ir indeterminanti. Šādiem gumiņiem ir viena vai vairākas apikālas meristēmas (Sprent, 2007).

Augi, to sakņu sistēma un gumiņu veidošanās joprojām tiek pētīti. Ir identificēts gumiņu veidošanās procesam nepieciešamais nodulācijas gēns (*nod*) un raksturota tā ekspresija. Parasti iedala „kopīgos" *nod* gēnus – *nod* A, B un C, „regulatoro" *nod* D gēnu un saimniekauga specifiskumu noteicošos gēnus. Nod ABC ir obligāti gumiņa veidošanai un jebkura gēnu sekvences mutācija veido Nod^- fenotipu. Daudziem pākšaugiem, *nod* gēns ir organizēts vairākos operonos, pirms kuriem ir *nod box* promoters, kurš satur konservatīvu DNS reģionu. *Nod* gēna produktu bioķīmiskā funkcija ir agrīno signālu, t.s. *Nod* faktoru, sintēze un transports, kurus uztver saimniekaugs. Šīs molekulas sastāv no lipohitooligosaharīdiem (LCOs). Hitīnam līdzīgie savienojumi ierosina virkni kaskādes tipa reakciju, pirms baktērija iekļūst auga saknēs. *Nod* faktoru izraisītās reakcijas ir spurgaliņu deformācija un saliekšanās, kā arī saknes mizas šūnu dalīšanos. Pastiprinās flavonoīdu sintēze un eksudācija. *Nod* faktors izraisa vairāku agro nodulīna (ENOD) gēnu ekspresiju. Nodulīns ir augu kodēts proteīns, kurš ekspresējas gumiņa veidošanās laikā. Kad process ir ieslēdzies, pākšaugi iegūst visas nepieciešamās īpašības gumiņu veidošanai. (Nap, Bisseling, 1990; Hirsch, 1992).

Pētot gumiņu veidošanās procesā iesaistīto gēnu darbību, ir noskaidrots, ka tikai *nod* D ekspresējas, ja nav saimniekauga. Pārējiem *nod* gēniem vēl nepieciešami bioķīmiskie faktori - flavonoīdi, kuri inducē to ekspresiju. Specifiskumam ir nozīmīga loma, nosakot saimniekaugu diapazonu, jo katra gumiņbaktērija ir pielāgojusies atbilstošu flavonoīdu (piemēra, flavonu, kalkonu, izoflavonu) atpazīšanai. Piemēram, luteolīns ir nozīmīgs flavonoīds, kurš iesaistīts *Sinorhizobium meliloti nod* gēnu ekspresijā, bet genisteīnu atpazīst *B. japonicum*. Attiecīgi augu sakņu izdalījumos arī konstatēti dažādi fenolu grupas savienojumi, piemēram, flavoni un flavonols *Vicia faba*, izoflavonoīdi sojai, zemesriekstiem - vanilīns (Mandal, Chakraborty, Dey, 2010).

Gumiņu lielums arī ir saistīts ar to funkcionālo aktivitāti. Uzskata, ka smagāki gumiņi vairāk fiksē N_2, jo tajos ir vairāk bakteroīdu. Atmosfēras slāpekļa saistīšanas procesu katalizē nitrogenāzes komplekss, kuram nepieciešami 25 – 30 mol ATP uz katru molu fiksētā N_2. Tas izskaidro, kāpēc, sākot funkcionēt gumiņiem, nepieciešams pietiekošs auga nodrošinājums ar fosforu (Nap, Bisseling, 1990; Hirsch, 1992).

Gumiņu veidošanās atkarīga ne tikai no tieši ar gumiņu veidošanā iesaistīto gēnu aktivitātes, bet to ietekmē visa auga bioķīmiskā aktivitāte. Fitohormoniem, kuru sintēzi stimulē iekšēji vai ārēji faktori, ir spēcīga ietekme uz augu attīstību. Auksīns stimulē šūnu dalīšanos un regulē sakņu diferenciāciju. Apstrādājot augus ar auksīnu transporta inhibitoriem, uz dažu pākšaugu saknēm attīstās tukšas gumiņveidīgas struktūras (pseidogumiņi), piemēram, lucernai *Medicago sativa* L., *āboloņam Melilotus* sp.P.Mill.). LCO signāls ir atbildīgs par auksīnu transporta inhibēšanu gumiņa veidošanās procesā. Ārēja apstrāde ar LCO izraisa sarkanajam āboliņam auksīna transporta aizkavēšanu virzienā uz jaunākajām auga daļām. Ir konstatēta, ka auksīnu transportu var regulēt ar flavonoīdiem. Specifiski flavonoīdi, tādi kā formonortīns, akumulējas dažu šūnu vakuolās, paaugstinot auksīnu līmeni šūnās, kuras pakļautas dalīšanās procesam veidojoties gumiņam (Cooper, 2007).

Saimniekauga signālu atpazīšana un atbilde. Baktēriju hemotakse auga sakņu izdalījumu virzienā ir izšķirošs notikums pākšauga - gumiņbaktēriju mijiedarbībā. Daudzi auga sakņu izdalījumi darbojas kā baktēriju hemopievilinātāji. Konstatēta pozitīva baktēriju hemotakse uz cukuriem, aminoskābēm, dažādām dikarboksilskābēm, kā sukcināts, malāts, fumarāts un aromātiskajiem savienojumiem (Garg, Geetanjali, 2007). Baktērijas saistīšanās uz auga saknes virsmas ir nozīmīga, lai varētu veidoties ilgtermiņa mijiedarbība starp saimniekaugu un baktēriju. Augu lektīni (proteīni, kuri atgriezeniski saistās ar mono- vai oligosaharīdiem) ir kā receptori baktēriju eksopolisaharīdiem (EPS). Lektīni ir starpnieki, nosakot *Rhizobium* – pākšaugu simbiozi (Hirsch, 1999; De Hoff, Brill, Hirsch, 2009). Slāpekļa saistīšana var notikt tikai tad, ja augam un baktērijai ir izveidojušās noturīgas simbiotiskas attiecības. Gumiņbaktērijai jāiekļūst saimniekauga saknes vai stumbra mizā. Šādu divu neatkarīgu, brīvi dzīvojošu organismu simbiozes veidošanos nosaka atgriezeniska signālu darbība, ko dēvē par 'molekulāro dialogu'. Tas koriģē procesu fizioloģisko un metabolisko koordināciju starp abiem partneriem. Signāla uztveršana izmaina gēnu ekspresiju, kas izpaužas veidojot specifiskas, asociācijas veidošanai nepieciešamas, izmaiņas baktērijas fizioloģijā. Simbiotiskās asociācijas veidošanos ierosina mikromolāras vai nanomolāras flavonoīdu vai izoflavonoīdu koncentrācijas pākšaugu saknēs vai sēklu eksudātos. Šie savienojumi var sākotnēji asistēt rizosfēras kolonizācijai, darbojoties kā hemoatraktanti (Cooper, 2007; Gage, 2004). Augu sintezētie lektīni lokalizēti spurgaliņu galos un nodrošina saimniekauga specifiskumu, saistoties vienlaicīgi ar saharīdiem uz piemērotās baktērijas virsmas. Lektīnu nozīme specifiskuma nodrošināšanā pētīta vairāku autoru darbos, izmantojot transgēnos augus, kuri sintezēja arī savai sugai neraksturīgus lektīnus. Piemēram, transgēnā lucerna, kura sintezēja arī zirņiem raksturīgos lektīnus, veidoja gumiņus, kad bija inokulēta ar R. *leguminosarum* bv. *viciae,* sintezējot *Sinorhizobium meliloti* Nod faktoru (Gage, 2004).

Gumiņbaktēriju saistīšanās uz auga virsmas norit divos posmos. Pirmajā ntiek vāja un atgriezeniska saistīšanās, kuru nodrošināšina dažādi baktērijas polisaharīdi. *Sinorhizobium meliloti* sintezē ciklisko glikānu, kurš darbojās kā saistsavienojums ar saimniekauga polisaharīdiem vai lektīniem. (De Hoff, Brill, Hirsch, 2009). Otrajā posmā veidojas noturīgākas sasaistes. Procesam nepieciešama baktērijas celulozes sintēze, kura veido stingru, neatgriezenisku saiti baktērijas agregātam pie saimniekauga virsmas. Baktēriju saistīšanās uz sakņu virsmas un celulozi saturošā apvalka veidošana nodrošina baktērijām efektīvāku spurgaliņu kolonizēšanu un augsnē atvieglo konkurēšanu ar citām baktērijām par vietu uz auga saknes (Smit, Trudy, Longman et al., 1989; Gage, 2004).

Spurgaliņu liekšanās un infekcijas pavediena veidošanās. Saimniekauga sakņu spurgaliņu šūnu un baktērijas šūnas kontakts un specifiska saistīšanās ir nozīmīga inficēšanās un infekcijas pavediena veidošanās procesam. Veidojas lokalizēta saknes vieta ar *Nod* faktoru, kas nepieciešams, lai ierosinātu spurgaliņu saliekšanos un infekcijas pavediena veidošanos. Simbiotiskās attiecības sākas, kad baktērija kolonizē saknes virsmu un inducē spurgaliņu liekšanos. Spurgaliņu liekšanos inducē pakāpeniska reorientācija, kas nodrošina baktērijas iekļaušanu saliektajā spurgaliņā (Gage, 2004; Garg, Getanjani, 2007; Downie, 2014). Spurgaliņu liekšanās notiek tikai noteiktā saknes zonā. Pārējā saknes daļā spurgaliņas nemaina formu. Vienai spurgaliņai var piesaistīties vairākas baktērijas, no kurām visas neizraisa spurgaliņu liekšanos. Spurgaliņu liekšanās fenomens ir studēts vairākām augu sugām – lucernai, āboliņam, zirņiem, vīķiem. Noskaidrots, ka vispiemērotākās infekcijas procesa norisei ir tikko augšanu beigušās spurgaliņas. Vecākas spurgaliņas un vēl aktīvi augošās spurgaliņas ar polarizētu iekšējo uzbūvi ir mazāk jutīgas pret *Nod* faktoru inducēto liekšanos. Augšanu beigušās spurgaliņas ir morfoloģiski atšķirīgas no aktīvi augošajām (Gage, 2004). Spurgaliņu atsaucību uz *Nod* faktora inducēto liekšanos regulē arī auga hormoni, piemēram, etilēns. Tā sintēze izmaina auksīnu sintēzi saknēs, tādejādi veidojas auksīna gradients starp spurgaliņas galiem (Desbrosses, Stougaard, 2011).

Pēc spurgaliņu saliekšanās tajās veidojas infekcijas pavediens. Pirms infekcijas pavediens sasniedz saknes spurgaliņu pamatnes šūnas, vienlaicīgi pericikla un mizas šūnas aktivējas dalīšanās procesam. Mizas šūnas aktīvi dalās, veidojot gumiņu aizmetni, kur akumulējas liels skaits amiloplastu. Infekcijas pavediens, iekļūstot mizas šūnās, iniciē diferenciācijas procesu. Infekcijas pavedienā gumiņbaktērijas dalās, bet paliek ierobežotas ar auga šūnapvalku. Kad gumiņa aizmetnis attīstīsies par gumiņu, baktērija izkļūst no infekcijas pavediena gala ar endocitozi un diferencējas par bakteroīdu, kuru iekļauj peribakteroīda membrāna (Hirsch, 1992; Garg, Getanjani, 2007).

Bakteroīdu veidošanās simbiosomās. Veidojas jauna struktūra, tā sastāv no bakterioīdos pārtapušām baktērijām. No infekcijas pavediena izkļuvušās baktēriju šūnas nav tiešā saskarsmē ar auga šūnu citoplazmu, jo tās iekļauj auga šūnas sintezēta membrāna – bakteroīda membrāna. Šo veidojumu, kurā var būt vairāki bakteroīdi, sauc par simbiosomu, struktūru, kuru pielīdzina hloroplastiem un mitohondrijiem. Bakteroīdu diferencēšanās ir nozīmīga fizioloģiska pielāgošanās, ar noteiktu fermentatīvo nozīmi. Šādas struktūras veidošanās īpaši nozīmīga nitrogenāzes sintēzei. Indeterminantos gumiņos, atsevišķas simbiosomas var saplūst, tāpēc tipiska simbiosoma satur vairākus bakteroīdus. Baktērijas augšanas un infekcijas pavediena veidošanās laikā ir nodrošinātas ar oglekļa savienojumiem. Šāds rezerves barības vielu savienojums ir polihidroksilbutirāts (PHB), kurš akumulējas gumiņbaktērijas šūnās infekcijas pavedienā. (Hirsch, 1992; Bottomley, Myrold, 2007).

Simbiosomas membrāna nodrošina gan fizikālu robežu, gan metabolītu apmaiņu starp simbiontiem. Nobriedušās gumiņu šūnās simbiosomas membrānas sastāvs līdzinās plazmolemmai un tonoplastam. Simbiosomas membrāna paplašinās un pielāgojas bakteroīdu augšanai. Simbiosomas membrānas dalīšanās procesa laikā nepieciešams liels apjoms ar lipīdiem un proteīniem, jo gumiņš parasti sastāv no tūkstošiem bakteroīdu. Tāpēc simbiosomas membrānas bioģenēzei un inficēto augu šūnām ir nepieciešams aptuveni 30 reizes vairāk fotosintēzes produktu, salīdzinot ar plazmolemmas sintēzi (Day, Poole, Tyermanc et al., 2001; White, Prell, James et al., 2007). Baktroīdu novecošanās arī sākas ar izmaiņām simbiosomas membrānā (Puppo, Groten, Bastin et al., 2005).

Gumiņu funkcionēšana. Dažādām pākšaugu grupām var atšķirties gumiņu uzbūves un funkcionēšanas īpatnības. V*icieae* gumiņiem ir apikālā meristēma un raksturīga indeterminanta augšana. Gāzu apmaiņa ar augsnes atmosfēru notiek caur starpšūnu telpu visā gumiņa virsmā. Salīdzinājumam *Phaseoleae* gumiņos, kuriem ir determinantais augšanas veids, caur lenticelēm. Gumiņu spēja saistīt slāpekli ir ļoti atšķirīga. Jau gumiņbaktēriju darbības pētījumu sākumposmā konstatēja, ka uz saknēm var veidoties arī neefektīvi gumiņi. Šādos gumiņos neveidojas leghemoglobīns, un tie nesaista slāpekli, tomēr patērē auga

piegādātos oglekļa savienojumus (Sprent, 2008). Novērots, ka neefektīvie gumiņi bieži vien ir mazāki par efektīvajiem. Kā iemesls šādai atšķirībai tiek minētas augšanas regulatoru izmaiņas. Strādājot ar neefektīviem gumiņiem, kuru veidošanos inducējuši mutanti *Rh. leguminosarum* celmi, konstatēta straujāka citokinīnu līmeņa samazināšanās, salīdzinot ar efektīviem celmiem uz tās pašas šķirnes auga. Citokinīnu līmeņa samazināšanās korelēja ar mitotiskās aktivitātes pazeminināšanos gumiņa meristēmā. Līdz ar to veidojas mazāki gumiņi. (Newcomb, 1981). Efektīvajiem un neefektīvajiem gumiņiem konstatētas arī dažādas fizioloģiskas un bioķīmiskas atšķirības. (DeJong, Brewin, Johston et al., 1982; Poole, Hynes, Johnston, 2008).

Dažādu sugu augiem atšķiras maksimālās atmosfēras slāpekļa saistīšanas periods. Kā norāda Puppo (Puppo, Groten, Bastian et al., 2005), zirņiem slāpekļa saistīšanas maksimums parasti ir 3 nedēļas pēc gumiņa attīstīšanās, bet leghemoglobīna sistēmas degradācija sākas tikai ar 9 – 12 nedēļu. Gumiņu novecošanās zirņiem sākas līdz ar sēklu briešanu pākstī, tāpēc var samazināties slāpekļa piegāde sēklām. Gumiņu darbības laika pagarināšana līdz sēklu pilnīgai piebriešanai varētu būtiski palielināt N savienojumu koncentrāciju sēklās un augu atliekās, tomēr nav precīzi noskaidrota gumiņu novecošanās iniciācija.

Gumiņu pilnvērtīgai darbībai nozīmīga ir vielu apmaiņa starp bakteroīdiem un saimniekauga šūnām. Baktērijas un augu šūnas, iespējams, apmainās ar aminoskābēm, piemēram, augs nodrošina baktērijas ar glutamātu, tādējādi bakterioīdos tiek ierobežota amonjaka asimilācija, kurš aspartāta un alanīna veidā tiek nogādāts augam. Tas ļauj amoniju transportēt no baktērijām uz augu (Lodwig, Hosle, Bourdes et al., 2003). Vielu apmaiņas procesi starp augu un bakteroīdu regulē nodulīni. Izdala agrīnos un vēlos nodulīnus. Iedalījums pamatojas uz to, kad aktivizējas gēnu transkripti. Agrīnie nodulīna gēni lielā mērā nosaka gumiņu attīstības sākumu, un tie tiek aktivizēti saknēs stundu vai dienu laikā pēc gumiņbaktēriju iekļūšanas saknē. Vēlīnie nodulīna gēni tiek aktivizēti laikā, kad sākas N_2 saistīšana, un ietver C un N savienojumu vielmaiņas un struktūras komponentu izveidē iesaistīto fermentu aktivitātes nodrošināšanu (Verma, Hu, Zhang et al., 1992).

Gumiņu aktivitāti un darbības ilgumu ietekmē ne tikai auga un baktērijas ģenētiski noteiktais aktivitātes laiks, bet to var izmainīt arī vides faktori. Novecošanās zona veidojas un izplatās determinantajiem un indeterminantajiem gumiņiem atšķirīgi. Determinanto gumiņu novecošanās sākas no centra, pakāpeniski sasniedz perifēriju. Indeterminantajiem novecošanās sākas no pamatnes, līdz sasniedz meristēmu. Gumiņu priekšlaicīgu novecošanos var izraisīt augam nepietiekama apgaismojuma radītais stress. Izmēģinājumā ar balto lupīnu (*Lupinus albus* L.) pēc divām dienām tumsā nitrogenāzes aktivitāte samazinājās par 90%. (Matamoros, Baird, Escuredo et al., 1999; Hernandez-Jimenez, Lucas, de Felipe et al., 2002). Inhibējoša ietekme uz nitrogenāzes aktivitāti un gumiņu novecošanās paātrināšana konstatēta arī augiem, samazinot virszemes daļu apjomu (Vance, Heichel, Barnes et al., 1979), mēslojot ar nitrātu savienojumiem koncentrācijā virs 2 – 3 mM (Escuredo, Minchin, Gogorcena et al., 1996; Matamoros, Baird, Escuredo et al., 1999) un sausums (Gonzalez, Aparicio-Tejo, Gordon et al., 1998). Šie novērojumi liecina, ka šūnas un saknes signāli ir vieni no galvenajiem faktoriem, kas kontrolē gumiņu dzīves ilgumu. Līdzīgi kā auga lapās, novecošanās ir organizēts process, kas sākas ar agrīnām metabolisma procesa izmaiņām.

Atšķiras dažādu pākšaugu gumiņu veidošanās procesa reakcija uz nitrātu slāpekļa klātbūtni augsnē. Zirņiem un āboliņam 2.5 mM nitrāta koncentrācija augsnē inhibēja simbiotisko slāpekļa asimilāciju, bet pupām nitrātu klātbūtne agrīnās attīstības stadijās neinhibēja gumiņu veidošanos un slāpekļa asimilācijas aktivitāti (Silsbury, Catchpoole, Wallace, 1986). Tomēr ir dati, ka pupām nitrātu inhibējošā ietekme uz nitrogenāzes aktivitāti ir atkarīga no koncentrācijas. Neliela minerālā slāpekļa deva (līdz 8 mM) nitrogenāzes aktivitāti paaugstināja, pretstatā variantam bez slāpekļa, bet 16 un 32 mM koncentrācijai bija inhibējoša ietekme (Wahab, Abd-Alla, 1995).

Gumiņu darbību ietekmē arī šķīstošo slāpekļa savienojumu sadalījums starp auga daļām. Pētīta arī ziedpumpuru ietekme uz slāpekļa sadalījumu augā. Konstatēts, ka pupām un

zirņiem atšķirīgi mainās N_2 saistīšana ontoģenēzes laikā. Pupās N_2 saistīšanas kapacitāte saglabājas visu sēklu briešanas periodu. Tas liecina, ka gumiņiem nesamazinās pieejamā oglekļa daudzums. Turpretī zirņiem gumiņu aktivitāte samazinās jau ziedēšanas laikā. Slāpekļa koncentrācijas samazināšanās auga veģetatīvajās daļās ir konsekventi saistīta ar 'pašdestrukcijas' hipotēzi, ko izvirzījis Sinclair un Wits (Sinclair and DeWit, 1976), tas nozīmē, ka liela daļa no veģetatīvajās daļās esošo N savienojumu tiek transportēti uz briestošajām sēklām. Kaut arī šāds transports notiek galvenokārt no lapām, tas nesamazina fotosintēzes aktivitāti, jo gumiņi šajā laikā vēl darbojas intensīvi. Hormoni šajā laikā ir galvenais faktors, kurš regulē un nosaka fotosintēzes produktu sadalījumu starp gumiņiem un briestošajām sēklām. Precīzi regulējošie mehānismi vēl nav pilnībā noskaidroti, jo sarežģītā bioķīmiskā procesa norises nianses atšķiras dažādiem pākšaugiem. (Sutton, 1983).

Pētot gumiņu darbības efektivitāti joprojām, ir aktuāls jautājums, vai uz viena auga gumiņus veido tikai viens baktēriju celms, vai dažādi. Līdzīgi nav vienota viedokļa vai katrā gumiņā ir tikai viena baktēriju celma baktērijas. Attiecībā uz baktēriju celmu daudzveidību vienam augam, noskaidrots, ka, pārsvarā simbiozi ar vienu saimniekaugu veido vairāki baktēriju celmi, piemēram, āboliņam (*Trifolium repens*) vienam augam konstatēti vidēji 11 baktēriju celmi. Līdzīgi arī zirņiem konstatēti vairāki baktēriju celmi uz viena auga. Novērots, ka arī vienā gumiņā iespējams konstatēt divus baktēriju celmus. Pētot gumiņus uz sojas saknēm, konstatēja, ka 12 – 32% analizēto gumiņu bija divi baktēriju celmi (Hirsh, 1992).

Nitrogenāzes darbība. Nitrogenāze ir fermentu komplekss tauriņziežu gumiņu bakterioīdos, kurš reducē molekulāro slāpekli līdz amonija jonam. Nitrogenāzes kompleksa struktūra dažādiem slāpekli saistošajiem organismiem ir konstanta. Tas ir komplekss ar vairākām subvienībām, kuru kodē *nif*H un *nif*DK gēni (Jason, Graham, Philip, 2012). Veido divi proteīni – Fe proteīns (molmasa apmēram 60 kDa) un MoFe proteīns (molmasa apmēram 200kDa). Abiem proteīniem ir atšķirīgas funkcijas. Slāpekļa reducēšanai ir trīs pamatprasības:

1. nepieciešams reducētājs ar zemu *redox* potenciālu (apmēram 430 eV). Tāds bakteroīdos ir ferredoksīns, kurš dod elektronu tieši nitrogenāzes reduktāzei (Carter, Rawlings, Orme-Johnson et al., 1980);
2. nepieciešama enerģija bioķīmisko reakciju veikšanai. Katra N_2 reducēšana patērē 12 – 30 ATP molekulas. ATP veidojas oksidatīvās fosforilācijas procesā bakteroīdos;
3. nitrogenāžu aktīvā kompleksa veidošanās, kā rezultātā elektronu plūsma N_2 reducē līdz NH_3 (Poole, Hynes, Johnston et al., 2008).

Bakteroīdu apgāde ar skābekli un oglekļa savienojumiem ir nozīmīga nitrogenāzes kompleksa pilnvērtīgai darbībai. Skābeklis nepieciešams ATP sintēzei, bet var inaktivēt nitrogenāzes darbību, tāpēc leghemoglobīnam jānodrošina skābekļa plūsmas līmenis Oglekļa savienojumu galvenā plūsma ir fotosintēzes produkti no auga lapām. Oglekļa savienojumus izmanto saimniekauga un bakteroīdu elpošanai. (Sprent, 2007).

1.2.2.3. Abiotisko vides faktoru ietekme uz gumiņu funkcionēšanu

Gumiņu veidošanās laiks uz pākšaugu saknēm ir nozīmīgs posms, kurš nosaka simbiotiskās sistēmas darbības sākumu un ilgumu. Galarezultātā mainās arī saistītā slāpekļa apjoms, kas ir tieši saistīts ar ražas apjomu un kvalitāti. Zināms, ka starp gumiņu veidošanos un atmosfēras N_2 saistīšanu ir neliels laika intervāls, kurš nepieciešams visas N_2 atmosfēras saistīšanas sistēmas izveidei. Jo ātrāk izveidojas gumiņi, jo ātrāk sāk darboties slāpekļa reducēšanas sistēma (Воробьев, 1998). N_2 saistīšanas procesa apmērs ir atkarīgs ne tikai no konkrētā kultūrauga ģenētiski noteiktās spējas veidot pilnvērtīgu simbiozi ar mikroorganismiem, bet arī no virknes vides faktoriem. Dažādu ekoloģisko faktoru ietekme uz gumiņu veidošanos un darbības efektivitāti pētīta līdz ar paša simbiozes mehānisma izzināšanu, kaut gan daudzajiem faktoriem veltīta atšķirīga pētnieku uzmanība. Literatūrā ir

dati par dažādiem pētījumiem, lai skaidrotu atmosfēras slāpekļa saistīšanas intensitāti kultūraugos, atšķirīgos agroekoloģiskajos apstākļos. Plašāk pētītie faktori:
– minerālelementu nodrošinājuma un papildmēslojuma ietekme,
– augsnes mitrums,
– augsnes pH,
– temperatūra sējas un dīgšanas laikā.

Pirmie gumiņi parādās aptuveni divas nedēļas pēc sēklu dīgšanas. Augstākais slāpekļa fiksēšanas līmenis konstatēts pēc ziedēšanas. Kad pākstis un sēklas kļūst par aktīviem asimilātu un saistītā slāpekļa patērētājiem. Attiecīgi fiksētā slāpekļa daudzumu var palielināt, nodrošinot optimālus agrotehniskos pasākumus, kas rezultātā dod augstu sēklu ražu. Kā nozīmīgākie agrotehniskie pasākumi ir minēti pareiza, vietai atbilstoša šķirne, optimāls sejas laiks (Schulz, Keatinge, Wells, 1999), optimāla sējas biezība, pietiekams ūdens daudzums augsnē. Kā vieni no limitējošajiem barības elementiem tiek uzskatīti fosfors un molibdēns, kuru trūkums inhibē efektīvu simbiotiskās sistēmas darbību (Carranca, Torres, Madeira, 2015). Pākšaugu minerālo barošanos un augu augšanu būtiski var ietekmēt simbiotisko asociāciju veidošana ar gumiņbaktērijām. Tāpēc vides faktoriem jābūt piemērotiem kā augu, tā mikroorganismu darbībai. Optimālie pupu audzēšanas apstākļi ir atbilstoši arī gumiņbaktēriju izdzīvošanai. Pupām, salīdzinot ar dažiem citiem tauriņziežiem, vairumā gadījumu augsnē jau ir piemēroti *Rhizobium leguminosarum* baktēriju celmi. Tāpēc dažkārt laukos ar ilgstošu pupu 'audzēšanas vēsturi' papildus inokulācija būtisku ražas pieaugumu nedod. Sēklu inokulācija ar gumiņbaktērijām būtisku ražas pieaugumu dod, ja augus audzē laukā, kur tie iepriekš nav auguši. (Kessel, Hartley, 2000).

Skaidrota arī fotosintēzes ietekme uz procesu intensitāti gumiņos, pētīta gaismas intensitātes un dienas garuma ietekme. Fotosintēzes procesa kvalitāte ietekmē ogļihidrātu apjomu, ko augi spēj piegādāt simbiontiem (Mahon 1977; Eckart, Raguse, 1980), kā arī temperatūras izmaiņu diennakts laikā ietekme (Schweitzer, Harper, 1980; Rainbird, Hitz, Hardy, 1984).

Minerālās barošanās jautājumi tiek risināti nepārtraukti, tomēr joprojām ir pretrunīgi rezultāti un diskutabli skaidrojumi. Gumiņbaktērijām gumiņā ir endotrofais simbiozes veids, tāpēc tās ir atkarīgas no saimniekauga piegādātajiem oglekli saturošajiem savienojumiem, kā arī minerālelementiem. Visvairāk pētītais minerālelements nenoliedzami ir slāpeklis, tā dažādo formu un koncentrāciju stimulējošā un inhibējošā darbība. Slāpeklis ir viens no galvenajiem minerālelementiem, kura klātbūtne būtiski ietekmē gumiņbaktēriju iekļūšanu auga saknē un atmosfēras N_2 saistīšanas efektivitāti. Vidē ar augstu šķīstošo slāpekļa savienojumu koncentrāciju dīgļsaknes inficēšanās ar gumiņbaktērijām aizkavējas līdz brīdim, kamēr ir izlietotas slāpekļa rezerves. Pētot gumiņu veidošanās ātrumu uz sojas un lupīnas saknēm, konstatēts, ka procesa intensitāte ir apgriezti proporcionāla pieejamā slāpekļa daudzumam. Gumiņu veidošanās aizkavēšanās var būt līdz pat ziedēšanas sākumam. Pākšaugi turpretī ir pielāgoti gan autotrofajam, tā arī simbiotrofajam barošanās veidam. Atkarībā no pākšauga sugas un augšanas apstākļiem, dažādu slāpekļa savienojumu izmantošanas attiecība svārstās plašā diapazonā. Tā izmēģinājumā ar lucernu un pupām noskaidrojās, ka, audzējot smiltī ar dažādām slāpekļa normām (0.1, 0.25, 0.50, 1.0), saistītā atmosfēras slāpekļa daudzums lucernai samazinājās attiecīgi par 89, 80, 42 un 19%, bet pupām – 90, 79, 56 un 8% (Гукова, 1970). Noskaidrots, ka būtiska nozīme ir mēslojumā lietotajai slāpekļa formai. Izmēģinājumos ar lucernu konstatēts, ka slāpekļa mēslojums amonija formā (lietotā deva no 0.5 – 12 mg kg^{-1}) veicināja gumiņu veidošanos, bet nitrātu formā inhibēja (Жизневская, 1972).

Pretrunīgi dati ir par mēslojuma starta devas ietekmi uz pākšaugu augšanu un ražas veidošanos. Ja augsnē pieejamā slāpekļa starta deva ir zema, tad 'N bada' periods var samazināt, gumiņu veidošanos, N_2 saistīšanu un ražu. Šajā attīstības posmā sakņu sistēma vēl nav labi izveidota, bet gumiņu veidošanās un N_2 saistīšana vēl tikai veidojas. Slāpekļa mēslojuma starta deva uzreiz pēc sadīgšanas novērš slāpekļa trūkuma pazīmes agrīnajās

attīstības stadijās (Kessel, Hartley, 2000). Nepieciešamā slāpekļa mēslojuma starta deva dažādām pākšaugu sugām, kā arī sākotnējā slāpekļa daudzuma augsnē ir atšķirīga. Diemžēl daudzos pētījumos par slāpekļa mēslojuma starta devu nav ziņas par augsnē esošo slāpekļa līmeni. Tādejādi nav iespējams aprēķināt augam pieejamo slāpekļa daudzumu dīgšanas laikā, bet iegūtie rezultāti ne vienmēr parāda būtiski pozitīvu starta devas ietekmi. Čens ar līdzautoriem (Chen, MacKenzie, Fabnous, 1992) un Starlings (Starling, Wood, Weaver, 1998) analizēja dažādu starta devu efektu uz sojas sēklu ražu augsnē ar zemu slāpekļa līmeni (attiecīgi 51 kg N ha^{-1}; un 20 kg N ha^{-1}). Čens, lietojot dažādas slāpekļa starta devas (0.45; 90 un 180 kg N ha^{-1}), konstatēja, ka mēslojuma lietošana samazināja gumiņu veidošanos, bet uzlaboja sojas augšanu variantos, kur augsnes nodrošinājums ar N bija zems. Savukārt Starlinga iegūtie rezultāti parādīja, ka N starta devas (50 kg ha^{-1}) lietošana samazināja gumiņu skaitu uz saknēm, bet palielināja N koncentrāciju augā un sausnas saturu ražā, bet sēklu raža palielinājās vidēji par 0.15 Mg ha^{-1}. George un Singletons (George, Singleton, 1992), izmantojot iezīmēto slāpekļa atomu (^{15}N), konstatējuši, ka pupiņas divreiz efektīvāk akumulē minerālo slāpekli nekā soja. Turklāt agrā prasība pēc slāpekļa tiek izpildīta, palielinot minerālā slāpekļa uzņemšanu, tāpēc pieejamā slāpekļa daudzums lauciņos, kur auga pupiņas bija zemāks nekā lauciņos ar soju. Pupiņām ir labāk izveidota sakņu sistēma, tāpēc tās var daudz intensīvāk saistīt nepieciešamās barības vielas, spēj saistīt vairāk slāpekļa uz saknes masas vienību. Ģenētiski noteiktā atšķirīgā sakņu biomasa nosaka spēju intensīvāk saistīt slāpekli un veidot lielāku ražu.

Diskutabls ir jautājums par minerālā slāpekļa papildmēslošanu un laiku, kad to veikt. Veģetācijas traukos audzējot soju, iegūti rezultāti, ka, pirms sējas dodot slāpekļa mēslojumu, augi veidoja lielāku veģetatīvo masu un gumiņbaktēriju darbība netika aizkavēta. Turpretī pumpurošanās laikā dotais slāpeklis izraisīja gumiņbaktēriju darbības samazināšanu un gumiņu straujāku novecošanos. Pretēji rezultāti iegūti analizējot slāpekļa papildmēslojumu zirņiem, kur noskaidrojās, ka vēlākās attīstības fāzēs dotais mēslojums neaizkavēja atmosfēras slāpekļa saistīšanu. Pastāv viedoklis, ka nitrāti inhibējoši darbojas uz auksīnu tipa fitohormoniem, tādejādi nenotiek spurgaliņu saliekšanās inficēšanās procesa gaitā (Гукова, 1970; Schilling, et al., 2006).

Gumiņu veidošanās ātrums un nitrogenāzes aktivizēšanās ir atšķirīga dažādu tauriņziežu saknēm – zirņiem un lupīnai 6 – 9 dienas, vīķiem, pupām un sojai 9 – 14 dienas, āboliņam 20 – 34 dienas, bet lucernai 23 – 38 dienas. Inokulētās pupas pēc dīgšanas aug lēni un parasti jūt slāpekļa trūkumu, tomēr relatīvi lielās sēklas kādu laiku var uzturēt augšanu. Konstatēts, ka sākotnēji, aptuveni līdz 30 – 50 dienām pēc sēšanas, saglabājas zema nitrogenāzes aktivitāte. Tāpēc rekomendē lietot nelielas slāpekļa starta devas (5 – 10 kg N ha^{-1}), lai veicinātu augšanu un gumiņu veidošanos, īpaši ja augsnē ir zema nitrātu (NO_3^-) koncentrācija. Starta devas lietošanas lietderība un ietekme uz pākšaugu augšanu un ražas veidošanos tiek apskatīta virknē pētījumu, tomēr nav viennozīmīga viedokļa. Ja pupas inokulē ar efektīvu baktēriju celmu, augs var sinhronizēt slāpekļa rezervju izmantošanu no sēklas ar slāpekļa saistīšanas spēju, tāpēc nav nepieciešams lietot papildus minerālo slāpekli kā starta devu (Hardarson, Atkins, 2003; Terpolilli, Hood, Poole, 2012).

Pētnieki uzmanība pievērš arī citu minerālelementu, sevišķi molibdēna, dzelzs un fosfora nodrošinājuma ietekmei uz slāpekļa saistīšanu. Fosfora koncentrācija gumiņos, aktīvas nitrogenāzes darbības laikā, pārsniedz fosfora koncentrāciju auga saknes šūnās. Tāpēc augsnē ar mazu šķīstošā fosfora koncentrāciju, fosfora papildmēslojums labvēlīgi ietekmē gumiņu darbību (Zahran, 1999). Palielinot fosfora devas no 100 mg kg^{-1} augsnes līdz 400 mg kg^{-1} āboliņam (*Trifolium vesiculosum*) nitrogenāzes aktivitāte dubultojās (Lynd, Hanlon, Odell, 1984). Fosforam nav konstatēta inhibējoša iedarbība uz gumiņu veidošanos, kā tas ir slāpekļa mēslojumam. Novērots, ka fosfora trūkuma gadījumā var veidoties mazāki gumiņi, tie nekoncentrējas uz galvenās saknes, bet izkaisīti pa visu sakņu sistēmu (Гукова, 1970). Vairāku autoru darbos (Lynd, Hanlon, Odell, 1984; Ayub, Nadeem, Naeem et al., 2012;)

norādīts, ka gumiņu nodrošinājums ar kāliju jāskata saistībā ar fosfora nodrošinājumu. Kālija trūkums ietekmē bioķīmisko reakciju norisi gumiņā.

Tā kā intensīvas atmosfēras slāpekļa saistīšanas procesā bakteroīdiem nepieciešams saņemt no auga arī pietiekošā daudzumā fotosintēzes procesā sintezētos oglekļa savienojumus, tad virknē darbu (Mahon, 1977; Eckart, Rauguse, 1980; Schweutzer, Harper, 1980; Rainbird, Hitz, Hardy, 1983; Layzell Rochman, Canvin, 1984; O'Hara, Boonkerd, Dilworth, 1988) pētīta arī fotosintēzes intensitātes izmaiņu ietekme uz gumiņu darbības intensitātes dinamiku gan minerālelementu nodrošinājuma, gan temperatūras un gaismas intensitātes ietekmē.

Augsnes temperatūra mērenā klimata un subtropu zonā tiek pētīta ar atšķirīgu intensitāti. Intensīvāki pētījumi tiek veikti dienvidu reģionos, kur paaugstinātatemperatūra bieži vien ir vienlaicīgi ar nepietiekošu mitrumu pupu un baktēriju simbiozes veidošanai. Mazāk pētījumu ir par zemas temperatūras ietekmi (Bordeleau, Prevost, 1994; Zahran, 1999). Viens no svarīgākajiem faktoriem lauka pupu audzēšanā ir atbilstoša gaisa temperatūra. Lai gan tiek uzskatīts, ka lauka pupas ir visaukstumizturīgākās, salīdzinājumā ar pārējām tauriņziežu sugām, tomēr arī tam ir svarīgas optimālās gaisa temperatūras sējas, ziedēšanas un pākšu veidošanās laikā. Pupām ieteicams ir agrs sējums, taču jāpievērš uzmanība augsnes temperatūrai. Vairākos literatūras avotos teikts, ka augsnes temperatūra pupu dīgšanai ir +5 °C. Atkarībā no augsnes siltuma un mitruma pupas sadīgst 7 līdz 15 dienu laikā. Lauka pupu dīgsti pacieš salnas no -4 līdz -6 °C, bet minimālā temperatūra veģetatīvo orgānu veidošanās un normālas augšanas uzsākšanai ir 5 – 6 °C. Optimālā temperatūra veģetatīvo orgānu veidošanās periodā ir 12 – 16 °C, bet optimālā temperatūra ražas veidošanās periodā 16 – 22 °C (Rowland, Gusta, 1977). Izmēģinājumos, diedzējot atšķirīga mitruma sēklas dažādās temperatūrās (5, 10, 15 °C), novēroja, ka 5 un 10 °C temperatūrā labāk dīga sēklas ar 14 % mitrumu, tomēr bija atšķirības starp šķirnēm. Dīgstu masa un sausna zemāka bija augiem 5 °C, salīdzinot ar 10 un 15 °C (Rowland, 1980).

Salīdzinot gumiņu veidošanās ātrumu zirņiem un lauka pupām temperatūras diapazonā no +4 °C līdz +30 °C, noskaidrojās, ka gumiņi veidojās visā temperatūras diapazonā, bet būtiski atšķīrās to izveidošanās laiks un skaits. Pazeminoties temperatūrai rizosfēras zonā, gumiņu veidošanās notika lēnāk, tie parādījās vēlākā auga attīstības fāzē. Uz zirņu un pupu saknēm 18 – 22 °C temperatūrā gumiņi bija konstatējami 13 – 14 dienas pēc sējas divu īsto lapu stadijā, 10 – 12 °C temperatūrā gumiņus konstatēja 25 – 27 dienas pēc sējas, bet 5 – 7 °C temperatūrā gumiņi parādījās tikai pēc 26 – 42 dienām, kad augiem bija izveidojušās 3 – 4, vai pat 6 īstās lapas. Īpaši augu augšana un gumiņu veidošanās bija aizkavēta 4 – 5 °C temperatūrā. Šajā temperatūrā zirņiem gumiņi izveidojās pēc 48 dienām, bet pupām tikai 61 dienā (Воробьев, 1998).

Novērots, ka slāpekļa starta devas efekts var būt atkarīgs no augsnes temperatūras. Izmēģinājumos ar zirņiem un lupīnām novērots, ka, agri sējot, neiesilušā augsnē, lietojot nelielu slāpekļa starta devu (līdz 15 kg ha^{-1}) par 7 dienām paātrinājās gumiņu veidošanās, bet deva 60 kg ha^{-1} aizkavēja gumiņu veidošanos. Iesilušā augsnē zema starta deva būtiski neietekmēja, bet augstākā deva aizkavēja gumiņu veidošanos (Sprent, Thomas, 1984; Воробьев, 1998). Lēno gumiņu veidošanās sākumu pupām saista ar inhibitoru klātbūtni dīgļlapās, jo izmēģinājumā ar pupu šķirni 'Fiord' 18. dienā pēc sadīgšanas, atdalot dīgļlapas, palielinājās nitrogenāzes aktivitāte kā arī palielinājās gumiņu skaits uz auga. Par šādu, auga sintezētu, inhibitoru tiek uzskatīta abscisskābe (ABS). Dīgstam atdalot abas dīgļlapas, notika augšanas inhibēšana, bet, atdalot vienu, augšanas inhibēšanu nenovēroja, bet tika veicināta gumiņu veidošanās (Phillips, 1971).

Augsnes ūdens režīms ir nozīmīgs faktors, kurš ietekmē ne tikai gumiņu veidošanos, bet visa auga augšanu. Konstatēts, ka neatbilstošs ūdens režīms vairāk izpaužas, ja sēklas dīgst pazeminātā temperatūrā (5 – 10 °C), salīdzinot ar 15 – 20 °C. (Воробьев, 1998; Bordeleau, Prevost, 1994). Augsnes mitrums ir nozīmīgs faktors, audzējot tauriņziežus ar sēklu inokulāciju. Gumiņbaktērijām optimālais augsnes mitrums ir 60 – 70% robežās no

pilnas augsnes ūdens ietilpības. Sausā augsnē gumiņbaktērijas var neveidot simbiozi, vai izveidojušies gumiņi priekšlaicīgi noveco (Bordeleau, Prevost, 1994)

Būtisks vides faktors pupu augšanai un attīstībai ir mitrums kritiskajos augšanas un ražas veidošanās periodos. Lai gan pupas ir plaši audzēts kultūraugs arī dienvidu reģionos, kur sausuma periodi ir raksturīgi, pupas ir mitrumprasīgs augs. Pupu sēklām ir biezs apvalks, tāpēc nodrošinājums ar ūdeni ir nozīmīgs jau dīgšanas laikā. Lai uzlabotu augu iespējamo apgādi ar ūdeni, ir pētījumi, kur ieteikts mainīt sējumu biezību. Samazinot augu skaitu uz kvadrātmetra no 40 uz 20 augiem, uzlabojās nodrošinājums ar ūdeni un lapu laukuma indekss (Dantun, Grashoff, 1984).

Augsnes pH ietekmē ne tikai pākšaugu minerālās barošanās apstākļus, bet arī gumiņbaktēriju aktivitāti un inokulācijai izmantoto baktēriju dzīvotspēju. Vairumam gumiņbaktēriju optimālais augsnes pH ir 6.5 – 7.5, bet augšana apstājas vai ir aizkavēta kā skābā augsnē (pH 4.5 – 5.0), tā arī sārmainā (pH 8). Skāba augsne ir piemērota tikai atsevišķām gumiņbaktēriju sugām, piemēram, lupīnu inokulējošajām *Rhizobium lupini Rhizobium leguminosarum* populācijas blīvums skābā augsnē strauji samazinās. Tāpēc veidojas nepieciešamība biežāk sēt inokulētas sēklas (Slattery, Pearce, Slattery, 2004; Graham, 2008).

Augsnes apstrāde. Lauksaimniecībā izmantotajās augsnēs papildus ietekmējošais faktors ir lietotie agrotehniskie pasākumi, īpaši augsnes apstrāde. Tā izmaina augsnes struktūru, skābekļa un ūdens daudzumu augsnē, tas savukārt izmaina mikroorganismu aktivitāti un savstarpējo mijiedarbību. Labvēlīga mikroorganismu mijiedarbība ir sevišķi nozīmīga, veidojoties simbiotiskajām asociācijām. Augsnes apstrāde var stimulēt saprofīto mikroorganismu aktivitāti, bet, piemēram, negatīvi ietekmēt to mikorizas sēņu izplatību, kuru hifu fragmenti pēc to sadalīšanas neveido jaunas propagules, piemēram, *Gigaspora sp.*. Pētījumos ar kukurūzu (*Zea mays* L.) un kviešiem (*Triticum aestivum* L.) apstrādātā un neapstrādātā augsnē novēroja, ka, izjaucot augsnes sakārtu, ir traucēta gan sakņu kolonizācija, gan fosfora uzņemšana. Augsnes sakārtas jaukšana negatīvi ietekmē ārējā micēlija attīstību, tātad arī potenciāla inokulācijas materiāla samazināšanos agroekosistēmā. Antunes (Antunes, Goss, 2005) izteica hipotēzi, ka ātrāka un plaša VAM kolonizācija notiek augsnē ar neizjauktu sakārtu, kas pākšaugu saknēs var labvēlīgi ietekmēt arī gumiņbaktēriju iedzīvošanos. Novēroja, ka agrāku gumiņu veidošanos sojai veicināja sakņu kolonizācija ar mikorizas sēnēm, kas rezultātā paaugstināja N_2 fiksāciju. Gatavības stadijā salīdzinot augos no atmosfēras saistīto slāpekļa daudzumu, secināts, ka apstrādātajā augsnē tas bija 12%, bet neapstrādātajā 32%. Tā kā augsnes sakārtas sajaukšana intensificē organiskā N mineralizāciju, tad tiek aizkavēta simbiotiskā N_2 saistīšana. Tajā pašā laikā nenovēroja atšķirību starp no augsnes uzņemtā slāpekļa daudzumu. Šie izmēģinājumi apliecināja, ka dabīgi augsnē esošo VAM mikorizas sēņu iesaistīšanos trīspusējā simbiozē ar gumiņbaktērijām un soju var ietekmēt arī augsnes apstrādes veids.

1.2.3. Mikorizas sēņu un augu simbioze

Vairāk nekā 450 milj. gadus vecajās simbiotiskajās asociācijās – mikorizas sēnes veido obligātu simbiozi ar augstākajiem augiem, iemainot minerālelementus no augsnes pret saimniekauga fotosintēzes procesā sintezētajiem oglekļa savienojumiem. Mikoriza ir viena no plašāk sastopamajiem simbiozes veidiem, kas nodrošina globāli nozīmīgu barības vielu pārvietošanu starp augsni un augiem (Heijden van der, Scheublin, 2008).

Terminu mikoriza (ar nozīmi sēņu sakne) ieviesa Franks 1885. gadā (Brundrett, 2004), kurš bija pārliecināts, ka šādu asociāciju nosaka abu organismu vajadzība pēc barības vielām. Jaunākas definīcijas raksturo mikorizu, kā asociāciju starp sēņu hifām un augstāko augu orgāniem, kuru iesaistīti vielu uzņemšanā no augsnes (Read, Duckett, Francis et al., 2000). Mikorizu nevar universāli apzīmēt kā mutuālistisku, piemēram, miko-heterotrofo augu

gadījumā sēnes ieguvums nav līdzvērtīgs auga ieguvumam. Mutuālistiskās attiecības ietver plašu spektru tiešu un netiešu, simbiotisku vai nesimbiotisku asociāciju, daudzas no kurām darbojas sarežģītāk nevis tikai ar barības vielu pārvietošanu. (Boucher, James, Keeler, 1982).

Sēnes un auga simbiozei var būt dažāds ciešums, bet visās asociācijās sēnes ir kontaktā ar dzīvu saimnieku, no kura tās dažādos veidos saņem vai nu metabolītus, vai barības vielas (Cook, 1977). Tomēr šī definīcija izslēdz miko-heterotrofo augu asociācijas, kurās sēne augu pilnībā apgādā ar barības vielām. Tikai simbiozes plašākā definīcija (divu vai vairāku organismu kopējā dzīve) universāli attiecas uz mikorizas asociācijām (Smith, Read, 2008).

Jebkurš augs, kurā ir sēne, var būt 'saimnieks', neskatoties uz to, vai attiecības ir labvēlīgas, vai nē. Tomēr augs nevar pilnībā "kontrolēt situāciju", sēne var ietekmēt auga bioķīmiskos procesus. Mikorizas sēnes nevar saukt par endofītiem, jo tiem nav mikorizas sēnēm raksturīgās saknē lokalizētās hifas, nav sinhronizētas auga – sēnes attīstības, kā arī augs netiek papildus apgādāts ar barības vielām. Tomēr arī šādas attiecības var būt labvēlīgas augam, ja sēne paaugstina auga izturību pret patogēniem vai stresu, lietojot kādu citu mehānismu. Raksturojot mikorizas sēņu aktivitāti un darbību, piemērotāks ir termins kolonizācija, nevis inficēšana, kas ir atbilstošāks patogēno sēņu darbībai (Brundrett, Bougher, Dell et al, 1996; Smith, Smith, 1997)

1.2.3.1. Mikorizas veidi un izplatība

Padziļinot pētījumus, mikorizas atšķir no citām sēņu – augu asociācijām, jo tās veido ciešas specifiskas struktūras, kuras nodrošina vielu apmaiņu starp dzīvām šūnām. Vairums mikorizu veidojas saknēs, bet tās var veidoties noteiktām augu sugām arī apakšzemes stumbros un briofītu laponī (Read, Duckett,Francis et al., 2000). Patogēnās sēnes arī veido ciešas asociācijas ar augu, bet atšķirībā no mikorizas, tās nenodrošina barības vielu piegādi augam, ir kaitīgas saimniekaugam, kas izpaužas, parādoties dažādiem slimību simptomiem. Patogēnās sēnes nav specializējušās barības vielu piegādei (Brundrett, 2002).

Visas mikorizu asociācijas ir simbiotiskas, bet ne visas mutuālistiskas. Mijiedarbojoties ar augu, mikorizas sēnes veido dažādas morfoloģiskas struktūras, kuru uzbūve un izvietojums ir mikorizu iedalījuma pamatā. Sākotnēji mikorizas dalīja trīs grupās - endomikorizas, ektomikorizas un ektendomikorizas, pamatojoties uz sēnes novietojumu sakņu sistēmā. Pilnveidojoties pētījumu metodēm, ir iespējams pilnvērtīgāk novērtēt visas veidotās struktūras, tāpēc jaunākajā literatūrā **izdalīti septiņi mikorizas veidi** – arbuskulārā, ekto, ektendo, arbutoīdā, monotropoīdā, erikoīdā un orhideju mikoriza. Atsevišķi nodalīja erikoīdo un orhideju mikorizu, kuras veidojas specifiskām augu grupām, piemēram, *Orchidaceae* vai *Ericales*, kas ir nesaistīti endomikorizas veidi ar specifiskās anatomiskām struktūrām un saimniekaugiem (Smith, Read, 2008).

Arbuskulārā (AM) un ektomikoriza (EKM) atšķiras strukturāli un ar asociācijā iesaistītajām augu un sēņu sugām. AM gadījumā sēne iekļūst auga saknē, kamēr EKM gadījumā sēnes iekļūst tikai nedaudz saknes mizā. AM ir plašāk izplatītais mikorizas asociāciju veids. Vairums mikorizu asociāciju ir labvēlīgas gan augam, gan sēnei. Šāda sabalansēta simbioze ir dinamisks process, veidojoties un noritot vielu apmaiņai starp simbiozes partneriem. Saskarsmes "izmaksu" un "ieguvumu" attiecība nosaka izveidotās asociācijas stabilitāti (Brundrett, 2002). Arbuskulārās mikorizas (AM) sēnes veido simbiozi ar daudzām zemāko un augstāko augu sugām. Šo mikorizu simbiozes veidu definē pēc arbuskulu iespējamās klātbūtnes. Nav vienota viedokļa par šī mikorizas tipa nosaukumu. Viedokļi dalās starp terminiem - arbuskulārā mikoriza (AM) un vezikulāri-arbuskulārā mikoriza (VAM). Dominē uzskats, ka piemērotāks nosaukums ir arbuskulārā mikoriza, jo dažas *Glomeromycota* sēnes neveido vezikulas, tomēr arī arbuskulu klātbūtne nav vienmēr konstatējama (Brundrett 2004).

Anatomisko struktūru novērtēšanu lieto, kā galveno parametru mikorizu iedalījumam, jo auga fizioloģisko parametru un mikorizas kolonizācijas pakāpes saistība daudzos gadījumos nav precīzi zināma. Mikorizas kategorijas noteikšanā lietotos strukturālos parametrus ietekmē saimniekauga īpašības, sēnes vai abu partneru mijiedarbība. Primāri lieto pazīmes, ko nosaka auga īpašības, jo sēnes kontrolētās pazīmes mēdz būt diezgan variablas pat viena auga robežās. Piemēram, iespējams atrast daudzus sēnes morfotipus vienā saknē un vienam saimniekaugam var būt vairāki EKM morfotipi no konkrētām sēnēm. Divas galvenās EKM un VAM asociāciju kategorijas veidojas ar konkrētām augu sugām, ko nosaka ģenētiski determinētas sakņu uzbūves īpatnības. (Brundrett, 2002; 2004.)

Literatūrā ir informācija par dažādu augu patogēno sēņu (*Phytophthora, Gaeumannomyces, Fusarium, Chalara (Thielaviopsis), Pythium, Rhizoctonia, Sclerotium)* izraisīto simptomu samazināšanos mikorizētiem augiem. Tas nenozīmē, ka jebkurā situācijā mikorizas asociācijas veidošanās ierobežo patogēnu aktivitāti, bet AM inducē rezistences paaugstināšanos vai uzņēmības pazeminināšanos, ja mikorizas simbioze intensīvi veidojas pirms patogēnu darbības (Azcón-Aguilar, Barea, 1996).

Mikorizas sēņu darbība ietekmē dažādus auga fizioloģiskos procesus: apputeksnēšanos (Cahill et al., 2008), uzlabo ūdens uzņemšanu un aizturi augā (Augé 2001; Verbruggen, Kiers, 2010). Saimniekauga – sēnes mijiedarbības diapazonu var ietekmēt gan saimniekauga atkarības pakāpe no mikorizas sēnes, gan augsnes apstākļi. Sēnes hifu inducētas aizsargreakcijas veidošanos saknē var konstatēt gan AM, gan EKM veidošanās gadījumos. Augu saknēs var konstatēt fermentu aktivitātes izmaiņas, piemēram, hitināzes un peroksidāzes. Aizsargreakciju veidošanās var būt atkarīga arī no sēnes un auga saderības. Ir viedoklis, ka aizsargreakciju veidošanās ne tikai paņem barības vielas no saimniekauga, bet var paaugstināt rezistenci pret patogēnu invāziju (Brundrett, 2004).

Atmirušās sēnes ir nozīmīgs glomeromicēšu sēņu inokulāta avots, kuras var kā endofīti dzīvajās saknēs saglabāties pat 10 gadus pēc tam, kad arbuskuli ir sabrukuši. Šādas struktūras ir nozīmīgs inokulāta avots pēcaugiem. Mikorizas sēnēm ir arī nekrotrofā fāze, kad saimniekauga saknes atmirst, nodrošinot sēnei pirmo rezervi ar barības vielām, kuras var tikt pārvietotas ar hifām uz citu augu (Eason, Newman, Chuba, 1991; Brundrett, 2004).

1.2.3.2. Arbuskulārā mikoriza (AM)

Vezikulāri-arbuskulārās mikorizas asociācijas (VAM), kuras sauc arī par arbuskulāro mikorizu, ir viena no plašāk izplatītajām un sastopamajām sakņu un sēņu asociācijām (Brundrett, 2004; Bücking, Liepold, Ambilwade, 2012). Tās pieskaita primitīvām sēnēm, jo tām ir vienkāršas sporas, nav novērota seksuālā vairošanās. Šajā kārtā ir relatīvi maz sugu, bet tās var veidot asociācijas ar plašu augu sugu klāstu gan dabīgajās, gan agrocenozēs. Sēnes nevar augt bez asociāciju veidošanas ar augiem. Genoma daudzveidību ietekmē seksuālās reprodukcijas neesamība, tāpēc bieži vien ir problemātiski nošķirt atsevišķus īpatņus un dažādas sugas (Pringle, Moncalvo, Vilgalys, 2000). Funkcionālā daudzveidība, iespējams, ir daudz lielāka nekā pašlaik izdalīto sugu skaits (Brundrett, 1991; Abbott, Gazey, 1992), jo sugu identificēšanu apgrūtina sēņu uzbūves īpatnības. Viena hifa var saturēt ģenētiski atšķirīgus kodolus. Tā kā micēlijā ir dažādi kodoli, tie var dalīties atšķirīgi. Tas ietekmē sēnes izdzīvošanu mainīgos vides apstākļos, paaugstinot sēnes fleksibilitāti, kas parasti nav raksturīga organismiem ar neseksuālu vairošanās veidu (Denison, Kiers, 2011).

Arbuskulāro mikorizas sēņu sistemātika tiek precizēta. Atbilstoši vecākām klasifikācijas sistēmām mikorizas sēnes iedalīja *Zygomycetes* nodalījumā, *Glomales* kārtā, kuru sīkāk dalīja vairākās ģintīs - *Glomus, Acaulospora, Scutellospora, Gigaspora, Paraglomus un Archaeospora*. Pašlaik mikorizas sēnes ir apvienotas nodalījumā *Glomeromycota* (= *Glomeromycete*s), kurā identificētas apmēram 2000 sugas (Brundrett, 2004; Hibbet, Binder, Bisfoff et al., 2007).

Tomēr, salīdzinot ar citām sēņu grupām, tas ir diezgan mazs skaits, to izskaidro ar to, ka lielākā daļa VAM sēņu sugu ir saderīgas ar gandrīz visiem mikotrofajiem augiem. Nelielā sugu skaita iemesls var būt arī noteikšanas metodes, jo AM sēnēm ir ilgstoša neseksuālā evolūcija. *Glomeromycete* sēnes nav spējīgas saprofītai eksistencei. Kā arī var augt ne tikai augu saknēs, bet arī citos dzīvos audos, piemēram, zemāko augu rizomos (Imhof, 2001). Agroekosistēmā arbuskulārā mikoriza veido simbiotiskās asociācijas ar gandrīz visiem nozīmīgākajiem kultūraugiem (kukurūza, kviešiem, soju, bet ne ar kāpostiem, sinepēm un bietēm) un tāpēc ir nozīmīgs komponents virszemes un apakšzemes ekosistēmu mijiedarbībā (Bücking, Abubaker, Govindarajulu et al., 2012).

AM mikorizu definē pēc arbuskuliem, kuru klātbūtni nosaka mikroskopiski. To skaits parasti korelē ar jauno sakņu kolonizācijas pakāpi, kaut arī tiem ir efemers raksturs - tie bieži pazūd vai sadalās vecākās saknēs. Vecāku AM var konstatēt saknēs pēc raksturīgas hifu zarošanās. Arvien vairāk atklāj AM sēnēm specializētus saimniekaugus, lai gan vecāki pētījumi liecināja, ka tām ir vāji izteikta specializācija (Brundrett, 2004; Heijden Van Der, Scheublin 2007). Ir konstatēts, ka veidojas gan specifiskas, gan nejaušas saimniekauga un AM savienības. Tas nozīmē, ka dažādi AM sēņu genotipi atšķirīgi ietekmē augus, tas noteikts, salīdzinot mikorizētus augus ar nemikorizētiem. Pēc augu biomasas veidošanās, barības vielu uzņemšanas, konstatēta gan pozitīva (Munkvold, Kjøller, Vestberg et al. 2004; Koch, Croll, Sanders. 2006), gan negatīva ietekme (Koch, Croll, Sanders. 2006).

Glomeromicētu sēnes var veidot dažādu kategoriju asociācijas:1) tipisku sabalansētu AM, kas veidojas jaunās saknēs, augot hifām un veidojoties arbuskuliem; 2) vecāka sabalansēta AM – sastopama saknēs ar hifām, bet neaktīviem arbuskuliem; 3) endofītiskas attiecības ne-saimniekauga saknēs un citos nemikorizas augos ar difūzu hifu augšanu bez arbuskuliem; 4) ekspluatējošā AM – daļēji vai pilnīgi miko-heterotrofiem augiem ar intensīvu kolonizāciju reducētās augu saknēs vai uz dzinumiem. Šādas attiecības sastopamas tikai noteiktām augu sugām. Vezikulas var būt vai nebūt jebkurā no minētajiem mikorizas asociācijas veidiem. Vezikulas vairāk sastopamas vecākās saknēs, kur ir maz vai nav intakti arbuskuli. Nav arī pierādīta šo struktūru saistība ar barības vielu apmaiņu starp augu un sēni (Smith, Smith, 1997).

Biotisko un abiotisko faktoru mijiedarbība (piem., augu biezība, fotosintēzes līmenis, pieejamie minerālelementi) būtiski ietekmē saimniekauga iegūstamos labumus (Brundrett, Abbott, 2002). Agroekocenozēs īpaša interese ir ne tik daudz par mikorizas sēņu daudzveidību, bet to funkcionālo ietekmi uz kultūraugiem un augsnes īpašībām. Piemēram, atšķirīgs attālums, ko hifas var veikt, lai iegūtu minerālelementus, vai arī sugas atšķiras pēc nepieciešamā slāpekļa avota - organiskā vai neorganiskā (Leigh, Hodge, Fitter, 2009; Herman, Mary, Firestone et al., 2012). Nozīmīga ir mikorizas sēņu ietekme uz augsnes īpašībām, piemēram, konstatēts, ka hifu izplatīšanās spēja stabilizēt augsnes agregātus (Wu, Xia, Zou, 2008). Mikorizas sēņu sugas ar dažādu intensitāti ir vidutājas ūdens uzņemšanai augā (Marulanda, Porcel, Barea et al. 2007). Atsevišķām mikorizas sēņu ģintīm ir lielāka mijiedarbība ar potenciāli patogēnajiem mikroorganismiem, bet citas intensīvāk saista fosforu (Powell, Parrent, Hart et al., 2009). Cita funkcionālo iezīmju grupa saistīta ar oglekļa savienojumu sadalījuma stratēģiju. Oglekļa savienojumu daudzums, ko saista no saimniekauga (Pearson, Jakobsen, 1993), sugas sporulācijas īpašības un intensitāte (Violi, Treseder, Wright et al., 2007), kā arī saimnieka oglekļa savienojumu pārdalījums par labu vai nu uzglabāšanai un sporu veidošanai vai barības vielu uzņemšanai var ietekmēt visus kultūraugam iegūstamos labumus tā ontoģenēzes laikā (Aarle,Olsson 2003).

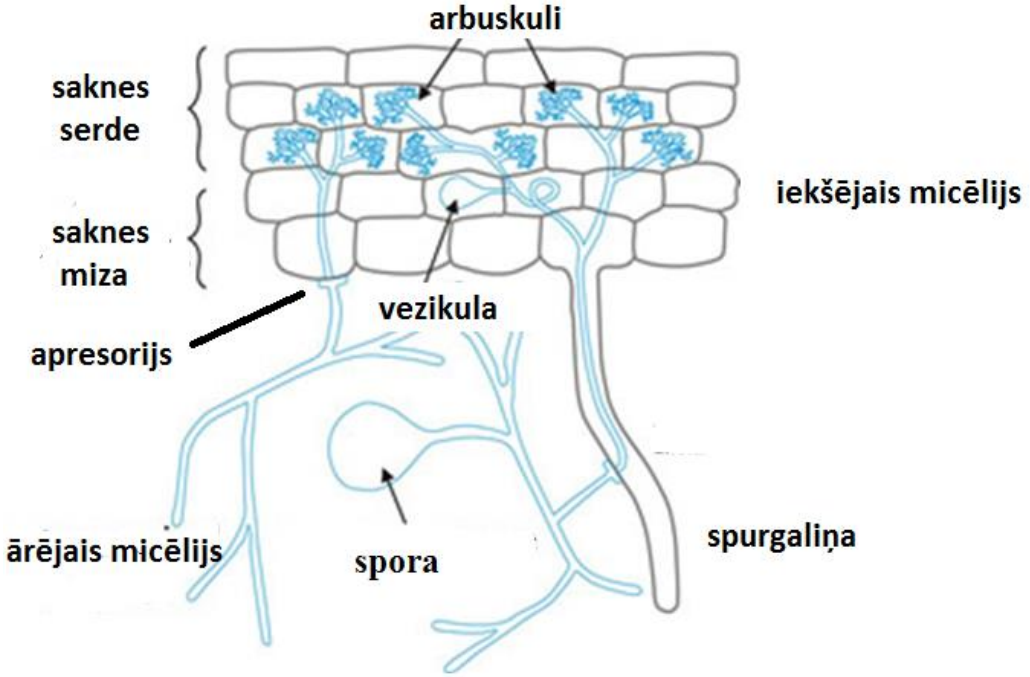
1.2.3.3. Mikorizas sēņu dzīves cikls

Mikorizas sēnes ir obligāti biotrofi, tāpēc to dzīves cikla pilnai norisei nepieciešami autotrofie saimniekaugi. Sporas var sadīgt bez saimniekauga klātbūtnes, bet sporas dīgstot,

reaģē uz auga sakņu eksudātiem, palielinot hifu zarošanos un metabolisko aktivitāti. Auga saknes atbrīvo, piemēram, strigolaktonus, kuri inducē pre-simbiotisko AM sēņu sporu dīgšanu (Bücking, Abubaker, Govindarajulu et al., 2008, Bücking, Liepold, Ambilwade, 2012). Visām VAM mikorizas sēnēm nav vienāda dzīves stratēģija augsnē. Piemēram, *Gigasporaceae* veido lielas sporas un augu saknes kolonizē lēnām, bet *Glomaceae*, difūzas hifas, kas ir aktīvākās propagules. Kolonizējot saknes, *Gigasporaceae* sēnes neveido plašu tīklojumu saknē, bet blīvu ārējo micēliju, kuram fragmentējoties, neveidojas jaunas propagules. Turpretī *Glomaceae* sēnes veido plašu tīklojumu auga saknēs, bet tikai nedaudz ārējo micēliju, kurš veido aktīvas propagules. Atšķirīgās dzīves stratēģijas mikorizas sēnēm var būt kā viens no nosacījumiem piemērota saimniekauga izvēlē (Antunes, Deaville, Goss, 2006).

Arbuskulārās mikorizas sēnes hifa ir vienšūnas micēlijs, kurā nav šķērssienu jeb septu. Dīgstošai sporai izveidojas hifas, kas uz saimniekauga saknes virsmas veido specifiskus apresorijus – hifopodijus. Sēņu hifas no hifopodija iekļūst saknē un specifisku struktūru pavadīta aizkļūst līdz saknes mizai. Sasniedzot mizu, hifa iekļūst apoplastā un aug laterāli saknes asij, līdz iekļūst mizas iekšējās šūnās. Hifa saknes mizas šūnās izveido noteikta veida struktūras – vezikulas un arbuskulas (1.4. att.). Vezikula ir paplašināta hifa, kurās uzkrājas lipīdi un citoplazma. No vezikulas var izveidoties iekššūnas sporokarps, kuros veidojas arbuskulārās mikorizas sēnes sporas. Vezikulas dzīves cikls saknē ilgst līdz vienam gadam. Arbuskula veidojas no labi attīstītas hifas, kas saknes šūnā sazarojas un piedalās barības vielu maiņā starp saimniekaugu un sēni. Tās dzīves cikls saknē ilgst no vienas līdz divām nedēļām (Abbot et al., 1994; Brundrett, 2004; Moore, Robson, Trinci, 2011.)

Atkarībā no tā, kādā veidā hifas auga saknēs šķērso šūnas, mikorizas asociācijas sadala *Arum* un *Paris* tipos. Tie ir sakņu kolonizācijas morfoloģijas veidi, kuri nosaukti pēc to augu sugām, kam tie ir atklāti un tipiski novērojami – *Arum maculatum* un *Paris quadrifolia* (Dickson, Smith, Smith, 2007).



1.4. att**. Mikorizas sēņu pamatstruktūras auga saknēs**
(pārveidots no Moore, Robson, Trinci, 2011)

Tipiskās AM sēnes, kas pieder Arum tipam ar smalkām hifām iekļūst auga šūnā, un dihotomi daloties veido raksturīgos arbuskulus. Arum tipa arbuskulārās mikorizas hifa izplešas relatīvi ātri starpšūnu telpā. Atšķirīgs ir Paris tips, kur mikrorizas sēne veido plašu iekšūnu hifu tinumu, kas dažkārt atgādina arbuskuliem līdzīgus veidojumus. Sēne neiekļūst

simplastā un ir atdalīta no saimniekauga citoplazmas ar periarbuskulāro membrānu. Barības vielu apmaiņa Paris tipa simbiozes gadījumā notiek gan uz hifu, gan arbuskulu tinumu virsmas. Apoplastā var izvietoties arī vesikulas (Brundrett, 2004).

Micēlijs ir daudzkodolu. Saknē esošais iekšējais micēlijs morfoloģiski un funkcionāli atšķiras no ārējā micēlija, kurš izvietots augsnē. Ārējais micēlijs absorbē barības vielas no augsnes, un pārvieto tās uz auga saknēm. Iekšējais micēlijs savukārt, atbrīvo barības vielas apoplastā un iemaina pret oglekļa savienojumiem no saimniekauga. Oglekļa savienojumus sēne izlieto šūnas dzīvības procesu nodrošināšanai, ārējā micēlija paplašināšanai un metabolismam (aktīvam jonu uzņemšanas procesam, slāpekļa asimilācijai), kā arī sporu attīstībai, ar kurām notiek pēcaugu kolonizācija (Smith, Read, 2008).

Līdzīgi kā *Nod* faktoram ir nozīme gumiņu veidošanās procesā, tā arī AM sēnes atbrīvo *Myc* faktoru, kurš vada ar auga simbiozi saistīto gēnu ekspresiju un sagatavo saknes simbiozes izveidošanai. Viens no aktīvajiem identificētajiem *Myc* faktoriem ir lipohitooligosaharīdi. Ir liecības, ka *Myc* faktors attīstās no *Nod* faktora un to funkcijas pārklājas. Par to liecina arī fakts, ka AM un gumiņbaktēriju simbiozēm ir kopēja daļa no signālu pārvades ceļa. Noteikti septiņi simbiozes (SYM) gēni, kas ir kopīgi abiem simbiozes veidiem (Bonfante, Requena, 2011). Pretstatā SYM ekspresijas ceļam mazāk informācijas ir par šūnas un molekulāro regulējumu, kurš atbild par iekššūnas kolonizāciju un arbuskulu attīstību saknes mizā. Ir pierādīts, ka sakņu izdalījumi stimulē AM hifu augšanu un morfoloģiju pirms sakņu kolonizācijas (Bücking, Liepold, Ambilwade, 2012).

Repopulācija augsnē. Sporu veidošanās ir nozīmīga AM sēņu reproduktīvā stratēģija, ļaujot vairoties, un, saglabāt dzīvotspēju bez saimniekauga klātbūtnes. Atsevišķos gadījumos konstatēts, ka dzīvotspēja saglabājas līdz pat 10 gadiem. AM sporas ir pārsteidzoši dinamiskas, jo sākot dīgšanu hifa 'izpēta' augsni un gadījumā, ja nav atbilstoša saimniekauga, tā var atgriezties miera stāvoklī. Dīgšanas apturēšana var notikt 8 – 20 dienu intervālā. Tomēr dīgstošās hifas var savienoties, veidojot tīklojumu ar anastomozēm, tādejādi iegūstot oglekļa savienojumus no auga pat tad, ja pašām nav tieša kontakta ar augu (Chagnon, 2014).

1.2.3.4. Barības vielu uzņemšana mikorizas sēnēs

Mikorizētie augi barības vielas no augsnes var uzņemt divos ceļos: 1) augu ceļš, kurā augi barības vielas uzņem tieši no augsnes caur saknes spurgaliņu epidermu, un, 2) mikorizas ceļš, kurā barības vielas uzņem ar ārējo micēliju un transportē uz Hartinga tīklu ektomikorizas asociācijās vai iekšējā micēlijā VAM asociāciju gadījumā. Šajā gadījumā augs barības vielas uzņem no apoplasta.

Minerālvielu uzņemšana no augsnes bieži ir limitēta, jo ir izveidojušies grūti šķīstoši savienojumi. Piemēram, fosfātu šķīdība ir tik zema, ka uzņemšanas gadījumā tas izraisa noplicinātas zonas veidošanos ap sakni un limitē turpmāko P uzņemšanu vājās difūzijas dēļ. Turpretī mikorizētiem augiem P pieplūdums var būt 3 līdz 5 reizes lielāks nekā nemikorizētiem augiem (ātrums 10^{-11} mol m^{-1} s^{-1}) (Smith, Read, 2008; Bücking, Liepold, Ambilwade, 2012; Schachtman, Reid, Ayling, 1998). Atšķirībā no ektomikorizas sēnēm AM sēnes neveido ap sakni apvalku, tāpēc augs var izmantot abus barības vielu uzņemšanas ceļus. Uzskata, ka vielu uzņemšana ar mikorizas starpniecību netiek izmantota, ja nodrošinājums ar barības vielām augsnē ir augsts, tāpēc mikorizētiem augiem ne vienmēr konstatē pozitīvu augšanas atbildi uz inokulāciju (Smith, Smith, 2011).

Fosfātu dažādās uzņemšanas un transportēšanas formas atkarīgas no auga un mikorizas sēnes sugas. Vairākos pētījumos, ar dažādām mikorizas sēņu un augu sugām, konstatēta sugas specifiska mijiedarbība. Augu sintezētie fitohormoni var izmainīt mikorizas sēņu kolonizācijas efektivitāti un fosfora uzņemšanu. Tā Grunvalds u.c. (Grunwald, Guo, Fischer et al., 2009) konstatējuši, ka *Glomus intraradices* nomāc auga fosfātu pārnesēju aktivitāti, bet *G. moseae* ietekme ir mazāka. Savukārt citā pētījumā (Smith, Smith, Jakobsen, 2003),

salīdzinot vairāku sēņu mijiedarbību ar lucernu, liniem, kviešiem un tomātiem konstatēts, ka *G. intraradices* pozitīvi mijiedarbojas ar visiem augiem. Lini un lucerna, kas kolonizēti ar mikorizas sēni *G. caledonium*, fosforu uzņēma galvenokārt ar mikorizu starpniecību, bet tomātiem ar mikorizas sēņu starpniecību uzņemti tikai aptuveni 70%. Turpretī sēnes *Gigaspora rosea* ieguldījums ir daudz mazāks visos analizētajos augos. Salīdzinot gurķu, kviešu un linu augšanu un fosfora uzņemšanu mijiedarbībā ar mikorizas sēnēm, konstatēja nelielu inhibējošo efektu gurķiem, bet būtiskākais pozitīvais efekts konstatēts liniem. Liniem fosfora uzņemšana intensīvāk notika simbiozē ar *Glomus. invermaiiim* nevis *G. caledonium.* Pēc literatūras datiem *G. caledonium* vienmēr uzrāda augstu P saistīšanas aktivitāti neatkarīgi no auga sugas, bet *Glomus invermaium* būtisku P uzņemšanas aktivitāti uzrāda tikai liniem (Ravnskov, Jakobsen, 1995).

Mikorizas sēņu nozīme augu apgādāšanā ar barības vielām izrādījās vēl nozīmīgāka, kad konstatēja, ka mikorizas sēnes var veidot t.s. kopējo mikorizas tīklu, kurš apvieno vairākus augus, un to sēņu simbiontus kopējā tīklā. Šajā tīklojumā var transportēt ne tikai fotosintēzes produktus, bet arī minerālelementus (Selosse, Franck, He et al., 2006). Tā piemēram, slāpeklis pārvietojas AM un ektomikorizas kopējā mikorizas tīklā no augiem, kam slāpekļa fiksāciju nodrošina simbiotiskās gumiņbaktērijas, uz augiem, kuriem šādas simbiozes nav. Slāpeklis intensīvāk pārvietojas tieši amonija jona, nevis nitrāta formā (He, Crichley,Bledsoe, 2003). Fosfora pārnešana kopējā mikorizas tīklā ir mazāk intensīva un tiek uzskatīts, ka šim procesam nav būtiskas ekoloģiskās nozīmes augu apgādē ar fosforu, izņemot, fosfora deficīta situācijas (Joner, Jakobsen, 1995). Bez tam, kopējais mikorizas tīkls varētu nodrošināt fosfora savienojumu pārnesi no augu saknēm sadalīšanās stadijā uz dzīviem augiem.

Mikorizas sēņu fosfātu metabolisms tiek intensīvi pētīts, jo auga apgāde ar papildus pieejamiem fosfora resursiem ir viens no būtiskākajiem mikorizas sēņu efektiem. Ortofosfāti (Pi), kurus absorbē ar ārējo micēliju var: a) papildināt citoplazmas metaboliski aktīvo Pi kopu; b) var iekļauties fosfolipīdos, RNA, DNA un fosfoproteīnos; c) vai papildināt rezerves vielu kopu polifosfātu veidā (polyP). Mikorizas sēnes ātri pārvērš polifosfātu veidā ievērojamu daļu (vairāk nekā 60%) no šūnas fosfora. Mikorizas simbiozē polyP iesaistīts: a) P homeostāzes uzturēšanā hifās un nodrošinot šūnās zemu Pi līmeni; b) nodrošina garākas distances transportu no ārējā micēlija uz iekšējo micēliju; c) regulē P transportu; d) nodrošina katjonu homeostāzi, jo polyP ir polianjons, un tā negatīvais lādiņš tiek izlīdzināts galvenokārt ar katjoniem - K^+ un Mg^{2+}. Bāziskā aminoskābe arginīns (Arg) var arī piedalīties polyP lādiņu līdzsvara veidošanai. Tāpēc uzskata, ka polyP ārējā micēlijā var saglabāt būtiskas N rezerves (Hijikata, Murase, Tani et al, 2010; Viereck, Hansen, Jakobsen, 2004; Bücking, Liepold, Ambilwade, 2012).

Mikorizas un augu mijiedarbība slāpekļa savienojumu uzņemšana. Daudzās ekosistēmās ar zemu slāpekļa koncentrāciju augsnē dominē ektomikorizas augi. Ektomikorizas sēnes efektīvi var saistīt kā neorganisko, tā arī organisko slāpekli. Daudzas ektomikorizas sēnes var mobilizēt un utilizēt aminoskābes un amīdus, piemēram, glutamīnu, glutamātu un alanīnu, kuri pārstāv būtisku slāpekļa daļu skābās, ar organisko vielu bagātās augsnēs. (Smith, Read, 2008). Pretstatā EKM sēnēm AM sēņu ieguldījums augu N apgādē ir diskutabls. Tā kā neorganiskā N avots augsnē - nitrāti un amonija joni ir relatīvi kustīgi, tad uzskata AM augu labākais nodrošinājums ar slāpekli tiek panākts, uzlabojot augu nodrošinājumu ar fosforu (Reynolds, Hartley, Vogelsang et al, 2005). Atšķirīgs viedoklis norādīts virknē citu darbu, kur AM augu sakņu kultūrā konstatēts nozīmīgs N apjoms, kurš transportēts ar sēnes ārējo hifu starpniecību. Tanaka un Yano (2005) konstatējuši, ka 75% no kukurūzas lapās esošā N ir uzņemts ar mikorizas sēņu ārējā micēlija starpniecību.

AM un EKM sēņu ārējais micēlijs no augsnes var uzņemt neorganisko N gan amonija (NH_4^+), gan nitrātu (NO_3^-) formā, vai no augsnes organiskajām vielām (Ames, Reid, Porter et al., 1983; Tian, Kasiborski, Koul et al., 2010). Bieži vien tiek minēts, ka mikorizas sēnes priekšroku dod amonija formas slāpeklim, tomēr noskaidrots, ka EKM sēnes var uzņem

nitrātu formas slāpekli. Novērots, ka, atsevišķos gadījumos, uzņemot nitrātu formas slāpekli, tās veido lielāku biomasu (Plassard, Barry, Eltrop et al., 1994). Slapeklis amonija formā sēnēm izraisa nitrātu pārnesēja aktivitātes un nitrātu reduktāzes inhibēšanu, kas norāda, ka EKM sēnes priekšroku dod amonija formas slāpeklim (Smith, Read, 2008). AM un EKM sēnēm atklāti vairāki radniecīgi NH_4^+ pārnesēji, kuru darbību regulē eksogēnā amonija jonu koncentrācija. AM sēne *G. intraradices* amonija jonus labāk uzņem no vides ar zemu koncentrāciju. Eksogēnā apgāde ar NO_3^- stimulē nitrātu pārnesēju aktivitāti. Šo pārnesēju aktivitāti aizkavē paaugstināta amonija jonu iekšējā koncentrācija, kā arī lejupejošā metabolītu, piemēram, glutamīna plūsma (Tian, Kasiborski, Koul et al., 2010).

Precīza slāpekļa savienojumu pārvietošana starp augsni, mikorizas sēni un augu joprojām tiek pētīta. Kā norāda Bruns (Bruns, Arnold, Hughes et al., 2008) slāpekļa asimilācijas, savienojumu pārgrupēšanas un pārvietošanas uz augu mehānismu regulācijas labāka izpratne ir nozīmīga potenciālai AM sēņu izmantošanai, kā mikrobioloģiskajiem preparātiem ilgtspējīgā lauksaimniecībā, kā arī ļauj izprast sēņu lomu dabīgajās ekosistēmās. N pārnešanas pamatmehānismu no sēnes hifām uz augu defīnēja Bago (Bago, Pfeffer, Shachar-Hill, 2001). Tas ietver jauna metabolisma ceļa aktivizēšanos, kurā N arginīna formā pārvietojas no ārējā uz iekšējo micēliju, bet uz augu tiek pārnests bez oglekļa daļas, kā neorganiskais slāpeklis. Uzņemot nitrātu jonus no augsnes, tos konvertē par amonija jonu ar nitrāta un nitrīta reduktāzēm kā AM, tā arī EKM sēnēs. AM sēnēm un daudzām EKM sēnēm NH_4^+ tiek asimilēts caur glutamīnsintetāzes / glutamīnoksiglutarāta aminotransferāzes (GS/GOGAT) metabolisma ceļu uz aminoskābēm AM sēnēs. Glutamīns un arginīns ir galvenie savienojumi, kuros saistās N (Bago, Pfeffer, Shachar-Hill, 2000; Tian, Kasiborski, Koul et al., 2010).

1.2.4. Vielu apmaiņa starp simbiontiem

Mutuālistiskās (abpusēji izdevīgas) simbiozes veidošanās procesā nozīmīga ir barības vielu divvirziena apmaiņa uz sēnes virsmas. Sēnes un auga saskarsmes virsmu veido periarbuskulārā membrāna (PAM) no saimniekauga puses un sēnes plazmolemma, šunapvalks un periarbuskulārā telpa starp sēnes šūnapvalku un PAM. Periarbuskulārā membrāna atšķiras pēc proteīnu sastāva no to šūnu plazmolemmas, kurās nav arbuskuli un satur mikorizas inducētus proteīnus, kuri atvieglo barības vielu izkļūšanu caur membrānu.

No augiem izdalīti divi atšķirīgi fosfora transportētājsavienojumi. Zemas saderības fosfāta transportētājs ir līdzīgs raugos un *Neurospora crassa* šūnās esošajam Na simporta sūknim, un konstatēts *Arabidopsis* šūnās. Otrs transporta proteīns ir Pt4, kuram augsta "radniecība" ar fosfāta (P) transporta proteīnu, tas aktivizējas tikai mikorizētās augu saknēs, un ir konstatēts virknei kultūraugu, piemēram, kartupeļiem, lucernai, tomātiem (Harrison, Dewbre, Liu, 2002). Ar PAM saistīts arī proteīns AMT2, kuram augsta "radniecība" ar amonija jonu (NH_4^+). Šīs transportproteīns aktivizējas tikai mikorizētajās saknēs, bet ne tauriņziežu gumiņos (Guether, Neuhauser, Balestrini et al., 2009). Atrasti arī sulfātus transportējošie proteīni, kuru aktivitāti ierosina mikorizas asociācijas veidošanās (Allen, Hill, 2009). Savukārt oglekļa savienojumu transportēšanu no saimniekauga uz sēnes šūnām nodrošina monosaharīdu transportmolekulas sēnes arbuskulu membrānā (MST2). Šī transportmolekula pārvieto ne tikai glikozi, bet arī citus monosaharīdus, piemēram, ksilozi, kas liecina, ka sēne var izmantot auga šūnapvalka cukurus, kā alternatīvu oglekļa avotu (Helber, Wippel, Sauer et al., 2011.

Barības elementu transporta regulēšana. Molekulārais mehānisms N un P savienojumu pārvietošanai caur mikorizas sēņu virsmu joprojām pilnībā nav skaidrs. Barības vielu pārnešanas modelis ietver P un N izplūšanu no sēnes simplasta caur sēnes plazmolemmu uz apoplasta virsmas un aktīvu transportu caur auga plazmolemmu.

Vielu plūsmas stimulē:

1. koncentrācijas gradienta veidošanās. Koncentrācijas gradients mikorizas sēņu virsmā, kur augsta koncentrācija iekšējā micēlijā, bet zema koncentrācija apoplastā un serdes šūnās, var palielināt barības vielu izplūšanu caur sēnes plazmolemmu (Smith, Gianinazzi-Pearson, Koideet al., 1994; Kiers, Duhamel, Beesetty et al., 2011),
2. oglekļa savienojumi, kā barības vielu transporta ierosinātāji: Palielinoties oglekļa pieejamībai, tiek stimulēta N asimilācijā un arginīna biosintēze. Tas izraisa NH_4^+ līmeņa palielināšanos iekšējā micēlijā un atvieglo N izplūšanu mikorizas struktūru virspusē (Bücking, Liepold, Ambilwade, 2012; Fellbaum, Gachomo, Beesetty et al., 2012),
3. polyP hidrolīze. Aktīva polyP hidrolīze iekšējā micēlijā atbrīvo Pi un arginīnu sēnes citoplazmā un veicina metabolītu izplūšanu mikorizas virsmā. VAM un EKM sēnes regulē barības vielu plūsmu uz saimniekaugu ar polyP akumulēšanu vai remobilizēšanu. Konstatēts, ka saimniekauga nodrošinājums ar oglekli ir palaidējmehānisms polyP hidrolīzei (Bücking, Shachar-Hill, 2005; Kiers, Duhamel, Beesetty et al., 2011; Bücking, Heyser, 2003),
4. membrānu caurlaidība. Ņoteiktu jonu (H^+, K^+, Na^+, Ca^{2+}) akumulācija apoplastā izraisa transmembrānu elektriskā potenciāla izmaiņas un jonu kanālu atvēršanos (Smith, Jakobsen, Grønlundet al, 2011). Vienvērtīgie katjoni (K^+, Na^+) stimulē Pi plūsmu no EKM sēņu hifām (Drissner, Kunze, Callewaert et al, 2007). Gumiņos tas piedalās NH^{4+} plūsmas nodrošināšanu caur simbiosomas membrānu, kas iekļauj N fiksējošos bakteroīdus (Poole, Hynes, Johnston et al., 2008).

1.2.5. Simbiozi veidojošo mikroorganismu mijiedarbība ar augsnes mikroorganismiem

Mikorizas sēnes ne tikai veido asociācijas ar dažādu taksonomisko grupu augiem, bet sastopamas arī dažādos biotopos – zālājos, savannās, mežā, pustuksnešos, kāpās, kā arī cilvēka izmainītajās ekosistēmās – agroekosistēmās. Tātad šīs sēnes ir pielāgojušās ne tikai dažādām augsnēm – sastopamas gan skābās podzolētās, gan mitrās, gan barības vielām bagātās augsnēs. Dabīgās ekosistēmās mikorizas sēnes ir daļa no augsnes mikroorganismu kompleksa. Tām jāpielāgojas daudzveidīgai augsnes mikrobiotai, kam var būt gan stimulējoša, gan inhibējoša darbība (Hayman, 1982;Frey-Klett, Garbaye, Tarkka, 2007).

Agrobiocenozēs dabīgās mikrobiotas funkcionēšanu būtiski ietekmē cilvēka aktivitātes. Tauriņzieži ir plašākā kultūraugu grupa, kuru audzēšanā lieto sēklu inokulēšanu ar baktērijām. Tie var būt saimniekaugi AM sēnēm un N_2-saistītājām baktērijām vienlaicīgi. Gan gumiņbaktērijām, iekļūstot saknē, gan mikorizai kolonizējot saknes, mainās tās fizioloģiskā aktivitāte, kas rezultātā ietekmē mikroorganismu daudzuma un sastāva izmaiņas rizosfērā. Mikroorganismu mijiedarbība rizosfērā ir kompleksa, bet tās regulācijas mehānismu izpratne vēl nav pilnīga. Dažādu grupu mikroorganismu un augu mijiedarbības pētījumi kļūst aizvien aktuālāki. Tomēr divas simbiozes reti tiek studētas kopā, jo mikorizas sēnes ir obligāti biotrofi. Lai gan šķiet, ka starp abām simbiozēm nav nekā kopīga, interesantais ir mijiedarbībā. Asai (1944) iespējams bija pirmais, kurš ziņoja par šādu mijiedarbību. Tomēr jautājums aktuālāks kļuva tikai 30 gadus vēlāk, kad Krušs (Crush, 1974) novēroja, ka mikorizas klātbūtne stimulē gumiņu veidošanos un vairāku tauriņziežu augšanu. Sekoja vairāku citu autoru darbi, kur ziņoja par N_2 fiksācijas veicināšanu, lielāku gumiņu skaitu un sausnas saturu tajos, augstāku N saturu augos. Tā kā gan gumiņi, gan AM sēnes tiek uzturētas, izmantojot auga piegādāto enerģiju, tiek diskutēts, vai to mijiedarbība ir konkurējoša vai mutuālistiska. Mutuālisms saskan ar gumiņu skaitu vai izmēriem, kuri palielinājās AM klātbūtnē (Antunes, Goss, 2005). Kopumā AM ir pozitīva ietekme uz gumiņu veidošanos. Mazāk ir zināms par gumiņbaktēriju ietekmi uz AM aktivitāti. Ir dati, kas liecina par nebūtisku gumiņbaktēriju efektu uz AM aktivitāti. Pretstatā literatūtā ir atrodama informācija, ka inokulācija ar *Bradyrhizobium japonicum* ietekmēja AM attīstību. Starp

simbiontiem notiek bioķmīsko signālu apmaiņa. Divas mikroorganismu grupas izskatās, ka nesacenšas par kolonizācijas vietu (Xie, Staehelin, Vierheilig, et al., 1995; Azcon-Aquilar, Barea, 1996) un tikai stresa apstākļos viens simbionts var inhibējoši ietekmēt otra attīstību (Bethlenfalvay, Newton, 1991).

Lauksaimniecībā izmantotajās augsnēs būtiska ietekme ir augsnes apstrādes veidam, lietotajam mēslojumam un augu aizsardzības līdzekļiem. Dažādi agrotehniskie pasākumi izmaina ne tikai baktēriju asociāciju daudzveidību, bet var būtiski izmainīt dabīgo mikorizas sēņu populāciju, jo, izjaucot augsnes sakārtu, tiek sadalītas hifas. (Hayman, 1982). Izmēģinājumos ar dažādi apstrādātu augsni un augu maiņu Oehls ar līdzautoriem (Oehl, Sieverding, Ineichen et al., 2003) konstatēja, ka neregulāri kultivētā zālāju augsnē varēja atrast 35 – 65 mikorizas sēņu sporas vienā gramā augsnes un vismaz 17 – 20 sugas, bet intensificējot augsnes apstrādi samazinājās gan sporu skaits, gan sugu daudzveidība. Vismazāko sporu skaitu (2 – 8 sporas g augsnes) un sugu skaitu (6 – 8 sugas 100 g augsnes), konstatēja kukurūzas monokultūrā. Tomēr arī pašas mikorizas sēnes var ietekmēt augsnes daļiņu struktūru, jo izdala vidē glikoproteīnus, piemēram, glomalīnu. VAM sēņu eksudāti, izmainot augsnes daļiņu struktūru, ietekmē augsnes baktērijas, jo tām ir atšķirīga saistīšanās spēja pie ūdens noturīgām un nenoturīgām augsnes frakcijām (Artursson, Finlay, Jansson, 2006).

Pretrunīgi ir rezultāti par minerālmēslojuma ietekmi uz VAM sēņu izplatības aktivitāti un sporu veidošanas intensitāti. Haimans (Hayman, 1982) apkopojis datus, kur norādīts, ka slāpekļa mēslojums ir aizkavējis augsnes dabīgo mikorizas sēņu sporu veidošanos gan smagā smilšmāla, gan smilts augsnē, kur audzēti kvieši un mieži. Turpretī citā izmēģinājumā konstatēts, ka slāpekļa devas palielināšana no 48 līdz 403 kg N ha^{-1} aizkavēja VAM sēņu augšanu tikai tad, ja fosfora daudzumu palielināja virs 148 kg P ha^{-1}.

Pētot mikorizas sēņu un augsnes mikroorganismu mijiedarbību virkne autoru (Johansson, Paul, Finlay, 2004; Artursson, Finlay, Jansson, 2006, Frey-Klett, Garbaye, Tarkka, 2007) atklājuši, ka mikorizas sēnes var cieši dzīvot ar baktērijām, kuru klātbūtnē intensīvāk notiek auga sakņu kolonizēšana vai hifu tīklojuma veidošanās augsnē. Novērots, ka šo baktēriju klātbūtnē sakņu kolonizācijas biežums palielinās vidēji 2 reizes. Pašlaik pieejamā informācija liecina, ka t.s. mikorizas palīgbaktērijas nepieder vienai noteiktai taksonomiskai grupai, kā arī mikorizas sēnes, kurām konstatēta šāda mijiedarbība, nav no noteiktām sugām. Mikorizas sēņu un baktēriju mijiedarbība notiek augsnes zonā ap hifu, ko sauc par mikorizosfēru. Atsevišķām *Glomeromycota* mikorizas sēņu sugām sporās konstatētas endosimbiotiskās baktērijas. Mikorizas palīgbaktērijas konstatētas vairākās ģintīs – *Agrobacterium, Azotobacter, Burkholderia, Pseudomonas, Bradyrhizobium* un *Rhizobium.* Nav skaidrs princips, kā veidojas šīs mikorizas sēņu un baktēriju savienības, jo atsevišķos gadījumos novērots, ka palielinās baktēriju izdzīvošana, piemēram, tomāta rizosfērā *Glomus mosseae* palielināja *P.fluorescence* dzīvotspēju. Atsevišķos gadījumos konstatēts, ka rizosfēras baktērijas var izmainīt auga šūnu caurlaidību (Artursson, Finlay, Jansson, 2006)

Vairumā gadījumu sinerģiska ietekme konstatēta starp mikorizas sēnēm un gumiņbaktērijām. Audzējot lucernu augsnē ar samazinātu fosfora daudzumu, izpaudās *Rhizobium meliloti* un mikorizas sēņu sinerģiskā mijiedarbība, jo abi mikrosimbionti apgādāja viens otru ar limitējošajiem minerālelementiem un varēja saņemt no auga oglekļa savienojumus. Turpretī augsnē, kur fosfors bija pieejams pietiekošā daudzumā, mikorizētajiem augiem nevarēja konstatēt augstāku N_2 saistīšanu (Smith, Read, 2008).

Mikorizas sēnes mijiedarbojas ar augsnes mikroorganismiem arī vielu aprites līmenī. Dažādi mikorizu veidi var veidot krasi atšķirīgas anatomiskas struktūras auga saknē (Brundrett, 2004), tāpēc, lai gan vezikulāri arbuskulārās mikorizas sēņu struktūras pārsvarā izvietotas auga saknēs, hifas, kuras izvietotas ārpus auga saknes, aktīvi uzņem barības vielas un izdala vielmaiņas produktus. Slāpekļa apriti augsnē ietekmē gan tā imobilizācija hifu šūnās, gan transports uz saimniekaugu. Samazinoties amonija jonu koncentrācijai augsnē, izmanās nitrifikācijas procesa norise. Slāpekļa savienojumu apriti vezikulāri arbuskulārās

mikorizas sēnes ietekmē, arī uzlabojot augsnes struktūru. Sēņu hifām veidojot agregātus ar augsnes daļiņām uzlabojas aerācija un vienlaicīgi inhibējas denitrifikācijas process, kas varētu izraisīt slāpekļa daudzuma samazināšanos (Mäder, Fliessbach, Dubois, 2002; Rilling, Mummey, 2006).

1.3. Trīspusējās simbiozes veidošanās un funkcionēšanas nosacījumi

Trīspusējās simbiozes veidošanās starp augu, gumiņbaktēriju un mikorizas sēni ir dabā sastopams process, tomēr praksē kultūraugu dubultinokulāciju vēl plaši nelieto, lai gan tauriņziežu audzēšanā sēklu pirmssējas apstrādi ar gumiņbaktērijām praktizē plaši. Tirgū sastopami arī dažādi mikorizas sēņu preparātu ražotāji (piemēram, Symbion®, MycoApply®, Mycorrhizal Applications Inc.), tomēr pašlaik šādus preparātus pārsvarā lieto reģionos, kur augi pakļauti sausuma stresam.

Trīspusējā simbioze ir pētīta maz, bet vēl mazāk ir datu par gumiņu kolonizēšanos ar mikorizas sēnēm. Laboratorijas apstākļos mikorizas sēnes kolonizē gumiņus, tomēr nav skaidrs, vai lauka apstākļos šāda kolonizācija notiek, cik atšķirīga mikorizas sēņu asociācija ieviešas gumiņā, jo pats gumiņš ir specifisks, no pārējiem auga audiem atšķirīgs veidojums. Šeublinas (Scheublin, Karyn, Young, 2004) pētījumos novērots, ka sakņu gumiņos konstatētās mikorizas sēņu asociācijas bija atšķirīgas no saknēs esošajām. Šie pētījumi atbilst hipotēzei, ka trīspusējai simbiozei ir būtiska mikorizas sēņu funkcionālā daudzveidība.

Ir vairāki skaidrojumi tam, ka gumiņos ir atšķirīgs mikorizas sēņu sastāvs. Viens no tiem ir, ka iespēja saņemt vienu vai vairākus barības elementus (piem., P, Cu, Zn), kas veicina AM sēņu vēlmi kolonizēt gumiņus. Gumiņiem pašiem, salīdzinot ar augu, ir relatīvi augstākas prasības pēc barības elementiem. Analizējot gumiņos sastopamo mikorizas sēņu sastāvu, noskaidrots, ka arī augstāka slāpekļa koncentrācija gumiņā var veicināt atsevišķu sēņu ieviešanos tajos. AM sēnes var iesaistīties arī auga sakņu kolonizēšanas procesā ar gumiņbaktērijām, jo abiem procesiem, daži nozīmīgi posmi ir līdzīgi, piemēram, atbildes reakcijas uz auga sakņu izdalītajiem flavonoīdiem. Pākšaugu mutanti, kuri nevar izveidot simbiozi ar gumiņbaktērijām, ar grūtībām vai vispār nevar izveidot simbiozi ar AM sēnēm, kā arī gumiņbaktēriju signāli, kas veicina auga sakņu eksudātu izdalīšanos var ietekmēt AM simbiozes veidošanos (Xie, Staehelin, Vierheilig, et al., 1995; Albrecht, Geurts, Bisseling, 1999; Scheublin, Karyn, Young, 2004). Kaut arī gumiņbaktērijas un mikorizas sēnes var veidot simbiotiskas attiecības ar pākšaugiem, to dzīves cikli nav identiski (1.1. tabula).

Ir pieņemts, ka N_2 fiksācijai labvēlīgo efektu kolonizācija ar AM sēnēm panāk, uzlabojot gumiņu apgādi ar fosforu, tādējādi dubultojot AM pozitīvā ietekme arī uz augu (George, Jakobsen, 1995). Daudzi pētījumi ir vērsti uz netiešo mijiedarbību starp AM un gumiņbaktērijām, tomēr ir ziņojumi, ka AM var tieši stimulēt gumiņu funkcijas (Bethlenfalvay, 1992; Antunes, Goss; 2005).

Dabīgi augsnē esošo simbiotisko mikroorganismu aktivitāte, kā arī sēklu inokulācijā lietoto mikroorganismu mijiedarbība ar augu un rizosfēras mikroorganismiem var izmainīt dažādu augsnes bioķīmisko reakciju norisi. Auga sakņu, kā arī mikroorganismu izdalījumos esošie organiskie savienojumi un fizioloģiski aktīvās vielas ietekmē augsnē notiekošo bioķīmisko procesu norisi, piemēram, izmainot dažādu fermentu koncentrāciju un aktivitāti augsnē (Siczek, Lipiec, 2016).

Fotosintēzes produktu pieejamība mikrosimbiontiem un augam ir viens no būtiskākajiem limitējošajiem faktoriem, kura ietekme uzsvērta virknē publikāciju (Denison, 2000; Treseder, Allen, 2002; Kiers, Denison, 2008; Kaschuk, Kuyper, Leffelaar et al., 2009). Gadījumos kad fotosintēzes produktivitāte nav pietiekoša, lai apgādātu visus simbiotiskās sistēmas komponentus ar oglekļa savienojumiem, tie kļūst par konkurentiem. Simbiotiskās sistēmas veidošanās laikā augam nepieciešams ar fotosintēzes produktiem nodrošināt, kā savas, tā arī mikrosimbiontus vajadzības. Šajā augu augšanas posmā var konstatēt augu

augšanas aizkavēšanos (Safikhani, Morad, Reza, 2013). Izveidojoties efektīvai simbiozei, gumiņbaktērijas un mikorizas sēnes nodrošina augu ar papildu minerālelementiem, kas nodrošina fotosintēzes intensitātes paaugstināšanos (Kaschuk et al., 2009).

Mikrosimbionti uzlabojot auga nodrošinājumu ar minerālelementiem, paaugstinot ūdens aiztures spēju, novērš fotosintēzei nelabvēlīgu apstākļu veidošanos.

1.1.tabula

Gumiņbaktēriju un mikorizas sēņu dzīves ciklu salīdzinājums
(pēc Denison, Kiers, 2011)

Dzīves posms	**Gumiņbaktērijas**	**Arbskulārās mikorīzas sēnes**
Taksonomija	α un β proteobaktērijas	sēnes no *Glomeromycota*
Simbiozes nepieciešamība	Nav obligāta	Obligāta sēnei
Ieguvums augam	Nodrošinājums ar N	Nodrošinājums ar N, P, H_2O, aizsardzība u.c.
Simbiontu līdzāspastāvēšana	Var būt vairāki baktēriju celmi vienam augam	Var būt vairāki sēņu celmi vienam augam
Izdzīvošana, ja nav saimniekauga	Saprofītisks dzīvesveids, izmanto augsnes C vai sakņu eksudātus.	Veido sporas.
Stratēģija dzīvei augsnē	Metaboliski aktīvu un neaktīvu formu veidošana.	Sporu dīgšana, pārrauta micēlija atjaunošana, ģenētiski atšķirīgu hifu savienošanās (anastemoze).
Stratēģija simbiozes laikā.	Resursu pārdalīšana starp N_2 fiksāciju un baktēriju reproducēšanos.	Simbioze ar vairākiem saimniekaugiem vienlaicīgi, P saglabāšana hifu tīklojumā

Simbiotiskās asociācijas partneru funkcionēšanai nepieciešamo "izmaksu" aprēķiniem veltīti vairāki pētījumi. "izmaksu - ieguvumu" un oglekļa savienojumu ierobežojumu teorijas pieļauj, ka augi nomāc simbiozi ikreiz, kad mikrosimbionts efektīvi nepiegādā barības vielas. (Kiers, Denison, 2008; Kaschuk, Kuyper, Leffelaar et al., 2009; Kaschuk, Leffelaar, Giller, et al., 2010). Pārsvarā konstatēts, ka laba minerālelementu nodrošinājuma gadījumā auga fotosintētiskā kapacitāte ir pietiekoši liela, lai nodrošinātu ar fotosintēzes produktiem arī mikrosimbiontus, tāpēc simbiotisko augu augšanu biežāk ierobežo neefektīvi gumiņbaktēriju vai mikorizas sēņu celmi (Kaschuk, Leffelaar, Giller, et al., 2010). Konstatēts, ka atšķiras arī efektīvo un mazāk efektīvo gumiņbaktēriju slāpekļa saistīšanas "maksa". Tvarijs un Heičels (Twary, Heishei, 1991) izmēģinājumos konstatējuši, ka efektīvajam baktēriju celmam bija nepieciešami 5.9 moli C uz katru saistīto N molu, bet mazāk efektīvajam 9.4 moli C uz molu N, tomēr sausnas uzkrāšanās par 21% augstāka bija augiem, kuri apstrādāti ar mazāk efektīvo baktēriju celmu. Sēklu briešanas laikā, simbiotiski saistītā N plūsmas aizkavē fotosintēzē iesaistīto fermentu degradāciju un lapu novecošanos, tādejādi stimulējot fotosintēzi. Inokulācija ar efektīviem gumiņbaktēriju un mikorizas sēņu celmiem rezultējas ražas pieaugumā bez kaitējuma kvalitātei (Kaschuk, Leffelaar, Giller, et al., 2010). Teorētiski oglekļa "maksa" N_2 fiksācijā ir robežās starp 3.3 – 6.6 g C uz katru g saistītā slāpekļa gramu, atkarībā no pākšauga - gumiņbaktērijas kombinācijas, bet NO_3^- reducēšanā nepieciešamais nepārsniedz 2.5 g C uz katru g slāpekļa. (Atkins, 1984; Minchin, Witty, 2005). Apkopojot

dažādu autoru izmēģinājumu rezultātus Kaščuks (Kaschuk, Kuyper, Leffelaar, et al., 2009) secināja, ka tikai zirņiem (*Pisum sativum*) "maksa" par slāpekļa simbiotisko saistīšanu ir mazāka nekā par NO_3^- reducēšanu, attiecīgi 5.9 un 6.2 g C $(gN)^{-1}$, bet galegai (*Glycine max*) šī "maksa" attiecīgi ir 7.1 un 4.3 g C $(gN)^{-1}$, baltajai lupīnai (*Lupinus albus*) – 10.2 un 8.1 g C $(gN)^{-1}$, vignai (*Vigna unguiculata*) – 12.3 un 3.7 g C $(gN)^{-1}$.

Gan gumiņbaktērijas, gan mikorizas sēnes saņem no auga 4 – 16% no fotosintēzes produktiem savas aktivitātes nodrošināšanai. Savukārt mikrosimbionti uzlabo auga nodrošinājumu ar minerālelementiem. Ir dati, ka AM sēnes var uzņemt arī nitrātu un amonija jonus, kurus asimilē un arginīna formā pārvieto pa micēliju, bet, salīdzinot ar ektomikorizas sēnēm, šis apjoms nav tik liels, lai nodrošinātu augu ar nepieciešamo slāpekļa daudzumu. (George, Jakobsen, 1995; Smith, Read, 2008). Analizējot iezīmēto $^{14}CO_2$ Harriss (Harris, Pacovsky, Paul, 1985) noteica, ka mikorizētās saknes tērē 199 g C uz katru uzņemto fosfora gramu, bet nemikorizētās, saņemot N mēslojumu, vai inokulētas ar gumiņbaktērijām tērē attiecīgi 129 un 127 g C (g P) $^{-1}$. Savukārt Smits un Rīds (Smith, Read, 2008) uzskata, ka C "maksa" rēķinot uz hifu garumu rezultātā sanāk mazāka, jo hifas ir tievākas par auga saknēm, tātad vienāda masa var aizņemt lielāku apjomu. Oglekļa savienojumu "maksu" nosaka augam izveidoto iekšējo struktūru (vezikulu, arbuskulu, sporu, hifu) un ārējā micēlija (arī sporu) augšana un uzturēšana, jo efektīvai VAM simbiozei nepieciešams plašs hifu tīklojums.

Mazāk aprēķinu ir par mikorizas sēņu C "izmaksu", bet vairums saistīts ar C "izmaksām" tieši proporcionāli fotosintēzes intensitātei. Sēņu struktūru frakcija mikorizēto sakņu biomasā palielinās par 2 – 13% sojai, 6 – 7% dziedzerainajam āboliņam un 0.5 – 5% pupām atkarībā no mikorizas sēņu sugas, auga attīstības, augsnē pieejamā P un augšanas apstākļiem. Dubultsimbiozei varētu būt papildu efekts uz C "izmaksām", jo AM simbioze, mazinot P un mikroelementu deficītu, netieši stimulē N_2 saistīšanu, kā arī, mainot minerālā N uzņemšanu uz N_2 fiksēšanu, palielinās prasība pēc P (Smith, Read, 2008). Ja simbiotiskā sistēma nesaņem, vai saņem nepietiekoši, nepieciešamo C savienojumu apjomu, tad simbiotisko augu augšana var aizkavēties, salīdzinot ar nesimbiotiskajiem augiem. Tomēr ir fakti, ka, palielinoties simbiozei nepieciešamajam C apjomam, tiek intensificēta arī fotosintēze, kā rezultātā saistītā oglekļa apjoms laika vienībā pret uzņemto minerālelementu vienību palielinās, tādejādi palielinās barības elementu izmantošanas efektivitāte (Harris, Pacovsky, Paul, 1985; Bethlenfalvay, Newton, 1991) Veicot eksperimentus ar inokulētu un neinokulētu āboliņu, Vrings ar līdzautoriem (Wright, Scholes, Read, 1998b; Bago, Pfeffer, Shachar-Hill, 2000) novēroja, ka jauniem mikorizētiem augiem intensificējās fotosintēze, pielielinājās lapu īpatnējā virsma un sausna. Izmēģinājuma laikā konstatēts, ka mikorizētajiem augiem ir būtiski augstāka fotosintēzes intensitāte, sevišķi variantā bez papildus mēslojuma. Fotosintēzes intensitāte palielinājās par 393% (7. dienā), 101% (14. dienā), 15% (21. dienā), bet ar papildmēslojumu attiecīgi 131%, 106% un 19 %. Kā norāda autori fotosintēzes intensitātes palielināšanās nenodrošināja sausnas pieaugumu, kas liecina par asimilātu plūsmas novirzīšanu simbiontiem saknēs. Savukārt, analizējot dubultinokulācijas efektu uz pupiņu augšanu substrātā ar atšķirīgu pieejamā fosfora daudzumu (1µmol un 2mM), novēroja, ka variantā ar zemāku fosfora līmeni gumiņu masas pieaugums aizkavējas līdz brīdim, kad sakņu kolonizācija ar mikorizas sēnēm sasniedz plato stadiju, jo gumiņu darbībai nepieciešams relatīvi augsts nodrošinājums ar fosforu. Līdz 17. dienai pēc sadīgšanas konstatēja fotosintēzes produktu pastiprinātu plūsmu uz saknēm, kā arī variantos ar zemāku fosfora nodrošinājumu, sakņu elpošanas intensitātes paaugstināšanos. Izmēģinājuma beigās (31. dienā pēc sadīgšanas) mikorizēto augu gumiņu sausna bija 7.2 reizes lielāka salīdzinot ar nemikorizētajiem augiem (Mortimer, Perez-Fernandez, Valentine, 2008). Turpretī Vriga (Wright, Read, Scholes, 1989a) izmēģinājumos ar āboliņu (*Trifolium repens* L.) starp mikorizēto un nemikorizēto augu gumiņu sausnu nenekonstatēja būtisku atšķirību. Gumiņu sausnu noteica vairākkārtīgi - 18 dienas pēc inokulēšanas, viena auga gumiņu sausna mikorizētā un nemikorizētā variantā bija attiecīgi 2.4 ± 0.3 mg un 2.0 ± 0.2 mg g^{-1}, bet pēc 51. dienas - 31.7 ± 5.9 mg un 29.2 ± 2.3 mg g^{-1}. Sausnas daudzuma atšķirības starp mikorizētiem

un nemikorizētiem augiem konstatētas āboliņam augšanas sākumā (līdz 30. dienai) variantā, kur nebija lietots papildmēslojums. Mikorizētajiem augiem sausnas saturs bija lielāks. Dzinumu un sakņu sausnas attiecība norādīja, ka simbiozes veidošanās nenotiek uz sakņu biomasas rēķina. Augu atbildes reakciju uz dubultsimbiozi ietekmē kā inokulācijai lietotie mikroorganismu celmi, tā arī saimniekauga suga un saderīga mijiedarbība starp simbiontiem. Neraugoties uz specifiskuma trūkumu AM sēņu saimniekauga izvēlē, atšķiras to spēja apgādāt saimniekaugu ar minerālelementiem, pat ja kolonizācijas apjoms ir vienāds (Francini, Azcón, Mendes, 2010). Izmēģinājumos ar aunazirņiem, pārbaudot simbiozes efektivitāti, konstatēts inokulācijai lietoto *Rhizobium* celmu un *Glomus* sugu kombināciju efekts. Tas norāda uz selektīvu un specifisku mijiedarbību starp gumiņbaktērijām un mikorizas sēnēm. Konstatēts, ka mijiedarbība starp abiem mikrosimbiontiem atkarīga no to attīstības posma saknē (Mortimer, Perez-Fernandez, Valentine, 2008). Pētot dubultinokulācijas ietekmi uz pupiņu augšanu sausuma apstākļos, konstatēja mikrosimbiontu pozitīvu efektu uz augu minerālvielu uzņemšanu un auga nodrošinājumu ar ūdeni. Tomēr izmēģinājuma autoriem neizdevās konstatēt šādu efektu ar visām pārbaudītajām baktēriju, mikorizas sēņu un pupiņu šķirņu kombinācijām. Inokulācija tikai ar gumiņbaktērijām vairākos variantos uzrādīja inhibējošu ietekmi uz augu augšanu, nekā dubultinokulācija (Francini, Azcón, Mendes, 2010). Novērots, ka agrīnajās kolonizācijas stadijās AM sēnes var aizkavēt gumiņu veidošanos, sevišķi, ja augsnē ir zems fosfora līmenis, bet sakņu kolonizācija notiek ļoti intensīvi (Mortimer, Perez-Fernandez, Valentine, 2008). Iegūti rezultāti arī par pretēju ietekmi, ka gumiņbaktēriju klātbūtne saknēs samazina mikorizēto saknes daļu (Jia, Gray, Straker, 2004).

Lai simbiotiskā asociācija izveidojoties nodrošinātu kultūraugu augšanu un ražas pieaugumu, jābūt optimālai augu fizioloģisko procesu norisei. Slāpekļa un fosfora nodrošinājums ietekmē CO_2 asimilāciju fotosintēzes procesā, bet simbiotiskā N_2 saistīšana ir atkarīga no fotosintēzes intensitātes un fosfora nodrošinājuma gumiņos. Izmēģinājumos ar pupām novērots, ka mikorizas sēņu klātbūtne uzlaboja minerālelementu uzņemšanu un biomasas veidošanos (Jia, Gray, Straker, 2004).

Pupu inokulācija tikai ar gumiņbaktērijām var izrādīties neveiksmīga, ja augam un baktērijām trūkst kāda minerālelementa. Tāpēc dienvidu reģionos, kur biežāk sastopamas augsnes ar zemu organiskās vielas saturu un minerālelementu deficītu plašāk, tiek pētīta dubultinokulācijas izmantošana pākšaugu audzēšanā. Veicot veģetācijas trauku izmēģinājumus El-Gandours ar līdzautoriem (El-Ghandour, El-Sharawy, Abdel-Moniem, 1996) noskaidroja, ka inokulētajām pupām sausna palielinājās vidēji par 16 līdz 34% atkarībā no lietotā fosfora mēslojuma veida. Būtiskāks sausnas pieaugums konstatēts augiem ar dubultinokulāciju.

Salīdzinot ziemas un pavasara pupas konstatēts, ka ziemas pupas uzkrāj nedaudz vairāk proteīnu, kas liecina, ka ūdens deficīts izraisa proteīna satura pazeminašanos sēklās. Līdzīga sausuma ietekme ir konstatēta arī sojai, kur izmēģinājumā ar atšķirīgu laistīšanas režīmu (14 un 7 dienu laistīšanas intervālu), zemāks proteīna saturs, bija augiem, kurus laistīja tikai ik pēc 14 dienām. Tādejādi pupu audzēšanas agrotehniskajiem pasākumiem jābūt virzītiem tā, lai optimizētu pupu augšanas apstākļus, kā rezultātā uzlabotos arī galaprodukta vērtība. Inokulēšana ar gumiņbaktērijām un īpaši mikorizas sēnēm tiek uzskatīts par efektīvu līdzekli nelabvēlīgu vides apstākļu ietekmes mazināšanai (Kucey, Paul, 1982).

Kopsavilkums

Pasaulē joprojām ir aktuāla pākšaugu audzēšanas tehnoloģiju pilnveidošana. Intensīvi norit arī simbiotisko mikroorganismu pētniecības darbs, jo mūsdienu metodes ļauj sīkāk izpētīt dažādu mikroorganismu aktivitāti un mijiedarbību augsnē, simbiotisko sistēmu veidošanos, to izmantošanu lauksaimniecībā. Arī mikroorganismi tiek pētīti, analizējot to lomu un mijiedarbību ekosistēmu funkcionēšanā. Agroekosistēmās aktuālāka kļūst videi draudzīga saimniekošana, tāpēc aizvien plašāk pēta arī dažādas mikrobioloģisko preparātu pielietošanas iespējas, kuras varētu samazināt nepieciešamību pēc minerālmēslojuma, ķīmiskajiem augu aizsardzības līdzekļiem, augu augšanas regulatoriem.

Mikroorganismu pielietošana lauksaimniecībā pamatojas uz mikroorganismu simbiotisko asociāciju funkcionēšanas likumsakarībām dabīgās biocenozēs. Simbiotiskajām attiecībām ir ne tikai dažādas izpausmes, bet arī atšķirīgs attiecību ciešums starp simbiozes partneriem, kas variē no daļēji obligātas līdz obligātai simbiozei. Viens no pirmajiem pētītajiem augu un mikroorganismu simbiozes veidiem bija gumiņbaktēriju un tauriņziežu simbioze, kas ļāva paaugstināt pākšaugu ražu, nepalielinot slāpekļa minerālmēslojuma devas. Pētījumi aizsākās ar procesa bioloģiskās un bioķīmiskās norises izzināšanu, kā arī gumiņbaktēriju celmu efektivitātes salīdzināšanu. Noskaidrots, ka gumiņbaktēriju un tauriņziežu simbiozes efektivitāti ietekmē arī augsnes īpašības un tās apstrāde. Tomēr tikai pēdējās desmitgadēs lielāka uzmanība tiek pievērsta bioloģiskajiem procesiem augsnē, to ietekmei uz gumiņbaktēriju aktivitāti. Latvijā intensīvi pētīta gumiņbaktēriju izplatība dažādās augsnēs, simbiozes veidošanās gan ar viengadīgajiem, gan daudzgadīgajiem tauriņziežiem, bet nav pētījumu par gumiņbaktēriju un citu augsnes mikroorganismu mijiedarbību. Augsnes mikroorganismu daudzveidības un aktivitātes ietekme uz gumiņbaktēriju un pākšaugu tai skaitā pupu, simbiozes veidošanos, pārsvarā tiek pētīti dienvidu reģionos, kur ir lielākas sējplatības un augi biežāk pakļauti sausuma stresam. Līdz ar audzēšanas platību palielināšanos arī mērenā klimata zonā, intensīvāki kļūst pētījumi par augsnes mikroorganismu mijiedarbību.

Pākšaugi var veidot simbiozi ne tikai ar gumiņbaktērijām, bet arī ar mikorizas sēnēm. Veidojoties atbilstošai simbiotiskajai asociācijai, iespējams palielināt kultūraugu ražu, samazinot nelabvēlīgu vides faktoru ietekmi, tomēr dažādu simbiotiskās sistēmas komponentu mijiedarbība un tās regulācija joprojām ir līdz galam neizpētīts jautājums. Pasaulē augu un augsnes mikroorganismu simbiotiskās attiecības tiek pētītas aizvien intensīvāk, bet rezultāti bieži vien ir pretrunīgi. Pētījumos konstatē sugu specifisku mijiedarbību starp simbiontiem. Viens no faktoriem, kas nosaka attiecību specifiskumu, ir bioķīmiskie signāli, auga sakņu un mikroorganismu izdalītie fenolu grupas savienojumi. To kvalitatīvais un kvantitatīvais sastāvs var gan veicināt, gan aizkavēt simbiotisko attiecību veidošanos. Tomēr to iedarbības mehānisms pilnībā vēl nav noskaidrots, jo atšķiras dažādos reģionos audzētie pākšaugi.

Dienvidu reģionos pētījumu par gumiņbaktēriju un mikorizas sēņu kompleksu lietošanu pākšaugu sēklu inokulēšanai ir vairāk, jo izteiktāk izpaužas mikroorganismu pozitīvā ietekme uz augu produktivitāti. Tomēr arī mērenajā klimatā ir konstatējama dubultinokulācijas pozitīvā ietekme, sevišķi, ja pākšaugu audzēšanai lieto videi draudzīgas metodes, kuras ļauj samazināt minerālmēslojuma lietošanu, bet saglabā augsnes bioloģisko daudzveidību. Ir pieņemts, ka N_2 fiksācijai labvēlīgo efektu kolonizācija ar mikorizas sēnēm panāk, uzlabojot gumiņu apgādi ar fosforu un auga ūdens nodrošinājumu, kas ir īpaši svarīgi ražas veidošanai kritiskajos auga ontoģenēzes posmos. Daudzi pētījumi ir vērsti uz netiešo mijiedarbību starp mikorizas sēnēm un gumiņbaktērijām, tomēr ir ziņojumi, ka mikorizas sēnes var tieši stimulēt gumiņu funkcijas. Latvijā pupas audzē gan bez sēklu inokulēšanas, gan inokulējot sēklas ar gumiņbaktērijām. Praktiski netiek lietota sēklu dubultinokulācija, jo nav noskaidrots, vai vienmēr mikorizas sēnēm ir labvēlīga ietekme uz gumiņbaktēriju aktivitāti. Joprojām aktuāls ir jautājums par inokulācijas nepieciešamību un efektivitāti, jo, mainoties agroklimatiskajoem apstākļiem un kultivēšanas paņēmieniem, izmainās arī augsnes mikroorganismu mijiedarbība.

Publicētie dati par mikorizas sēņu un pākšaugu, kā arī trīspusējās simbiozes ietekmi uz ražas veidošanos ir pretrunīgi. Simbiotiskās sistēmas efektivitāti var izmainīt arī auga bioķīmiskie procesi, fotosintēzes produktu pieejamība mikrosimbiontiem. Gadījumos, kad fotosintēzes produktivitāte nav pietiekoša, lai ar oglekļa savienojumiem apgādātu visus simbiotiskās sistēmas komponentus, tie kļūst par konkurentiem. Limitējošais faktors, augstāku ražu iegūšanai, bieži vien ir augiem nepieejamie minerālelementi augsnē, ko var novērst ar mikroorganismu darbības aktivizēšanu. Latvijas agroklimatiskajos apstākļos nav noskaidrots, vai iespējams lietoto gumiņbaktēriju celmu efektivitāti paaugstināt sēklas inokulējot arī ar mikorizas sēnēm. Nav datu, vai veidojoties piemērotiem vides apstākļiem mikorizas sēņu un gumiņbaktēriju darbībai, var paaugstināt pupu ražu un tās kvalitāti, vienlaikus nodrošinot arī labvēlīgu ietekmi uz augsnes kvalitāti.

2. MATERIĀLI UN METODIKA

2.1. Izmēģinājumos lietoto pupu (*Vicia faba* L.) šķirnes un mikroorganismi

Pupas (*Vicia faba* L.) ir tauriņziežu dzintas (*Leguminosae* Juss.), vīķu ģints (*Vicia* L.) augs. Latvijā pārsvarā audzē lauka pupas, bet rupjsēklu – mazākās platībās.

Pupu variatātes atšķiras ar sēklu lielumu:

- sīksēklu pupas (lopbarības, lauka) – 1000 sēklu masa 600 – 800 g,
- vidēji rupjsēklu (zirgu) – 1000 sēklu masa 600 – 800 g,
- rupjsēklu (cūku, dārza) – 1000 sēklu masa >800 g.

Izmēģinājumos par gumiņbaktēriju efektivitāti un dubultinokulācijas ietekmi uz ražas veidošanos iekļautas vairākas šķirnes:
Sīksēklu pupu *Vicia faba var. minor* šķirnes ‘Lielplatones’, 'Fuego', 'Boxer', 'Albus', 'Laura', 'Alexia' un rupjsēklu pupu *Vicia faba var. major* šķirnes ‘Karmazyn’ un ‘Bartek’.

Izmēģinājumiem izvēlēta vietējās selekcijas šķirne ‘Lielplatone’ un vairākas biežāk audzētās sīlsēklu šķirnes. Rupjsēklu pupām izvēlētas divas šķirnes, kuras atšķīrās ar sēklu krāsu.

Izmēģinājumi iekārtoti veģetācijas traukos (VT) kontrolētos apstākļos un lauka izmēģinājumos (LI). Temperatūras ietekmes novērtēšanai simbiozes veidošanās procesā iekārtoti izmēģinājumi kontrolētos apstākļos fitokamerā un siltumnīcā.

Pupu sēklu inokulācija simbiotisko sistēmu efektivitātes novērtēšanai veikta ar gumiņbaktērijām un/vai mikorizas sēnēm. Izmēģinājumos iekļauto gumiņbaktēriju celmu saraksts, izmēģinājuma veids un vieta apkopoti tabulā 2.1.

2.1. tabula

Gumiņbaktēriju efektivitātes izmēģinājumos iekļautie baktēriju celmi un izmēģinājuma vietas dažādos gados**

Gads	Izmēģinājumu vieta	Izmēģinājumu Nr.	Gumiņbaktēriju celms							
			RP003	RP023	RP110	RV407	RV505	R	R1	R2
2014	Ķemeri	LI2014_A	-	LI	LI	LI	LI	-	-	-
	Vaivadi	LI2014_B	-	LI	LI	LI	LI	-	-	-
	Jelgava	LI2014_C VT2014	-	LI*, VT*	LI, VT	LI*, VT*	-	-	-	-
2015	Jelgava	LI2015_A VT2015	-	LI*, V T*	-	LI*, VT*	-	-	-	-
	Sece	LI2015_B	-	LI*	-	LI*	-	-	-	-
	Vaidava	LI2015_C	LI	-	-	LI	-	-	-	-
2016	Pēterlauki	LI2016_A	-	LI*	-	LI*	-	-	-	-
	Jelgava	VT2016	-	VT*	-	TI*	-	-	VT*	VT*
	Pūre	LI2016_B	-	LI*	-	LI*	-	-	-	-
2017	Poķi	LI2017	-	-	-	-	-	LI*	-	-
	Jelgava	VT2017	-	-	-	-	-	VT*	-	-

* - norāda izmēģinājumus, kuros lietots arī mikorizas sēņu preparāts (M)
** Gumiņbaktēriju celmi no LLU Augsnes un augu zinātņu institūta kolekcijas:
RP003 – izdalīts no 2011. gadā no Stendē ievāktu zirņu saknēm.
RP023– izdalīts 1962. gadā no Vecaucē ievāktu zirņu saknēm.
RP110– izdalīts 1963. gadā no Pļaviņās ievāktu pupu saknēm.

RV407 – izdalīts 1972. gadā no Pēterlaukos ievāktu pupu saknēm.
RV505 – izdalīts 1973. gadā no Dimzās ievāktu pupu saknēm.
R – RP023 un RV407 baktēriju celmu asociācija
R1 – RP003, RP023 baktēriju celmu asociācijas
R2 – RV407, RV505 baktēriju celmu asociācijas
RP023M – dubultinokulācija ar gumiņbaktēriju celmu RP023 un mikorizas sēnēm.
RV407M – dubultinokulācija ar gumiņbaktēriju celmu RV407 un mikorizas sēnes.
RM – dubultinokulācijai lietots gumiņbaktēriju celmu maisījums un mikorizas sēnes.

LI – lauka izmēģinājums
VT – izmēģinājums veģetācijas traukos

Sēklu inokulēšana ar gumiņbaktērijām veikta pirms sējas. Lauka un veģetācijas trauku izmēģinājumos nesterilizētas sēklas 30 min mērcētas gumiņbaktēriju suspensijā ar mikroorganismu koncentrāciju 10^6 šūnu 1 mL. Lauka izmēģinājumiem (LI2016_A, LI2017) pirms sējas sēklas apžāvētas, lai būtu iespējams sēt ar sējmašīnu.

Mikorizas sēņu preparāts saņemts no Čehijas firmas Symbiom® un satur trīs mikorizas sēņu sugas – *Glomus claroideum, G. intraradices* un *G. mosseae.* Novērtēta mikorizas sēņu ietekme uz pupu un gumiņbaktēriju simbiozes efektivitāti, kā arī ražas veidošanos un tās kvalitāti.

Mikorizas sēņu preparāts iestrādāts augsnē vienlaicīgi ar sēju gan veģetācijas trauku, gan lauka izmēģinājumos. Sausā, granulētā preparāta deva 45 g m^{-2}.

Izmēģinājumos iekļauti varianti, kuros sēklas, apstrādātas tikai ar gumiņbaktērijām vai mikorizas preparātu, gan varianti ar dubultinokulāciju

2.2. Veģetācijas trauku un lauka izmēģinājumu raksturojums

Veģetācijas traukos izmēģinājumi iekārtoti LLU Augsnes un augu zinātņu institūta teritorijā. Substrāts izmēģinājumiem ņemts no teritorijas, kur iepriekš nav bijuši izmēģinājumi ar gumiņbaktērijām, tāpēc agroķīmiskais un granulometriskais raksturojums katru gadu atšķīrās. Substrāta agroķīmiskās analīzes veiktas sālsskābes izvilkumā un rezultāti apkopoti 2.2. tabulā.

Katru gadu izmēģinājumi iekārtoti 8 (astoņos) atkārtojumos, no kuriem četri analizēti augu ziedēšanas fāzē, bet četros pupas audzētas līdz ražai. Katrā 5 litru veģetācijas traukā sēja 6 sēklas. Pēc sēklu sadīgšanas katrā veģetācijas traukā atstātas ne vairāk kā 5 pupas. Veģetācijas trauki novietoti lauka apstākļos uz koka paliktņiem. Ap veģetācijas traukiem aplikts balts agrotīkls, lai novērstu trauku pārkaršanu. Augi 1 – 3 reizes diennaktī automātiski laistīti ar ūdensvada ūdeni, mainot laistīšanas režīmu atkarībā no auga attīstības fāzes un meteoroloģiskajiem apstākļiem. Vienā laistīšanas reizē dodot 200 - 450 mL ūdens uz m^{-2}.
2014. gadā izmēģinājumi iekārtoti 2. maijā, 2015. gadā – 13. maijā, 2016. gadā – 3. maijā un 13. maijā, bet 2017. gadā 2. maijā.

Ražas uzskaitei augi novākti septembrī.

2.2. tabula

Veģetācijas trauku izmēģinājumos lietotā substrāta agroķīmiskais raksturojums

(mg L^{-1})

Parametri	2014 (VT2014)	2015 (VT2015)	2016 (VT2016)	2017 (VT2017)	Optimāli aktīvās veģetācijas periodā*
Granulometriskais raksturojums	smilšmāls		viegls māls	mālsmilts	
N	50	90	68	81	100 – 140
P	512	567	589	251	150 – 250
K	130	285	270	125	200 – 350
Ca	12700	25850	18150	2370	3000 – 8000
Mg	3105	3490	2965	595	600 – 1200
S	100	175	68	34	40 – 100
Fe	1350	1645	1815	1035	800 – 1500
Mn	140	185	180	170	40 – 90
Zn	9.50	9.50	8.00	21.00	5 – 20
Cu	5.50	6.50	6.00	4.30	2.50 – 4.50
Mo	0.06	0.04	0.04	0.09	0.08 – 0.20
B	0.50	1.30	1.10	0.50	0.80 – 1.50
pHKCl	7.50	7.48	7.52	6.88	6.50 – 7.50
EC mS cm^{-1}	1.38	0.69	0.67	0.29	1.50 – 2.50

*Elementu saturs pēc LU Bioloģijas institūta Agroķīmijas laboratorijas rekomendācijām

Lauka izmēģinājumi

2014. gadā

LI2014_A – izmēģinājums iekārtots Ķemeros piemājas saimniecībā. Audzētas divas šķirnes ‘Bartek’ un ‘Karmzyn’. Pupas sētas divrindu sējā, četros atkārtojumos. Varianti izkārtoti randomizēti. Katrā rindā iesētas 10 sēklas. Starp lauciņiem atstāta 50 cm izolācijas zona. Papildmēslojums nav dots.

LI2014_B - izmēģinājums iekārtots Olaines novada d/s Vaivadi. Audzētas divas šķirnes ‘Bartek’ un ‘Karmzyn’. Pupas sētas divrindu sējā, četros atkārtojumos. Varianti izkārtoti randomizēti. Katrā rindā iesētas 10 sēklas. Starp lauciņiem atstāta 50 cm izolācijas zona. Papildmēslojums nav dots.

LI2014_C – izmēģinājums iekārtots Jelgavā LLU Augsnes un augu zinātņu institūta teritorijā. Pupas sētas divrindu sējā, četros atkārtojumos. Varianti izkārtoti randomizēti. Katrā rindā iesētas 10 sēklas. Starp variantiem 1m izolācijas zona. Izolācijas zonā iesēti ziemas kvieši. Audzētas pupas ‘Bartek’.

2015. gadā

LI2015_A – izmēģinājums iekārtots Jelgavā LLU Augsnes un augu zinātņu institūta teritorijā 30. aprīlī. Sēts trīsrindu sējā, starp rindām 20 cm. Katra lauciņa garums 1 m. Izmēģinājums četros atkārtojumos. Starp variantiem un atkārtojumiem 1m izolācijas zonā, kurā bija iesēti ziemas kvieši. Audzētas četras šķirnes ‘Lielplatone’, ‘Fuego’, ‘Bartek’ un ‘ Karmazyn’.

LI2015_B – izmēģinājums iekārtots Jaunjelgavas novada, Seces pagastā. Izmēģinājums iekārtots četros atkārtojumos. Katra lauciņa lielums 1 m^2. Pupas iesētas 24. aprīlī. Sētas 50 dīgtspējīgas sēklas uz m^2., Audzētas šķirnes ‘Boxer’ un ‘Fuego’.

LI2015_C - izmēģinājums iekārtots Vaidavas pagastā. Pupas sētas 11. aprīlī ar sējmašīnu. Katrs variants četros atkārtojumos, viena lauciņa lielums 4 × 48 m. Audzētas šķirnes ‘Alexia’, ‘Albus’, ‘Laura’, ‘Boxer’, ‘Fuego’.

2016. gadā .

LI2016_A - izmēģinājums iekārtots LLU Mācību un pētījumu saimniecībā “Pēterlauki” 2. maijā. Lauciņu lielums 7 × 1.5 m. Izmēģinājums četros atkārtojumos Pupas sētas ar sējmašīnu. Izsējas norma šķirnei 'Lielplatone' un 'Fuego' 45 sēklas uz m^2.

LI2016_B - Pūres DI iekārtotajā izmēģinājumā ar diviem dārza pupu genotipiem analizēta mikorizācijas ietekme. Izmēģinājums iekārtots četros atkārtojumos.

2017. gadā

LI2017 - Izmēģinājums četros atkārtojumos. Lauciņu lielums 9 x 2 m. Pupas sētas ar sējmašīnu. Izsējas norma šķirnei 'Lielplatone' un šķirnei 'Fuego' 45 sēklas uz m^2.Izsējas norma šķirnei 'Lielplatone' un šķirnei 'Fuego' 45 sēklas uz m^2.

Izmēģinājuma variantos ar papildus slāpekļa mēslojumu (kontrole (KN) un mikorizas (MN) variants) dots amonija nitrāts ar devu N 10 kg ha^{-1}.

Izmēģinājumi iekārtoti vairākās vietās, lai pārbaudītu gumiņbaktēriju celmu efektivitāti atšķirīgās augsnēs. Izmēģinājumu vietās vismaz 10 gadus nav audzēti ar gumiņbaktērijām inokulēti pākšaugi. Augšņu agroķīmiskais raksturojums apkopots 2.3. tabulā.

2.3. tabula

Augsnes agroķīmiskais raksturojums lauka izmēģinājumos

Elementi	2014			2015			2016		2017
	LI2014_A	LI2014_B	LI2014_C	LI2015_A	LI2015_B	LI2015_C	LI2016_A	LI2016_B	LI2017
	mg L^{-1}			mg L^{-1}			mg kg^{-1}		
N	83	53	50	90	44	91	210*	200*	300*
P	981	229	512	567	149	338	59	55	52
K	155	115	130	285	170	215	161	162	167
Ca	10200	1570	12700	25850	585	1475	-	-	-
Mg	1970	300	3105	3490	140	100	-	-	-
S	30	15	100	175	14	13	-	-	-
Fe	675	835	1350	1645	1030	1245	-	-	-
Mn	105	110	140	185	140	195	-	-	-
Zn	180	47.5	9.5	9.5	5.5	306	-	-	-
Cu	33.00	3.75	5.5	6.5	6.5	3.10	-	-	-
Mo	0.04	0.09	0.06	0.04	0.02	0.03	-	-	-
B	1.9	0.1	0.5	1.3	0.1	0.3	-	-	-
pHKCl	6.52	6.25	7.50	7.48	5.17	5.72	6.7	7.2	7.3
EC mS cm^{-1}	1.19	0.25	1.38	0.69	0.28	0.41	-	-	-

*Organiskās vielas daudzums

Augsnes pēc Latvijas un Pasaules klasifikācijas sitēmas (WRB 2015)
LI2014_A – Latvijas klasifikācija 2009 – Trūdaini kūdrainā glejaugsne, mālsmilts *(Loamy sand).* WRB – Eutric Rheic Drainic Sapric Histosol
LI2014_B – Latvijas klasifikācija – Velēnu podzolaugsne, smalka mālsmilts (*Loamy fine sand*). WRB – Epiprotostagnic Phaeozem .
LI2014_C, LI2015_A – Latvijas klasifikācija – Tehnogēnā augsne, smilšmāls *(Loam).* WRB 2015 – Calcaric Katogleyic, Hortic Phaeozem.
LI2015_B , LI2015_C – Smilšmāla augsne
LI2016_A – Latvijas klasifikācija: Virsēji velēnglejotā augsne *(Sod-stagnogley soil),* putekļains smilšmāls. WRB Endocalcaric Endoabruptic Luvisol.
LI2017 – Latvijas klasifikācija: Virsēji velēnglejotā augsne *(Sod-stagnogley soil),* virskārtā: viegls putekļu māls, apakškārtā – smags putekļu māls. WRB: Cambic Calcisol.

2.3. Meteoroloģiskie apstākļi pupu veģetācijas laikā

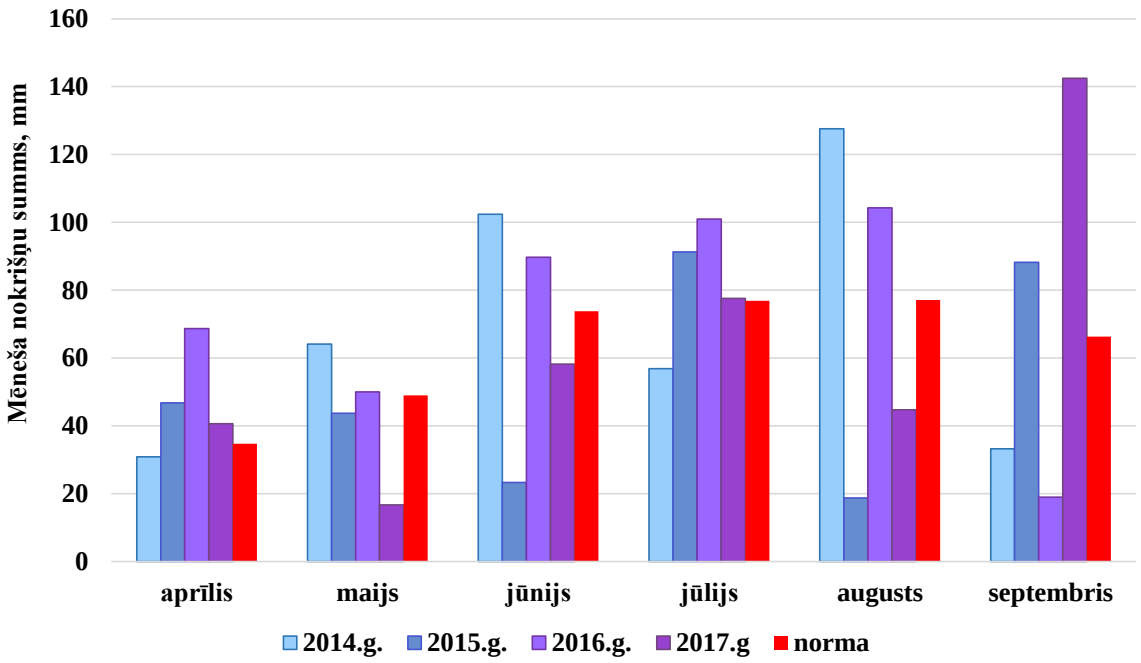
2014. gada martā vidējā gaisa temperatūra bija +3.4 °C (4.7 grādus virs ilggadīgās normas). Aprīlis un maijs arī bija siltāki par normu, attiecīgi par 2.3 un 1.2 °C. Maijā arī nokrišņi nedaudz pārsniedza normu (131% no normas). Jūnijā gaisa vidējā temperatūra bija par 0.9 °C zem normas, bet nokrišņi pārsniedz normu (146% no ilggadīgās normas). Jūlijā vidējā gaisa temperatūra +19.7 °C, kas ir 2.7 °C virs ilggadīgās normas, bet nokrišņu daudzums nesasniedza normu (74% no ilggadīgās nokrišņu normas). Augustā vairākas dienas gaisa temperatūra pārsniedza +30 °C. Kopējais mēneša nokrišņu daudzums pārsniedza mēneša normu (178% no ilggadīgās normas). Septembra vidējā gaisa temperatūra bija 1 °C virs ilggadīgās normas, bet nokrišņu daudzums bija vien 33.2 mm (46% no ilggadīgās normas).

2015. gada martā vidējā gaisa temperatūra bija +3.4 °C (4.7 °C siltāk par normu). Kopējais nokrišņu daudzums martā bija 38.5 mm (110% no normas). Aprīlī vidējā gaisa temperatūru +5.9 °C, kas ir 1.0 °C vairāk par ilggadīgo normu. Mēnesis bija nokrišņiem bagāts, jo nolija 65.9 mm nokrišņu (169% no normas). Vidējā gaisa temperatūru maijā bija +10.2 °C, kas ir par 0.6 °C zemāk par normu. Nolija 57.4 mm nokrišņu, kas ir 116% no normas. Jūnijā vidējā gaisa temperatūru +14.3 °C, un līdzīgi kā 2014. gadā bija zemāka par normu 0.4 °C.Jūnijs bija sauss, jo nolija vien 32.6 mm, (49 % no nokrišņu normas). Jūlijā vidējā gaisa temperatūru +16.4 °C, kas ir 0.6 °C zemāk par normu. Augustā vidējā gaisa temperatūra bija +17.9 °C, kas par 1.7 °C pārsniedza ilggadīgo normu. Līdzīgi, kā jūlijs, augusts bija sauss, kopējais nokrišņu daudzums bija 21.4 mm (27% no normas). Septembrī vidējā gaisa temperatūru bija +13.3 °C, kas ir par 1.6 °C virs normas.

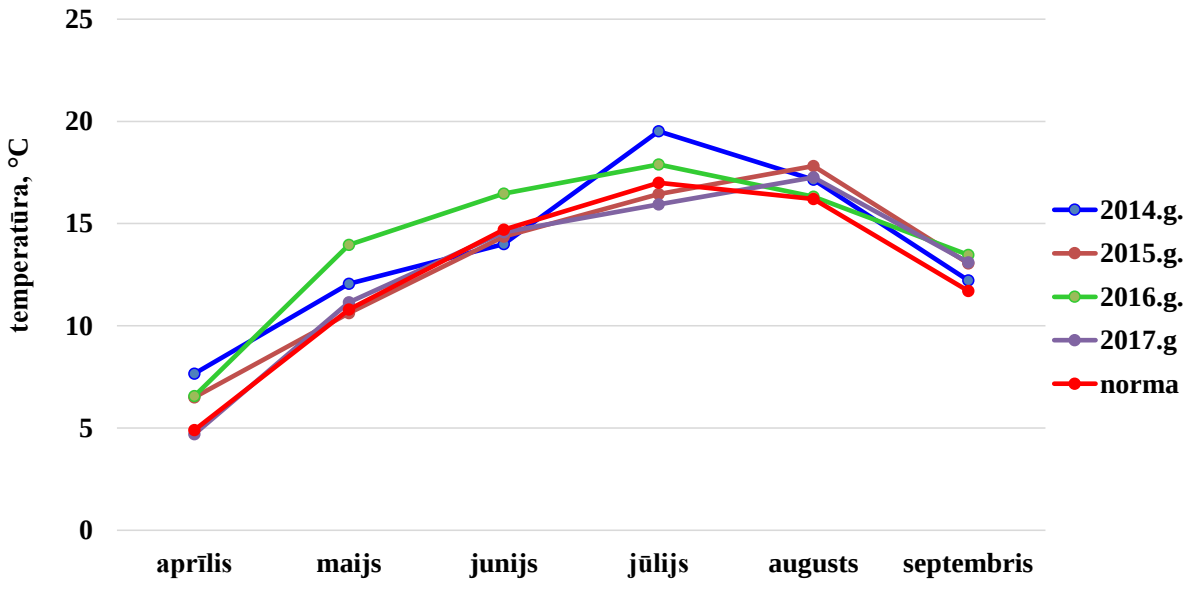
2016. gada martā gaisa temperatūra bija par 1.3°C virs ilggadīgo normas. Nokrišņu daudzums sasniedza 26 mm, kas ir mazāk nekā mēneša norma. Aprīlī vidējā gaisa temperatūra bija +6.2 °C (par 0.5 °C virs ilggadīgo normas). Nokrišņi bija 54.1 mm, kas par 56% pārsniedz mēneša normu. Maijā vidējā gaisa temperatūru +13.7°C (par 2.3 °C virs ilggadīgo normas). Nokrišņu bija maz, tie bija lokāli. Jūnijā gaisa temperatūra pārsniedz ilggadējo normu par 1.5 °C. Nokrišņu daudzums jūnijā bija mēneša normas robežās. Jūlijā vidējā gaisa temperatūra bija 0.7 °C virs ilggadīgo normas, bet nokrišņu daudzums pārsniedza mēneša normu par 37%. Augustā vidējā gaisa temperatūru +16.5°C, bet kopējais nokrišņu daudzums pārsniedz normu par 67% (mēneša norma 77.1 mm). Septembrī vidējā gaisa temperatūru +13.2 °C, kas par 1.4 °C pārsniedz ilggadīgo normu. Kopējais nokrišņu daudzums septembrī bija tikai 68% no normas.

2017. gada martā vidējā gaisa temperatūru +2.1 °C (par 2.3 °C siltāks par ilggadējiem datiem). Kopējais nokrišņu daudzums bija 43.4 mm, (10% virs mēneša normas). Aprīlī vidējā gaisa temperatūra +4.1 °C, par 1.6°C zem mēneša normas. Nokrišņu daudzums bija 49% virs normas. Maijā vidējā gaisa temperatūra bija +10.6 °C (0.7 °C zem normas). Nokrišņu

daudzums par 55% bija zem mēneša normas. Jūnijā vidējā gaisa temperatūra bija +14.1 °C (0.6 °C zem normas). Kopējais nokrišņu daudzums bija 7.3% zem mēneša normas. Jūlijā vidējā gaisa temperatūra bija +16.1°C (1.4 °C zem normas). Kopējais nokrišņu daudzums jūlijā bija 5% zem mēneša normas. Augustā vidējā gaisa temperatūra bija 0.2 °C virs normas, bet nokrišņu daudzums pārsniedz ilggadējos datus par 20%. Septembrī vidējā gaisa temperatūra bija +12.8 °C (1.1 °C virs mēneša normas), arī nokrišņu daudzums pārsniedza ilggadējos mēneša datus par 95%.



2.1. att. **Mēneša nokrišņu summa veģetācijas perioda laikā**



2.2. att. **Mēneša vidējā gaisa temperatūra veģetācijas perioda laikā**

2.4. Augu veģetatīvo, bioķīmisko un ražu veidojošo parametru noteikšana

Veģetācijas trauku un lauka izmēģinājumos augu veģetatīvie parametri mērīti pirmo reizi ziedēšanas fāzē un atkārtoti - pirms ražas novākšanas. Atbilstoši BBCH decimālo kodu skalai pirmā augu analizēšana veikta, kad augu bija sasnieguši 60.–72. attīstības stadiju, bet otrā - gatavības fāzē.

Ziedēšanas fāzē analizētie parametri:

- augu garums (cm). Mērīts katra ievāktā auga garums,
- auga masa, g,
- virszemes daļu sausna (mg g^{-1}). Laksti žāvēti 60 °C temperatūrā,
- lapu pigmentu daudzums noteikts ar hlorofilmetru *at* Leaf (FT Green LLC, Wilmington, DE), izsakot hlorofila daudzumu nosacītās vienībās, vai spektrofotometriski (Spektrofotometrs, Shimadzu UV-1800) etilspirta izvilkumā, izsakot mg g^{-1} svaigas masas,
- hlorofila fluorescence noteikta ar hlorofila fluorometru $OS5p^{+}$ (Opti-Science Inc.). Mērījumi veikti augiem lauka apstākļos, no auga neatdalītām lapām. Analizējamo augu lapas pirms mērījumu veikšanas 60 minūtes aptumšo ar klipšiem. No iegūtajiem nolasījumiem hlorofila fluorescences un fotosistēmas stāvokļa raksturošanai lietots auga vitalitātes indekss (PI) un novērtēta fluorescences parametru attiecība F_V/F_M un F_V/F_o, lai raksturotu fotosistēmas stāvokli pēc - II fotosistēmas maksimālā kvantu iznākuma un fotosistēmas efektivitāte,
- flavonoīdu daudzums noteikts atbilstoši Robaszkiewicz et al. (2010) metodikai. Analizējamā materiāla ekstraktaam (0.5 mL) pievienots ūdens (2 mL) un 150 µL 5% $NaNO_2$. Inkubē piecas minūtes istabas temperatūrā, pievieno 150 µL 10% $AlCl_3$, vēl pēc piecām minūtēm 1 mL 1M NaOH. Pēc 15 minūtēm ar spektrofotometru nosaka absorbciju pie 415 nm. Flavonoīdu koncentrāciju izsaka ar katehīna ekvivalentu (CE),
- flavonoīdu kvalitatīvo sastāvu sēklu eksudātos un pupu dīgļsaknēs ar šķidruma hromatogrāfu (HPLC) noteica Dr.ing.sc. I. Cinkmanis LLU Pārtikas tehnoloģiju fakultātes Analītiskās ķīmijas laboratorijā,
- kopproteīna saturs augu veģetatīvajās daļās noteikts LLU Biotehnoloģiju zinātniskā laboratorijā pēc Kjeldāla metodes,
- augu ūdens aiztures spēja novērtēta pupām veģetācijas trauku un lauka izmēģinājumos. Ūdens aiztures spēju noteikšanai no katra izmēģinājumu atkārtojuma varianta ievāktas 10 lapas un nekavējoties nosvērtas. Nākamie trīs mērījumi veikti ar 30 minūšu intervālu. No iegūtajiem mērījumiem aprēķināts auga ūdens zudums procentos katrā laika intervālā.

Veģetācijas perioda beigās analizētie parametri:

- pākstu skaits un masa,
- 100 sēklu masa,
- kopproteīna saturs sēklās (noteikts ar Kjeldāla metodi).

Ziedēšanas fāzē veģetācijas trauku izmēģinājumos noņemti četri atkārtojumi – 20 augi no varianta. Vesģetācijas perioda beigās, lauka izmēģinājumos no katra lauciņa novākti un analizēti 10 augi (40 augi no varianta), bet veģetācijas trauku izmēģinājumos atlikušie četri atkārtojumi (20 augi).

2.5. Modeļeksperimenti simbiotiskās sistēmas efektivitātes novērtēšanai

Modeļeksperimenti (ME) iekārtoti, atkarībā no pētāmā parametra, siltumnīcā vai fitokamerā kontrolētos apstākļos. Modeļeksperimentu saraksts un pieņemtā numerācija apkopota 2.4. tabulā.

2.4. tabula

Modeļeksperimentu saraksts un pieņemtā numerācija

Numerācija	Apstākļi (silt/fitokamera)	Analizētie parametri	Suga/Šķirnes
ME_A	Fitokamerā	Temperatūras ietekme uz flavonoīdu sintēzi	Pupas: Lielplatone, Fuego Bartek, Karmazyn
ME_B	Fitokamerā Siltumnīcā	Temperatūras ietekme uz flavonoīdu sintēzi	Pupas: Fuego, Karmazyn
ME_C	Siltumnīcā	Pupu inokulācijas ietekme uz pēcaugu	Pupas:Lielplatone
ME_D	Siltumnīcā	Pupu inokulācijas ietekme uz pēcaugu	Sīpoli: 'Stutgarten Riesen'

Temperatūras un mikrosimbiontu ietekme uz flavonoīdu sintēzi dīgstošās pupu sēklās (ME_A). Izmēģinājums iekārtots Petri platēs, sēklas diedzētas tumsā, četros temperatūras režīmos - 4, 8, 12 un 20 °C. Sēklu inokulēšana veikta ar vairākām simbiontu kombinācijām – 1) gumiņbaktēriju celmu RP023 un RV407 maisījum (R), 2) mikorizas sēņu preparāts (M), 3) dubultinokulācija (RM). Kontroles variantā sēklas diedzētas ūdenī. Katrs variants četros atkārtojumos.

Izmēģinājums iekārtots divas reizes. Pirmajā izmēģinājumā iekļautas četras šķirnes: divas sīksēklu 'Lielplatone' un 'Fuego', un divas rupjsēklu - 'Bartek' un 'Karmazyn', bet otrajā izmēģinājumā 'Lielplatone' un 'Bartek'.

Sēklas pirms inokulācijas sterilizētas (1 min 70% etanols, 5 min ACE). Sterilizēšanas šķīdums noskalots ar sterilu ūdeni, un sēklas ievietotas Petri platēs. Petri platē ievietotas 10 sīksēklu pupu vai 5 rupjsēklu pupu sēklas. Sēklām uzliets, atbilstoši variantam, 20 ml gumiņbaktēriju suspensijas (10^6 baktēriju mililitrā) vai ūdens un 5 g mikorizas preparāta vai tikai ūdens.

Pirmo reizi sēklu eksudāts bioķīmijas analīzēm noņemts pēc 4 dienām, bet Petri platēs pievienoti 10 mL destilēta ūdens. Eksudāta noņemšana atkārtota divas reizes nedēļā līdz eksperimenta beigām. Sēklu diedzēšanas laiks atšķīrās dažādās temperatūrās. 20 °C temperatūrā 6 dienas, 12 °C – 15 dienas; 8 °C – 30 dienas; 4 °C – 40 dienas. Izmēģinājuma beigās noteikta atsevišķi katra dīgsta un dīgļsaknes masa (g), aprēķināta to attiecība (%). Flavonoīdi analizēti pēc Robaszkiewiewizc et al. (2010) metodes. Flavonoīdu daudzums izteikts mg kvercetīna ekvivalentu (QE) mL šķīduma.

Daļa no otrā izmēģinājuma sadīgušajām sēklām izmantotas turpmākajā izmēģinājumā siltumnīcā.

Temperatūras un mikrosimbiontu ietekme uz pupu sēklu dīgšanu un augšanu (ME_B). Eksperiments iekārtots divās daļās.

Pirmais izmēģinājums veģetācijas traukos **i**ekārtots 2016. gada 28. septembrī.
Fitokamerā gaisa temperatūra:

pirmās 28 dienas naktī +5 °C, dienā + 15 °C;
29. – 36. dienai naktī +7 °C, dienā + 17 °C;
37. – 40. dienai naktī +10 °C, dienā + 20 °C;
no 41. dienas līdz izmēģinājuma beigām naktī +12 °C, dienā + 20 °C.

Pupas audzētas sterilā vermikulītā 1 litra veģetācijas traukos, sējot 2 sēklas katrā traukā, sešos atkārtojumos. Šķirnes 'Fuego' un 'Karmazyn'.

Sēklu virsma pirms sējas sterilizēta (1 min 70% etanols, 5 min ACE) un sterilās sēklas inokulētas ar gumiņbaktēriju celmiem RP023 un RV407, iemērcot sēklas uz 30 min baktēriju suspensijā (10^6 baktēriju mililitrā).
Analizēta augu augšana un bioķīmiskie parametri saknēs un augu veģetatīvajā daļā.

Otrais izmēģinājums iekārtots (19.01.18.) siltumnīcā, turpinot temperatūras ietekmes novērtēšanu dīgšanas laikā. Dīgsti no Petri paltēm iestādīti 3 litru veģetācijas traukos sterilā vermikulītā. Augšanas laikā augi laistīti ar barības šķīdumu. Barības šķīdums gatavots no Kristalona-3 ($N – P_2O_5 – K_2O$ 6 – 24 – 36), šķīdinot 1.5 g destilētā ūdenī. Audzēti 7 nedēļas līdz parādās ziedpumpuri (AS 50 – 55).

Augus novācot, mērīts dzinuma garums un masa, lapu skaits, saknes masa, gumiņu skaits un masa, kā arī dzinuma saknes un gumiņu sausna.

Inokulācijas ietekmes novērtēšanai uz pēcaugu iekārtoti divi (ME_C un ME_D) veģetācijas trauku izmēģinājumi siltumnīcā

Pirmais izmēģinājums siltumnīcā (ME_C) iekārtots ar pupām veģetācijas traukos pēc vienādas shēmas divus gadus. Pirmo reizi izmēģinājums iekārtots 2014. gada rudenī veģetācijas traukos (7 varianti piecos atkārtojumos), kur 2014. gada veģetācijas periodā augušas pupas, otro reizi 2017. gada pavasarī veģetācijas traukos (7 varianti, trīs atkārtojumos), kur 2016. gada veģetācijas periodā bija augušas pupas vai zirņi. Veģetācijas traukos siltumnīcā izmēģinājumi beigti augu ziedēšanas fāzē.

Pirmajā gadā audzēta šķirne 'Karmazyn'. Ziedēšanas fāzē noteikta augu ūdens aiztures spēja, izmantojot Ārlanda metodi, augu virszemes daļu un saknes masa un sausna, pigmentu saturs auga lapās noteikts spektrofotometriski. Noteikta 100 gumiņu masa.

Otrajā gadā audzēta šķirne 'Lielplatone'. Ziedēšanas fāzē noteikta augu virszemes daļu un saknes masa un sausna. Izmēģinājumu beigās augsnē noteikta mikrobioloģiskā aktivitāte un mikroorganismu biomasa.

Otrais izmēģinājums siltumnīcā (ME_D) iekārtots ar sīpoliem, audzējot tos pēc rupjsēklu pupām 'Bartek'. Izmēģinājums iekārtots, lai skaidrotu pupu inokulācijas ietekmi uz pēcaugiem. Iegūtie rezultāti apkopoti publikācijā (Dubova, L., Šenberga, A., Alsiņa, I. Inoculated broad beans (*Vicia faba*) as a precrop for spring onions (*Allium cepa*). (2017). *Research for Rural Development*, Vol. 2, p. 33–39) un šajā darbā sīkāk nav analizēti. Izmēģinājums, pēc vienādas shēmas, veikts divus gadus. Pirmo reizi izmēģinājums ar sīpoliem iekārtots 2015. gada februārī augsnē, kur 2014. gadā bija iekārtots veģetācijas trauku izmēģinājums ar inokulētām pupām. Otro reizi 2016. gada aprīlī, augsnē, kur 2015. gadā bija iekārtots veģetācijas trauku izmēģinājums ar pupām. Pirmajā izmēģinājuma gadā augi papildus apgaismoti (286.5 µmol m^{-2} s^{-1}; 12 stundu fotoperiods). Augsne no katra veģetācijas trauka atsevišķi sajaukta un sapildīta atpakaļ traukos. Katrā traukā iestādīti 5 'Stutgarten Riesen' šķirnes sīpoli loku ieguvei. Izmēģinājums iekārtots 5 L veģetācijas traukos četros atkārtojumos. Augi nedēļu pēc stādīšanas mēsloti ar Kristalonu™ 13-05-26-3+mikroelementi (20 g m^{-2}). Loku ražas vākšana sākta 20 dienas pēc stādīšanas un veikta reizi nedēļā, noņemot vienu loku no katra auga (kopā divdesmit loki no varianta). Loki nosvērti, un noteikta to sausna. Izmēģinājuma beigās noteikta augsnes mikrobioloģiskā aktivitāte un sīpolu sakņu mikorizācijas pakāpe.

2.6. Simbiotiskās sistēmas komponentu raksturojums

2.6.1. Gumiņbaktēriju aktivitātes raksturošana

Gumiņbaktēriju tīrkultūras raksturotas ar dehidrogenāžu aktivitāti pēc modificētas (Kaimi et al., 2007) metodes. Enzimātiskā aktivitāte tīrkultūrām novērtēta 48 h pēc pārsēšanas uz jaunas barības vides. 10 µL baktēriju masas sajaukti ar 1mL Tris bufera šķīduma, pievienoti 0.2 mL 0.4% INT. Mēģenes novieto tumsā 30 °C temperatūrā. Inkubācijas periods bija 24 h. Pēc inkubācijas perioda reakciju aptur pievienojot 10 mL metanola.

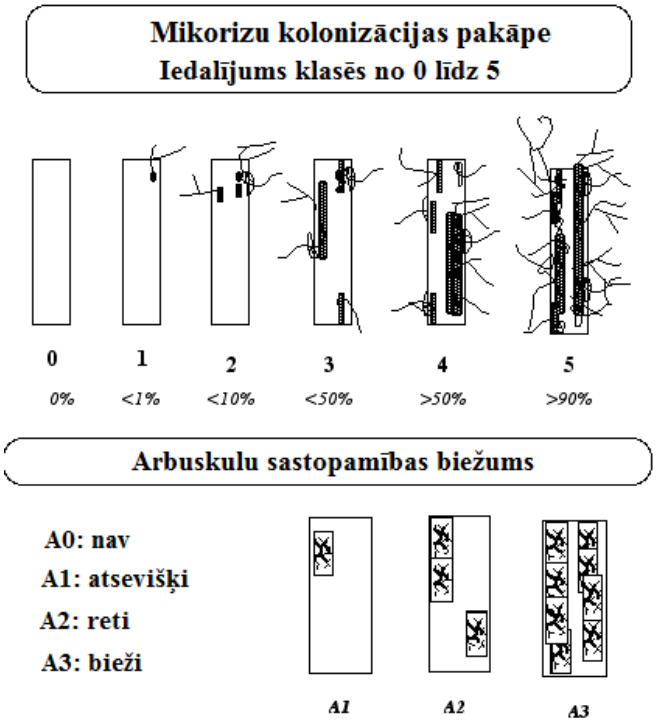
Jodonitrotetrazolija hlorīda formazānu (INTF) nosaka spektrofotometriski pie 460 nm. Izveidotā formazāna daudzumu nosaka pēc standartlīknes regresijas vienādojuma. Rezultāts izteikts µg formazāna 10 mL suspensijas.

Dehidrogenāžu aktivitāte gumiņiem noteikta pēc iepriekš aprakstītās metodes, bet saīsinot inkubācijas laiku līdz 15 minūtēm. Katrs gumiņš pirms analizēšanas nosvērts.

Gumiņu veidošanās noteikta nolasot katram augam 30 lielākos gumiņus no galvenās saknes un nosverot. Aprēķināta 100 gumiņu masa un sausne (žāvējot 105 °C temperatūrā (Tampakaki et al., 2014).

2.6.2. Sakņu mikorizācijas pakāpes novērtēšana

Mikorizas sastopamības novērtēšanai saknes pēc augu izrakšanas noskalotas un turpmākajām analīzēm savākti vismaz 1 cm gari paraugi no sakņu galiem. Savāktie sakņu paraugi attīrīti no pirmentiem un sagatavoti krāsošanai karsējot 10% KOH šķīdumā 90 °C 15 – 30 minūtes. Saknes noskalotas un krāsotas ar 5% melnās tintes (Parker Pen Company, Newhaven, UK) šķīdumu 8% etiķskābē (Brundrett et al., 1996; Vierheilig et al. 1998). 5 minūtes 90 °C temperatūrā. Saknes skaloja un inkubēja 15 – 25 min 2% sālsskābes šķīdumā. Saknes sagatavoja tālākai izpētei vai uzglabāja glicerīna, pienskābes un destilēta ūdens maisījumā (1:1:1). Nokrāsotos 1 cm garos sakņu fragmentus izkārto uz priekšmetstikliņa un mikroskopē ar 10x objektīvu. Katru saknes fragmentu apskatot sešos redzeslaukos. Katram izmēģinājuma variantam mikroskopēti 30 sakņu fragmenti (180 redzeslauki). Katrā redzeslaukā pēc Trouvelot et al. (1986) metodes noteikts, procentuāli cik daudz telpas aizņem hifas, vezikulas un arbuskuli. Atbilstoši procentiem sakņu kolonizācijas frekvenci un arbuskulu sastopamību novērtē pēc Trouvelot et al. (1986) izstrādātās shēmas (skat. 2.3. att.) un iedala klasēs.



2.3. att. **Mikorizu kolonizācijas klases un arbuskulu daudzums**
(attēls no Mycorrhiza manual, 2001[3])

[3] Mycorrhizal manual, (2001) https://www2.dijon.inrae.fr/mychintec/Protocole/protoframe.html

Pēc sakņu fragmentu mikroskopēšanas un mikorizas sēņu struktūru sastopamības novērtējuma ar datorprogrammas MYCOCALC izrēķina:

1. **mikorizu kolonizācijas frekvenci jeb sastopamība sakņu sistēmā (F%)**
   F% = kolonizēto fragmentu skaits / kopējais paraugu skaits × 100,
2. **mikorizas kolonizācijas intensitāti sakņu sistēmā (M)**
   M% = (95 n5+ 70 n4 + 30 n3+ 5n2 + n1)/ (kopējais skaits),
   kur n5 ir fragmentu skaits, atbilstošs piektajai klasei; n4 – fragmentu skaits atbilstošs ceturtajai klasei, n3 ir fragmentu skaits atbilstošs trešajai klasei, n2 ir fragmentu skaits atbilstošs otrajai klasei, n1 ir fragmentu skaits atbilstošs pirmajai klasei.
3. **Arbuskulu daudzumu sakņu sistēmā (A%)**
   A% = a × (M/100),
   kur a – arbuskulu sastopamība (%) mikorizālajās sakņu fragmentu daļās, M – mikorizas kolonizācijas intensitāte sakņu sistēmā.

2.7.Augsnes mikroorganismu skaita un aktivitātes novērtēšana pupu sakņu zonā

Lauka izmēģinājumos 2016. un 2017. gadā, kā arī atsevišķos modeļizmēģinājos novērtēts mikrobioloģiskais fons pupu sakņu zonā. Analizēta baktēriju un mikroskopisko sēņu attiecība un gumiņbaktēriju skaits.

Mikroorganismu kopējā skaita noteikšana. Augsne mikrobioloģiskajām analīzēm ievākta pupu ziedēšanas laikā un veģetācijas perioda beigās, vienlaicīgi ar augu analīzēm. No katra izmēģinājuma varianta ievākts vidējais paraugs (1 kg), kurš veidots no 12 paraugiem, kuri ievākti no četriem izmēģinājuma atkārtojumiem. Līdz analīzēm augsne uzglabāta +4 °C temperatūrā.

No vidējā parauga nosver 10 g un ieber kolbā ar 90 ml sterila ūdens, 15 minūtes novieto uz kratītāja. No suspensijas pagatavo atšķaidījumu sēriju līdz 10^{-7}. Mikroorganismu skaita noteikšanai izmantota suspensija no diviem secīgiem atšķaidījumiem, katrs trīs atkārtojumos. Aerobo baktēriju skaitu noteikts uz Nutrient barotnes (Scharlab,S.L.). Mikroskopisko sēņu daudzums noteikts uz Czapec (Czapek-Dox Agar) barotnes (Scharlab,S.L.). Gumiņbaktēriju skaita noteikšanai lietota Rauga-Mannīta barotne (g L^{-1}): K_2PO_4 0.5, $MgSO_4$ 0.2, NaCl 0.1, $CaCO_3$ 1.0, rauga ekstrakts 1.0 , mannīts 10.0, agars 15, pH 6.4.

Mikroorganismu skaits rēķināts, kā vidējais svērtais uz 1 g sausas augsnes.

Augsnes mikrobioloģiskās aktivitātes novērtēšana. Augsnes elpošanas intensitāte (E) (Pell et al. 2005) noteikta pēc izdalītā CO_2 daudzuma. Augsnes iesvaru (50 g) ievieto 500 mL hermētiski noslēdzmā traukā, kurā ievieto vēl vienu mazāku trauciņu ar 5 mL 0.1M KOH. Trauku aizver un novieto uz 24 stundām 30 °C temperatūrā. Pēc inkubācijas perioda pie KOH piepilina 2 pilienus fenolftaleina un titrē ar 0.1M HCl. Elpošanas intensitāti (mg CO2 g^{-1} h^{-1}) aprēķina pēc formulas (1):

$$E = (A - B) \times 2.2 \times 60 / (m \times t) \qquad (1)$$

kur A – mL 0.1 M HCl kontrolei;
B – mL 0.1 M HCl izmēģinājuma traukā;
m – augsnes iesvars, g
t – inkubācijas laiks, min

Mikroorganismu biomasas noteikšana ar substrāta inducētā elpošanas metodi (SIR) (LVS ISO 14240-1:1997) ir mikroorganismu kvantitātes rādītājs (mg $C_{mikroorg.}$ $100g^{-1}$ sausas augsnes). Augsnes iesvaru (50 g) iesver 500 mL hermētiski noslēdzmā traukā, pievieno glikozi, ievieto vēl vienu mazāku trauciņu, kurā ielej 5 mL 0.1M KOH. Inkubē 6 - 12 stundas, 30 °C temperatūrā. Pēc inkubācijas perioda pie KOH piepilina 2 pilienus fenolftaleina un titrē

ar 0.1M HCl. Aprēķina elpošanas intensitāti pēc formulas (1). Mikroorganismu biomasu aprēķina pēc formulas (2):

$$y = 40.04\ SIR + 0.37 \qquad (2)$$

kur y - Mikroorganismu biomasas C (mg $100g^{-1}$ sausas augsnes),
SIR substrāta inducētā elpošana (mL CO_2 $100g^{-1}$ augsnes h^{-1}).

Dehidrogenāzes aktivitāte (Kaimi et al. 2007) nosaka pēc jodonitrotetrazolija hlorīda (INT) reducēšanās intensitātes, veidojot jodonitrotetrazolija hlorīda formazānu (INTF). Mēģenē iesvērts 1 g augsnes, pievieno 0.2 mL 0.4% INT un 50 µL glikozes šķīdumu. Mēģenēm uzliek korķus un sakrata, lai augsne un reaģenti kārtīgi sajaucas. Mēģenes novieto tumsā 30 °C temperatūrā. Inkubācijas periods ir 24 h. Pēc inkubācijas perioda reakciju aptur pievienojot 10 mL metanola. Formazānu nosaka ar spektrofotometriski pie 460 nm. Izveidotā formazāna daudzumu nosaka pēc standartlīknes regresijas vienādojuma. Rezultāts tiek pārrēķināts uz 100g sausas augsnes (µgformazāna 100 g^{-1} sausas augsnes)

Visas augsnes mikrobioloģiskās analīzes un mikrobioloģiskās aktivitātes analīze izteiktas uz sausas augsnes masas vienību. Augsne žāvēta 105 °C 24 stundas.

2.8.Datu statistiskā analīze

Inokulācijas variantu un veģetatīvo parametru sakarību būtiskuma novērtēšanai lietota datu matemātiskā apstrāde izmantotas divu un trīs faktoru dispersijas analīzes (ANOVA). Rezultāti uzskatīti par būtiski atšķirīgiem, ja $p<0.05$. Grafikos kļūdu stabiņi parāda mazāko būtisko starpību (RS).

Sakņu mikorizācijas pakāpes datu dispersijas analīzes (ANOVA) veikta parametriem F%, M% un A%.

Korelāciju analīze un faktoru analīze SPSS programmā lietota, lai novērtētu sakarības starp simbiozes veidošanās intensitāti, mikorizācijas frekvenci, arbuskulu veidošanās intensitāti pupu sakņu sistēmā, un auga veģetatīvajiem parametriem.

Inokulācijas varianta efekts uz pupu veģetatīvajiem parametriem un ražu,salīdzinot pret kontroli, raksturots ar koeficientu robežās no -1 līdz 1, un attēlots krāsu kartes grafikā.

Koeficienti krāsu skalai (KS) aprēķināti pēc formulas (3):

$$KS = (Ki/Kk) - 1, \qquad (3)$$

kur Ki – konkrētās pazīmes vērtība;
Kk – konkrētās pazīmes vērtība kontroles variantā.

Koeficientiem atbilstošās krāsas attēlotas 2.4. attēlā.

-1	-0.8	-0.6	-0.4	-0.2	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1

2.4.att. **Krāsu kartes skala**
(Kontrolei, krāsu kartē, atbilst 0)

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

3.1. Inokuluma varianta ietekme uz gumiņu veidošanos un aktivitāti

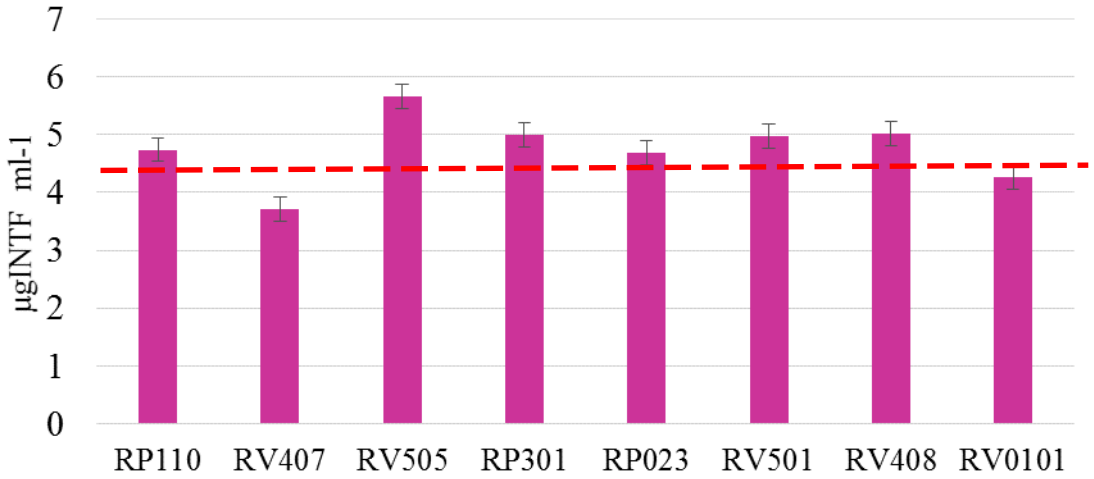
3.1.1. Gumiņbaktēriju tīrkultūru simbiotiskās aktivitātes salīdzinājums

Gumiņbaktēriju celmi izmēģinājumu iekārtošanai no LLU Lauksaimniecības fakultātes gumiņbaktēriju kolekcijas izvēlēti vadoties no iepriekšējā gumiņbaktēriju pētījumu perioda datiem 20. gadsimta otrajā pusē. Šajā laikā nozīmīgāko datu apjomu par pupu gumiņbaktēriju sastopamību un efektivitāti Latvijas augsnēs bija ieguvis prof. V. Klāsens. Dati par pupām piemērotajiem baktēriju celmiem, to efektivitāti apkopoti prof. V. Klāsena 1967. gadā aizstāvētajā disertācijā. No salīdzinātajiem gumiņbaktēriju celmiem RP023 un RP110 bija atzīti, kā vieni no aktīvākajiem un lietojami pupu inokulēšanai. Tomēr, mainoties audzēto pupu šķirnēm, lietotajiem agrotehniskajiem paņēmieniem un klimatiskajiem apstākļiem, gumiņbaktēriju un pākšaugu mijiedarbības pētījumi veidojot efektīvu simbiozi, joprojām nav zaudējuši savu aktualitāti ne tikai Latvijā, bet arī Pasaulē. Vairāk uzmanības tiek veltīts simbiozes veidošanos noteicošajiem bioķīmiskajiem faktoriem, vērtējot gan mikroorganismu, gan saimniekaugu lomu mijiedarbības veidošanā. Tāpēc dažādu bioķīmisko procesu norises intensitāte ir viens no veidiem, kā novērtēt gumiņbaktēriju aktivitāti un efektivitāti.

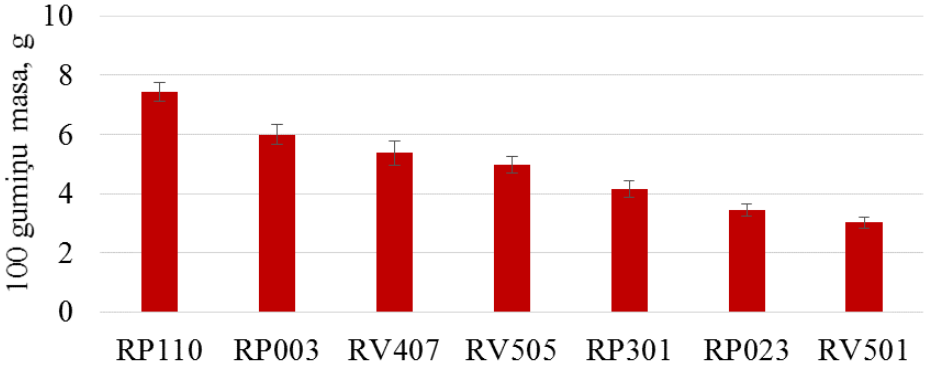
Gumiņbaktēriju efektivitāte atkarīga no pilnvērtīgas enzimatiskās darbības šūnās. Simbiozes veidošanās ir energoietilpīgs process, tāpēc trikarbonskābju cikla darbība ir saistīta ar procesa efektivitāti (Antoun, Bordeleau, Auvageau, 1984). Molekulārā slāpekļa reducēšanā līdz amonija jonam iesaistās virkne enzīmu, tāpēc to aktivitāte ataino gumiņā notiekošo procesu intensitāti. Dehidrogenāzes piedalās virknē gumiņos notiekošajās bioķīmiskajās reakcijās, tāpēc ir viena no enzīmu grupām, kuras var raksturot procesu intensitāti gumiņā. Konstatēts, ka *Rhizobium* mutantu celmi, kuriem trūkst trikarbonskābes cikla starpproduktu, ir neefektīvi slāpekļa fiksācijā (Fix-) pākšaugu gumiņos (Finan, Wood, Jordan, 1981), *B. japonicum* 2-ketoglutarāta dehidrogenāzes mutantiem traucēta N_2 saistīšana, tiem ir zemāks kopējais slāpekļa fiksācijas daudzums rēķinot uz augu (Prell, Poole, 2006).

LLU LF gumiņbaktēriju kolekcijā esošajiem celmiem simbiotiskās aktivitātes novērtēšana uzsākta ar dehidrogenāžu aktivitātes novērtēšanu. Gumiņbaktēriju celmi izvēlēti pamatojoties uz to aprakstiem. Dehidrogenāžu aktivitāte baktēriju suspensijā salīdzināta 48h pēc pārsēšanas jaunā barotnē. Rezultāti atainoti 3.1. att.. Tikai celmiem RP101, RV407 dehidrogenāžu aktivitāte bija zemāka nekā vidēji analizētajiem celmiem. Enzīmu aktivitāti gumiņos saista ar efektīvāku molekulārā slāpekļa saistīšanu, kā arī reducētā slāpekļa savienojumu transportu no gumiņiem uz saimniekaugu (Boland, Schubert, 1983; Петренко, 1972). Gumiņbaktēriju celmu enzimātiskā aktivitāte, var būt cēlonis atšķirīgai bakteroīdu efektivitātei gumiņos. Pamatojoties uz to, atsevišķos darbos (Петренко, 1972) minēts, ka dehidrogenāžu aktivitāti var izmantot, kā indikatoru aktīvāko gumiņbaktēriju celmu identificēšanai, tomēr arī šajos darbos norāda uz svārstīgiem rezultātiem.

Pēc gumiņbaktēriju tīrkultūru enzinātiskās aktivitātes salīdzināšanas, turpināta baktēriju simbiotiskās aktivitātes novērtēšana Izvēlētajiem gumiņbaktēriju celmiem pārbaudīta, vai saglabājusies simbiozes veidošanas aktivitāte. Pupas audzētas 5 litru veģetācijas traukos (katrā 4 augi) četros atkārtojumos sterilā smiltī, kur nebija citu konkurējošu gumiņbaktēriju. Augi audzēti līdz ziedēšanas fāzei. No katra auga galvenās saknes nolasīti 10 lielākie gumiņi un salīdzināta gumiņu masa.



3.1. att. **Dehidrogenāžu aktivitāte baktēriju tīrkultūru suspensijā**
--- vidējā aktivitāte (4.76 µgINTF mL^{-1})

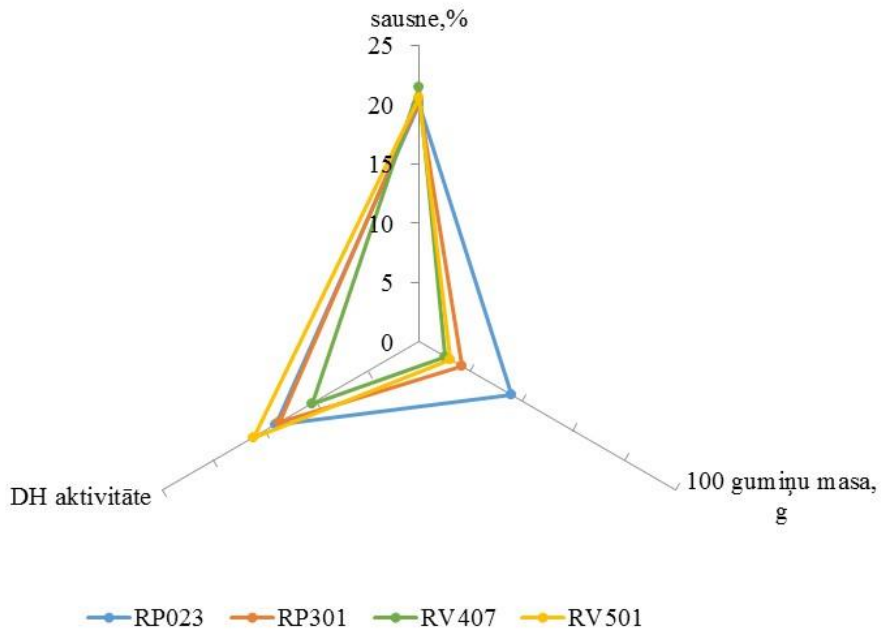


3.2.att. **100 gumiņu masa šķirnei 'Bartek' ar dažādiem gumiņbaktēriju celmiem**
(n=40 katram baktēriju celmam; 100 gumiņu masai $RS_{0.05\ \text{inokulācijas variants}}$ =0.41)

Ar visiem gumiņbaktēriju celmiem uz pupu saknēm neveidojās vienlīdz lieli gumiņi (3.2. att.). Mazākie bija ar RV501 un RP023, kaut arī RP023 V. Klāsena (1967) disertācijā bija minēts, kā viens no efektīvākajiem. 100 gumiņu masas atšķirība starp baktēriju celmiem bija izteiktāka nekā dehidrogenāžu aktivitāte. Nosakot korelāciju starp dehidrogenāžu aktivitāti un gumiņu masu, konstatēta vidēji cieša līdz cieša korelācija. Korelācijas koeficients bija robežās no 0.50 līdz 0.99. Nevar viennozīmīgi apgalvot, ka ar visiem gumiņbaktēriju celmiem lielākajos gumiņos būs augstāka dehidrogenāžu aktivitāte.

Gumiņbaktēriju celmu RP023, RV301, RV407 un RV501 simbiozes veidošanās un gumiņu parametri salīdzināti arī veģetācijas trauku izmēģinājumā siltumnīcā kontrolētos apstākļos. Inokulētas pupas 'Bartek' sēklas un salīdzināti uz saknēm izveidoto gumiņu parametri. Pupas audzētas siltumnīcā veģetācijas traukos līdz sāk veidoties ziedpumpuri. Nosakot 100 gumiņu masu, gumiņu sausni un dehidrogenāžu aktivitāti konstatēts, ka lielākās atšķirības ir starp izveidoto 100 gumiņu masu (3.3. att.).

Lielākos gumiņus izveidoja celms RP023 (8.98 g), bet mazākie gumiņi bija celmam RV407 (2.52 g). Sausnas saturs svārstījās no 20.1% līdz 21.4%. Augstākā dehidrogenāzes aktivitāte (DHA) noteikta celmam RV501 (16.1 µg INTF mL^{-1}). Starp gumiņu masu un dehidrogenāžu aktivitāti vidēji cieša korelācija ($r=0.69 > r_{0.05,\ 60} = 0.253$).



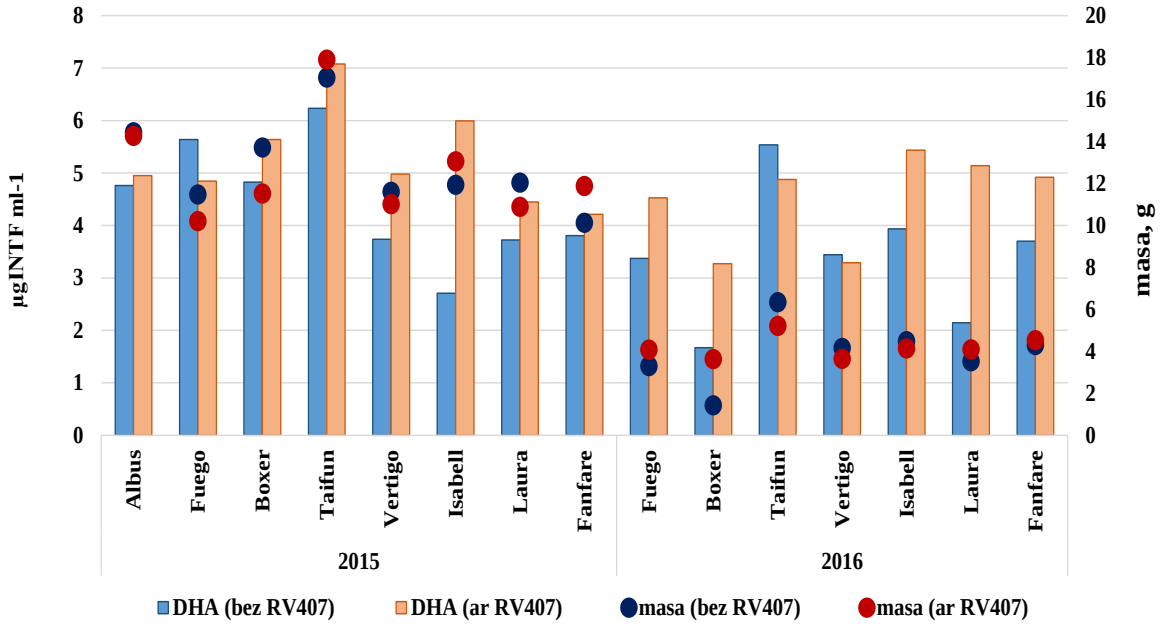
3.3.att. **Gumiņbaktēriju (RP023, RP301, RV407, RV501) izveidoto gumiņu parametri uz pupu 'Bartek' saknēm**

DH – dehidrogenāžu aktivitāte gumiņos (µg INTF mL^{-1})

Gumiņbaktērijas RP407 visos izmēģinājumos neuzrādīja vislabākos rezultātus, bet bija starp labākajiem, kuri izdalīti no gumiņiem uz pupu saknēm, tāpēc vairumā gadījumu bija izvēlēts pupu sēklu inokulēšanā.

Pupu sēklu inokulācijas (ar RV407) ietekmi uz šķirņu 'Fuego, 'Boxer', 'Taifun', 'Vertigo', 'Isabell', 'Laura', 'Fanfare' ražu savā darbā pētīja L.Lapiņa (Lapiņa, 2017), bet šajā izmēģinājumā, inokulētajos variantos neizdevās iegūt pārliecinoši augstākas ražas. Izmēģinājumā iekļautajām šķirnēm salīdzināta arī gumiņu aktivitāte ar dehidrogenāžu testu un 100 gumiņu masa. Salīdzinot dabīgās mikrobiotas sastāvā esošo gumiņbaktēriju veidotos gumiņus (kontroles variantā) ar inokulēto (ar RV407) dehidrogenāzes aktivitāti septiņām šķirnēm konstatēts, ka pastāv būtiska atšķirība starp gumiņu aktivitāti, kuri veidojas uz dažādu pupu šķirņu saknēm (3.4. att.). 2015. gadā, salīdzināta 360 gumiņu dehidrogenāžu aktivitāte ($F=4.43 > F_{crit} =2.03$), bet 2016. gadā salīdzināta 140 gumiņu dehidrogenāžu aktivitātie ($F=3.76 > F_{crit} =2.19$). Šķirnēm 'Boxer', 'Taifun', 'Vertigo', 'Isabell' abus gadus inokulētajos variantos konstatēta augstāka dehidrogenāžu aktivitāte gumiņos, bet šķirnēm 'Laura', 'Fanfare', un 'Fuego' tikai 2016. gadā. Šķirnei 'Fuego'2015 gadā gumiņu aktivitāte inokulētajā variantā bija būtiski zemāka. Konstatēta būtiska gumiņu masas atšķirība starp abiem izmēģinājuma gadiem ($p < 0.001$).

Novērtējot gumiņu masas un dehidrogenāzes aktivitāti gumiņos, konstatēta vidēji cieša korelācija. Korelācijas koeficienta kritiskā vērtība 2015. gadā inokulētajiem augiem bija $r=0.85 > r_{0.05,\ 160} = 0.16$, bet neinokulētajiem $r=0.68 > r_{0.05,\ 160} = 0.16$. Savukārt 2016. gadā inokulētajiem augiem bija $r=0.75 > r_{0.05,\ 70} = 0.23$, bet neinokulētajiem $r=0.62 > r_{0.05,\ 70} = 0.23$. Gumiņbaktēriju spēju veidot simbiozi ietekmē ne tikai konkrētā celma bioķīmiskā aktivitāte, bet arī spēja konkurēt ar augsnē esošajām gumiņbaktērijām un citiem augu sakņu rizosfēras mikroorganismiem. Pupu sēklu inokulēšanā lietotie gumiņbaktēriju celmi ne vienmēr izrādās aktīvāki par dabīgi augsnē esošajām gumiņbaktērijām. Šo baktēriju aktivitāte veidot simbiozi ar pupām var būt atkarīgas ne tikai no augsnes tipa un tajā esošās mikroorganismu populācijas, bet arī no auga šķirnes.



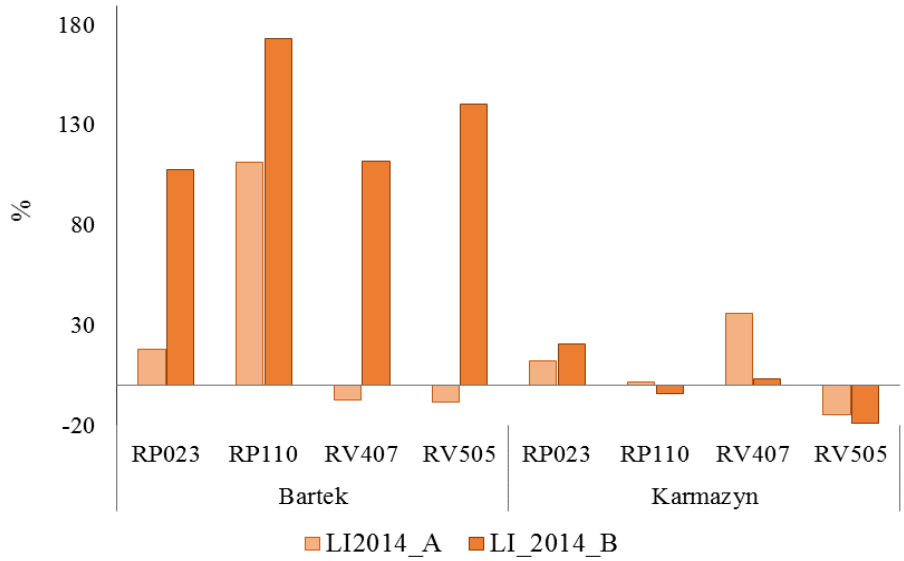
3.4. att. **Dehidrogenāžu aktivitāte (DHA) gumiņos un 100 gumiņu masa inokulētiem (RV407) un neinokulētiem augiem**

Lai salīdzinātu gumiņbaktēriju celmu aktivitāti pupu rizosfērā dažādos augšanas apstākļos, turpināta gumiņbaktēriju celmu izvērtēšana, un iekārtots izmēģinājums ar četriem gumiņbaktēriju celmiem divās izmēģinājuma vietās ar atšķirīgu augsnes tipu - trūdaini kūdrainā glejaugsnē (LI2014_A) un velēnu podzolaugsnē (LI2014_B). Augsnes tips ietekmē ne tikai augiem, bet arī mikroorganismiem pieejamās barības vielas. Augam piemērotākā augsnē var veidoties labvēlīgāki apstākļi simbiozes veidošanai, jo nepiemēroti augsnes apstākļi var izmainīt auga saknes izdalīto metabolītu sastāvu, kas var ierobežot gumiņbaktēriju aktivitāti. Podzolētās augsnē uz pupu saknēm konstatētie gumiņi bija mazāki nekā kūdrainajā augsnē, bet šķirnei 'Bartek' visi pārbaudītie baktēriju celmi veidoja būtiski lielākus gumiņus nekā kontroles augiem (3.5.att.). Kūdrainā augsnē augošajām pupām gumiņi bija lielāki, bet no visiem inokulēšanā lietotajiem baktēriju celmiem šķirnei 'Bartek' par kontroles variantu lielākus gumiņus veidoja tikai RP023 un RP110, bet šķirnei 'Karmazyn' RP023 un RV407. Variantos ar baktēriju celmu RP023 gumiņu masa lielāka nekā izmēģinājumā, kurā inokulētie augi audzēti sterilā smiltī (3.2. att.). Tas saskan gan ar senāku pētījumu rezultātiem (Калниньш, Класенс, 1971), gan jaunākiem (Gage, 2004), kuros akcentē gumiņbaktēriju aktivitātes svārstības atkarībā no augsnes īpašībām un rizosfēras mikroorganismu aktivitātes. Analizējot zirņu-vīķu-pupu grupas gumiņbaktēriju dažādos augsnes tipos Klāsens (1967) konstatēja, ka visvairāk gumiņbaktērijas sastopamas kultūraugsnēs un velēnu karbonātaugsnēs, kur to skaits pārsniedz 10^4 kvv 1 g augsnes, bet vismazāk (< 10^3 kvv) podzolētās augsnē.

Augsnēs ar nelielu gumiņbaktēriju skaitu lietderīgi veikt pupu sēklu inokulāciju, jo šādās augsnēs iespējams, kaut arī ir zemāka konkurence ar dabīgi augsnē sastopamajām gumiņbaktērijām, tomēr tās var būt mazāk efektīvas.

Veicot rezultātu analīzi, noskaidrots, ka simbiozes veidošanās un optimāla norise ir atkarīga no izvēlētā baktēriju celma, pupu šķirnes un augsnes kompleksas iedarbības. Kā iemesls var būt ne tikai augsnes īpašības, bet arī dabīgi augsnē esošā mikroorganismu populācija un gumiņbaktēriju konkurētspēja. Tas saskan arī ar literatūras datiem (Toro, 1996), ka dabīgā gumiņbaktēriju populācija, var būtiski izmainīt inokulēšanā lieto gumiņbaktēriju spēju veidot simbiozi. Lokālā gumiņbaktēriju populācija var veidoties no celmiem ar atšķirīgu genoma struktūru, fizioloģiskajām īpašībām un slāpekļa saistīšanas efektivitāti. Gumiņbaktērijas konkurē par iespēju kolonizēt auga saknes un dominēt gumiņos (Duodu,

Carlsson, Huss-Danell et al., 2007; Silva, Kan, Martinez-Romero et al.,2007). Virknē pētījumu konstatēts, ka gumiņbaktērijām evolucionāri izveidojušies dažādi paņēmieni konkurences nodrošināšanai: bakteriocīna producēšana (Oresnik, Twelker, Hynes, 1999), vitamīnu producēšana (Randhawa, Hassani, 2002), specifisku oglekļa un enerģijas avotu izmantošana (Oresnik, Pacarynuk, O'Brien et al., 1998). Visas papildus īpašības ir priekšrocības, lai iegūtu domējošu lomu rizosfērā, kas savukārt, ir viens no nosacījumiem veiksmīgai saimniekauga kolonizācijai.



3.5. att. **100 gumiņu masa izteikta % pret kontroles varianta gumiņu masu izmēģinājumos LI2014_A un LI2014_B.**

Mikroorganismu mijiedarbību sakņu zonā ietekmē pieejamās barības vielas, un auga sakņu izdalījumu bioķīmiskais sastāvs. Tas var mainīties vides faktoru ietekmē, ja mainās auga fizioloģiskais stāvokli (Mierziak, Kostyn, Kulma, 2014).

Temperatūras ietekme uz gumiņbaktēriju aktivitāti veidot simbiozi (izmēģinājumā ME_A un ME_B). Izmēģinājumos noskaidrojās, ka gumiņu lielums un aktivitāte var būtiski mainīties atkarībā no šķirnes, inokuluma varianta, kā arī auga augšanas apstākļiem. Gumiņbaktēriju spēja iekļūt auga saknēs, izveidot gumiņu un efektīvu simbiozi atkarīga arī no saimniekauga sakņu sistēmas augšanas (Rowland,1980). Gumiņbaktērijas auga saknē iekļūst tikai caur attīstītām spurgaliņām, tāpēc simbiozes kvalitāte ir atkarīga arī no vides temperatūras. Laboratorijas apstākļos diedzējot pupu 'Fuego' un 'Lielplatone' sēklas četros temperatūras režīmos konstatēta sēklu inokulācijas ietekme uz dīgļsaknes augšanu. Sadīgušās sēklas iestādītas veģetācijas traukos un augu audzēšana turpināta siltumnīcā. Kā substrāts lietots gan vermikulīts, gan augsne.

Sēklu dīgšana straujāk notika 20 °C, bet lēnāk 4 °C temperatūrā, bet augu augšana līdz ziedēšanas sākumam bija izlīdzinājusies. Dīgšanai optimālos apstākļos veidojās spēcīgāka sakņu sistēma (3.6. att.), kas varēja ietekmēt arī simbiozes veidošanos ar gumiņbaktērijām.

a) b)

3.6.att. **Dīgstošas lauka pupas +4 (a) un +20 °C (b) temperatūrā**
(autores foto)

Simbiozes veidošanās laikā būtiska loma ir bioķīmiskajiem signāliem starp augu un mikroorganismiem, kuri ietekmē simbiozes veidošanās procesu. Diedzējot sēklas dažādās temperatūrās, konstatēta atšķirīga dīgļsaknes augšana, kas varēja ietekmēt arī flavonoīdu, kā vienu no galvenajām bioķīmisko signālu grupām, sintēzi un eksudāciju.

Konstatēts, ka sēklu eksudātos konstatēto flavonoīdu daudzums atkarīgs no temperatūras dīgšanas laikā un mikroorganismu klātbūtnes (3.1.tab.). Augstākais flavonoīdu daudzums sakņu eksudātu šķīdumā konstatēts 20 °C temperatūrā visām pupu šķirnēm un inokulācijas variantiem. Flavonoīdu daudzumam sēklu eksudātos konstatēta cieša korelācija (r=0.93) ar diedzēšanas temperatūru. Salīdzinot šķirnes, 'Fuego' sēklu eksudātu šķīdumā bija konstatēts augstākais flavonoīdu daudzums.

Diedzējot inokulētas sēklas, mainās flavonoīdu sastāvs. Mikrosimbiontu klātbūtne 77% gadījumu samazināja flavonoīdu koncentrāciju. Būtiskākā ietekme variantos, kur sēklas inokulētas ar mikorizas sēņu preparātu un dubultinokulācijas variantos. Variantos, kur sēklas inokulētas tikai ar gumiņbaktērijām būtiska atšķirība novērojama tikai 9.4% paraugu. Salīdzinot analizēto temperatūru ietekmi, lielāks flavonoīdu daudzuma samazinājums bija 12 °C temperatūrā.

Flavonoīdu sastāvs atšķirās dīgstošās sēklās, dīgļsaknēs un sēklu eksudātos. Dīgļsaknē dominējošais flavonoīds ir katehīns, bet rutīns un luteolīns zemākā koncentrācijā. Sēklu eksudātu šķīdumā augstākā koncentrācijā sastopams katehīns un rutīns, bet luteolīna koncentrācija, salīdzinot ar dīgļsakni, samazinās.

Izmēģinājumos noskaidrots, ka dīgšana nepiemērotā temperatūrā ietekmē dīgļsaknes attīstību. Temperatūra ietekmē flavonoīdu sastāvu eksudātos. Augi izdala flavonoīdus no mazajām saknītēm un spurgaliņām, tādejādi bioķīmiskie signāli veicina simbiotisko mikroorganismu piesaisti, un iekļūšanu augu saknēs. Rizosfēras mikroorganismi var inducēt flavonoīdu izdalīšanos no augu saknēm, tas veicina augu sakņu kolonizāciju (Frey-Klett, Garbaye, Tarkka, 2007). Eksudēto vai akumulēto flavonoīdu daudzums atkarīgs ne tikai no gumiņbaktēriju vai mikorizas sēņu klātbūtnes, bet arī rizosfēras mikroorganismu populācijas. Tas var ietekmēt bioķīmisko procesu norisi, gumiņu veidošanos un mikorizas kolonizācijas intensitāti.

Par mikrosimbiontu un auga sakņu mijiedarbību jau dīgšanas laikā liecina ne tikai atšķirīgais izdalīto flavonoīdu daudzums, bet arī dīgļsaknes augšana (3.7. att.).

3.7. att. **Pupu dīgļsaknes augšana dažādu mikrosimbiontu kombinācijas klātbūtnē**
K – kontrole bez mikroorganismiem, R – ar gumiņbaktērijām, M – ar mikorizas sēnēm, RM – ar gumiņbaktērijām un mikorizas sēnēm (ME_B izmēģinājums)
(autores foto)

Virknē pētījumu (Larose, Chenever, Moutoglis et al., 2002; Wang, Pan, Chen et al., 2011; Petrussa, Braidot, Zancani et al., 2013) apstiprināts, ka temperatūra un augsnes mitrums

būtiski ietekmē flavonoīdu biosintēzi ne tikai sakņu eksudātos, bet arī citās auga daļās. Flavonoīdu izdalīšanas apjoms atkarīgs no auga sugas un inokulācijas preparāta mikroorganismu sastāva. Šķirnēm 'Bartek' un 'Karmazyn' ar mikorizas sēnēm inokulētajām sēklām izdalīto flavonoīdu daudzums samazinājās 12 °C temperatūrā. Šādu efektu varēja izraisīt flavonoīdu akumulēšanās saknes audos. Pēc Larose un līdzautoru (Larose, Chenever, Moutoglis et al., 2002) datiem, saknes akumulē dažādu flavonoīdu daudzumu, ja ir kolonizētas ar mikorizas sēnēm. Darbā norādīts, ka flavonoīdu kumestrolu (*coumestrol*) vairāk akumulē saknes, kuras kolonizējušas mikorizas sēnes *G.mosseae*. Līdzīgi daidecēnu vairāk akumulē ar *G. intraradices* kolonizētas saknes, mazāk ar *G. mosseae* kolonizētās, bet niecīgā daudzumā konstatēts saknēs, kuras kolonizēja sēne *G. rosea*. Ar iegūtajiem rezultātiem saskan Šmita (Schmidt, Broughton, Werner, 1994) pētījumi, kā arī gumiņbaktērijas var veicināt flavonoīdu akumulēšanos. Akumulējoties daļai no flavonoīdiem vai samazinoties to eksudācijai zemas temperatūras ietekmē, pupu rizosfērā samazinās flavonoīdu daudzums, kas ierobežo jaunu mikroorganismu piesaisti saknēm.

Turpinot izmēģinājumu (ME_B), sadīgušās sēklas iestādītas veģetācijas traukos un siltumnīcas apstākļos audzētas līdz ziedēšanas sākumam (BCHH 50 – 53). Rezultāti neuzrādīja statistiski būtisku atšķirību sakņu un dzinumu svaigo masu un sausni. Novērojama tikai tendence, ka inokulētie augi veido lielāku virszemes daļas masu, salīdzinot ar neinokulētajiem augiem. Lielākā virszemes daļu un sakņu attiecība konstatēta ar mikorizas sēņu preparātu inokulētajiem augiem. Šajos inokulācijas variantos vidējā sakņu un dzinumu attiecība bija 0.60 un svārstījās robežās no 0.49 līdz 0.71. Zemākā attiecība bija variantos, kur sēklas inokulētas tikai ar gumiņbaktērijām. Šajos variantos vidējā attiecība bija 0.48 un svārstījās no 0.42 šķirnei 'Bartek' līdz 0.53 šķirnei 'Lielplatone'. Vairumā gadījumu inokulēšana ar gumiņbaktērijām samazināja sakņu augšanu.

3.1. tabula

Vidējais flavonoīdu daudzums (mg CE mL^{-1}) dīgstošo sēklu eksudātā

Diedzēšanas temperatūra, °C	Inokulāta variants	*Vicia faba* var. *major*		*Vicia faba* var. *minor*	
		‘Karmazyn,	‘Bartek,	,Fuego,	‘Lielplatone,
4	K	0.202^{b}	0.165^{b}	0.314^{a}	0.264^{b}
	R	0.212^{b}	0.125^{a}	0.347^{a}	0.263^{b}
	M	0.189^{a}	0.122^{a}	0.326^{a}	0.261^{b}
	RM	0.180^{a}	0.202^{c}	0.304^{a}	0.170^{a}
8	K	0.202^{a}	0.154^{a}	0.378^{b}	0.260^{b}
	R	0.208^{a}	0.168^{a}	0.371^{b}	0.253^{b}
	M	0.214^{a}	0.227^{b}	0.306^{a}	0.313^{c}
	RM	0.230^{b}	0.155^{a}	0.359^{b}	0.225^{a}
12	K	0.305^{c}	0.215^{b}	0.466^{b}	0.337^{b}
	R	0.224^{b}	0.228^{b}	0.408^{a}	0.273^{a}
	M	0.161^{a}	0.161^{a}	0.417^{ab}	0.273^{a}
	RM	0.169^{a}	0.204^{b}	0.446^{ab}	0.254^{a}
20	K	0.441^{c}	0.341^{c}	0.644^{a}	0.444^{b}
	R	0.348^{a}	0.329^{c}	0.704^{b}	0.371^{a}
	M	0.390^{b}	0.285^{b}	0.760^{c}	0.359^{a}
	RM	0.421^{c}	0.237^{a}	0.690^{b}	0.384^{a}

Vērtības vienā kolonnā un vienā diedzēšanas temperatūrā ar dažādiem burtiem liecina par būtisku atšķirību ($p<0.05$), $RS_{0.05}=0.075$

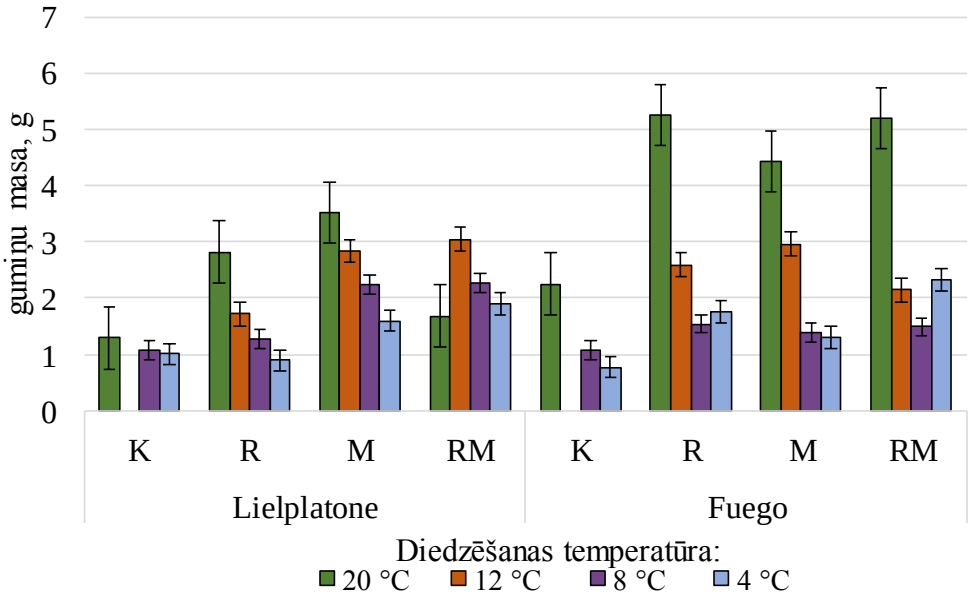
Veģetācijas traukos lielsēklu šķirnēm 'Bartek' un 'Karmazyn' izveidojās tikai daži gumiņi un nevarēja konstatēt būtisku atšķirību starp inokulātu variantiem. Atšķirībā no lielsēklu pupām, sīksēklu šķirnēm 'Fuego' un 'Lielplatone' veidojās vairāk gumiņu, kā arī izpaudās vides temperatūras un inokulācijas varianta efekts (3.8.att.). Veģetācijas traukos pildīts nesterilizēts mālsmilts substrāts, tāpēc gumiņus varēja konstatēt arī variantos, kuri nebija inokulēti ar gumiņbaktērijām (K un M). Augsnē esošās mikroorganismu populācijas gumiņbaktērijas veidoja sīkākus gumiņus, īpaši augiem, kuri diedzēti zemā temperatūrā (4 °C).

Novērota arī šķirnes ietekme uz izveidoto gumiņu lielumu. Mazākie gumiņi abām šķirnēm, izņemot dubultinokulācijas variantu 'Lielplatonei', bija izveidojušies 8 °C temperatūrā, kaut arī sākotnēji dīgšana nebija aizkavēta tik ļoti kā 4 °C. Būtiska temperatūras ietekme konstatēta šķirnei 'Fuego', kur 20 °C veidojās par 152% lielāki gumiņi variantā, kurš inokulēts tikai ar gumiņbaktērijām un par 123% dubultinokulācijas variantā.

Iegūtie rezultāti apstiprina viedokli, ka pupu sēja agri pavasarī, aukstā augsnē var nevēlami ietekmēt inokulēto sēklu simbiozes veidošanos. Lai arī *Rhizobiaceae* dzimtas baktērijas var izdzīvot 4 °C temperatūrā (Drouin, Prevost, Antoun, 2000) un to aktivitāte pieaug līdz ar augsnes temperatūru, ilgstoša inokulēto sēklu ekspozīcija zemā temperatūrā samazina spēju veidot simbiozi (Fyson, Sprent, 1982). Izveidoto gumiņu lielums atkarīgs arī no šķirnes. Šķirnei 'Fuego', diedzējot sēklas 20 °C temperatūrā, gumiņi veidojās būtiski lielāki nekā šķirnei 'Lielplatone'.

Pupu sēklu inokulēšana ar mikorizas sēnēm atsevišķi vai kopā ar gumiņbaktērijām veicināja gumiņu veidošanos, salīdzinot ar kontroles augiem.

No rezultātiem var secināt, ka pazeminātas temperatūras samazina flavonoīdu izdalīšanos, kā arī aizkavē sakņu augšanu. Rezultātā veidojas sīkāki un potenciāli mazākefektīvi gumiņi. Tas saskan ar literatūras datiem, ka gumiņu izmērs saistāms ar to funkcionālo aktivitāti (Nap, Bisseling, 1990; Hirsh, 1992). Autori secināja, ka smagāki gumiņi būs arī efektīvāki atmosfēras molekulārā slāpekļa saistītāji. Savukārt Lira ar līdzutoriem (Lira, Lima, Arruda et al., 2005) pazeminātā temperatūrā (10 °C temperatūrā) konstatēja gumiņbaktēriju efektivitātes un gumiņu izmēra samazināšanos zirņiem, lēcām un pupiņām.

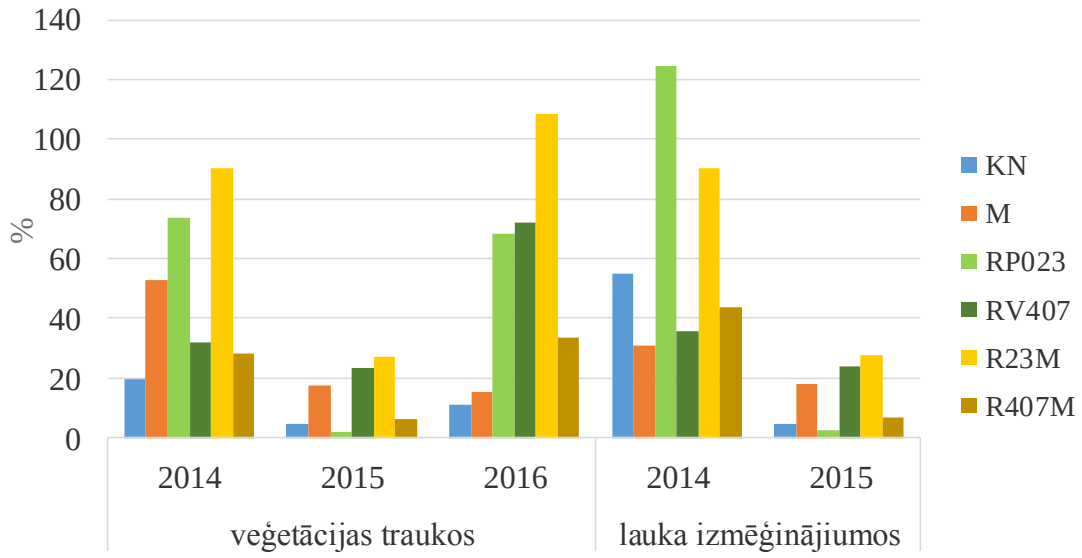


3.8.att. **Inokulāta varianta ietekme uz 100 gumiņu masu dažādos temperatūras režīmos diedzētām pupām**

Izmēģinājumos šķirnei 'Fuego' iegūta cieša korelācija (r=0.95) starp sēklu dīgšanas temperatūru un flavonoīdu eksudāciju, bet starp gumiņu masu un flavonoīdu eksudāciju vidēji cieša korelācija (r=0.77). Šķirnei 'Lielplatone' cieša korelācija (r=0.83) konstatēta tikai starp flavonoīdu eksudāciju un sēklu diedzēšanas temperatūru.

3.1.2. Dubultinokulācijas ietekme uz gumiņu veidošanos un aktivitāti

Dubultinokulācijas izmēģinājumos sākotnēji iekļauti atsevišķi baktēriju celmi. Novērtēta gumiņu veidošās mikorizas sēņu klātbūtnē. Gumiņi ievākti un analizēti gan veģetācijas trauku, gan lauka izmēģinājumos. Izmēģinājuma veidam bija ietekme uz gumiņu lielumu, attiecīgi arī mikroorganismu aktivitāti. Lielāki gumiņi bija lauka izmēģinājumos, kur gumiņu lielums pārsniedz veģetācijas trauku izmēģinājumos ievāktos par 20 – 30%. Konstatēta būtiska atšķirība, salīdzinot inokulācijai lietoto mikroorganismu vai to kombināciju ietekmi uz gumiņu lielumu gan veģetācijas trauku izmēģinājumā ($p<0.05$), gan lauka izmēģinājumā ($p<0.05$). Inokulētajos variantos gumiņi bija smagāki par kontroles variantā ievāktajiem (3.9 att.). Kontroles variantā gumiņus veidoja augsnē esošās gumiņbaktērijas, kuras ne vienmēr ir tikpat efektīvas kā atlasītajos gumiņbaktēriju celmos. Salīdzinot 100 gumiņu masu šķirnei ‘Bartek’ 2014. un 2015. gadā konstatēts, ka izveidoto gumiņu masa atšķiras būtiski ($p<0.05$). Simbiozes veidošanos ietekmē ne tikai audzē7tais kultūraugs, bet arī vides apstākļi. 2015. gadā veidojās mazāki gumiņi, jo jūnijā nokrišņu bija mazāk nekā ilggadējā norma (49% no normas). Intensīvai gumiņu darbībai nepieciešams saņemt fotosintēzes produktus no auga, bet augam nelabvēlīgos augšanas apstākļos, arī šo produktu plūsma gumiņu virzienā ir apgrūtināta vai apturēta.

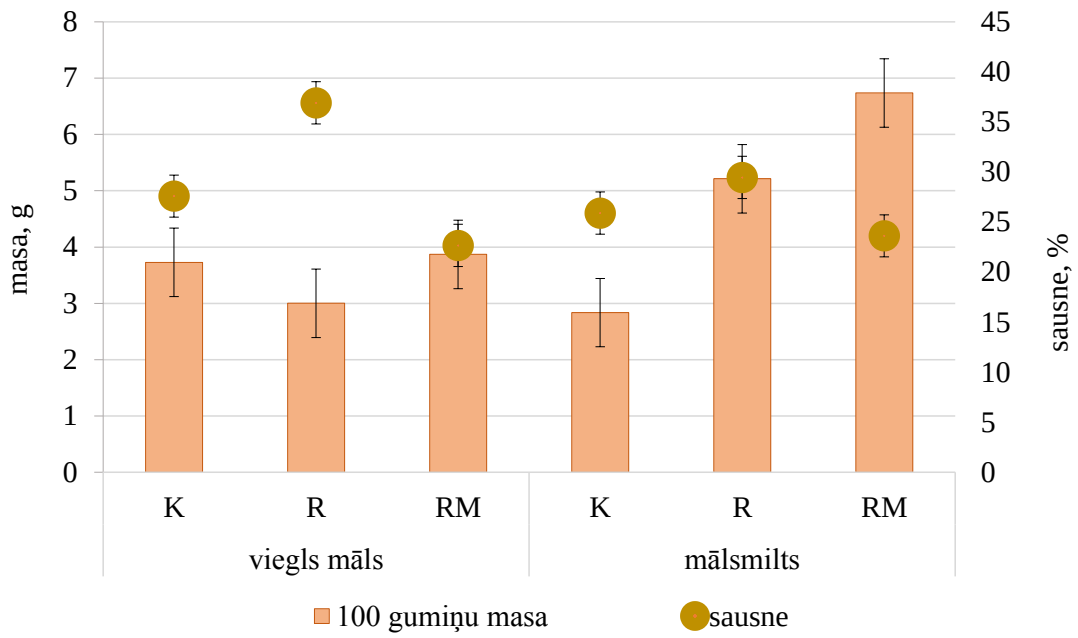


3.9.att. **100 gumiņu masa izteikta % pret kontroles varianta gumiņu masu 2014., 2015. un 2016. gada veģetācijas trauku un 2014., 2015. g. lauka izmēģinājumos šķirnei ‘Bartek’**

Dubultinokulācijai lietotie gumiņbaktēriju celmi pa gadiem uzrādīja atšķirīgu aktivitāti, tāpēc izmēģinājumi tika turpināti ar gumiņbaktēriju asociāciju. Augsnes granulometriskā sastāva ietekmi uz gumiņu parametriem varēja konstatēt veģetācijas trauku izmēģinājumos divos pēc granulometriskā sastāva atšķirīgos substrātos - vieglā māla un mālsmiltī. Izmēģinājums iekārtots substrātā, kur iepriekš jau augušas inokulētas pupas. Līdzīgi, kā izmēģinājumos ar atsevišķiem gumiņbaktēriju celmiem, kur konstatēta atšķirīga dažādu

gumiņbaktēriju celmu aktivitāte (3.5.att.), arī šajā gadījumā varēja konstatēt gumiņu veidošanās atšķirības (3.10.att). Uz pupu saknēm gumiņus varēja veidot augsnē esošās gumiņbaktērijas, kā arī iepriekšējā veģetācijas gadā sēklu inokulēšanai lietotās baktērijas. Lielāki gumiņi veidojās mālsmilts augsnē, bet 100 gumiņu masa, kā arī gumiņu sausna abās augsnēs statistiski būtiski neatšķīrās, izņemot gumiņu masa dubultinokulācijas variantā bija lielāka mālsmilts augsnē. Vieglākā substrātā iepriekš inokulētajos variantos veidojās lielāki gumiņi nekā kontrolē. Māla substrātā visos variantos gumiņu masa bija līdzīga. Augsnes granulometriskais sastāvs un audzētie kultūraugi ietekmē gumiņbaktēriju populācijas aktivitāti. Augsnes apstākļu kopuma ietekmi, ka būtisku faktoru, kas ietekmē gumiņbaktēriju virulences saglābšanās ilgumu, atzinuši vairāki autori (Nutman, Herane, 1979; Depret, Hout, Allard et al., 2004; Johansson, Paul, Finlay, 2004).

Atšķīrās izveidoto gumiņu aktivitāte starp inokuluma variantiem ($p< 0.001$) gan viena granulometriskā sastāva substrātā, gan starp abiem substrātiem. 100 gumiņu masas un dehidrogenāžu aktivitāte atšķīrīgi korelēja dažādos inokuluma variantos (K, R, M, RM). Šķirnei 'Bartek' būtiska korelācija tikai dubultinokulācijas variantā mālsmilts substrātā ($r=0.80$). Vieglā mālā bija robežās no 0.16 līdz 0.40. Korelācijas koeficientu kritiskā vērtība inokulācijas variantiem $r_{0.05,40}= 0.36$. Augstāka dehidrogenāžu aktivitāte gumiņos liecina, ka gumiņus izveidojušas aktīvas gumiņbaktērijas. Tas atbilst literatūras datiem, kur norādīts (Boland, Schubert, 1983), ka molekulārā slāpekļa saistīšanas procesa intensitāte atkarīga no elpošanas fermentu darbības.



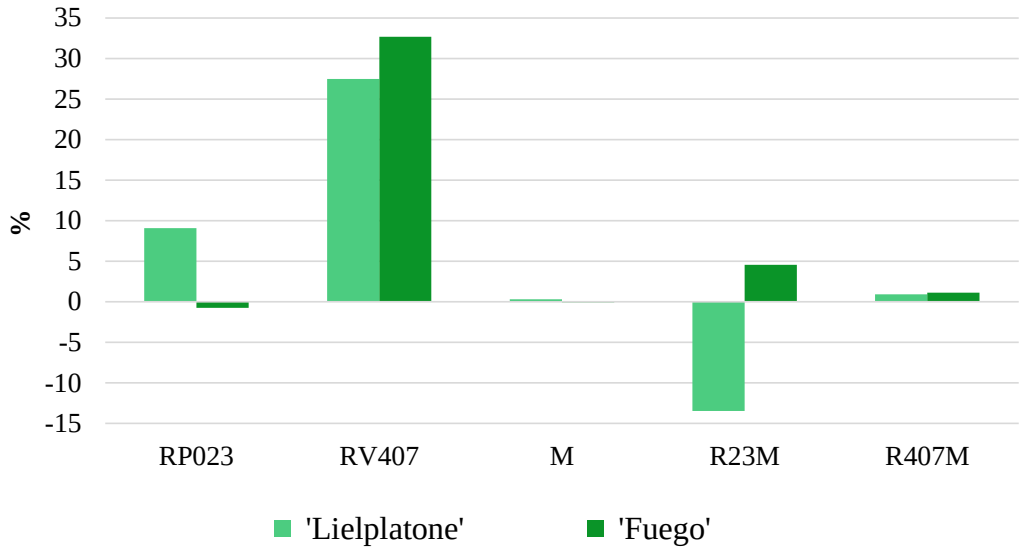
3.10.att. **Gumiņu masa un sausne šķirnei 'Bartek' atšķirīga granulometriskā sastāva substrātā**

100 gumiņu masai $RS_{0.05augsne} = 2.03$; $RS_{0.05\ inokulācijas\ variants} = 1.66$
gumiņu sausnai $RS_{0.05augsne} = 10.82$; $RS_{0.05\ inokulācijas\ variants} = 8.84$

Novērtējot gumiņu veidošanos 2016. gada lauka izmēģinājumā šķirnēm 'Lielplatone' un 'Fuego' (3.11. att.), konstatēts, ka abām šķirnēm lielākie gumiņi veidojušies ar baktērijām RV407. Kontroles varianta gumiņu izmērs pārsniegts attiecīgi par 27 un 32 %. Turpretī gumiņbaktērijas RP023 lielākus gumiņus veidoja tikai uz šķirnes 'Lielplatone' saknēm. Lietojot sēklu inokulācijai, gan baktērijas, gan mikorizas sēnes gumiņi veidojās tikai nedaudz lielāki par kontroles variantu, bet šķirnei 'Lielplatone' baktēriju celms RP023 kopā ar mikorizas sēnēm veidoja daudz sīkākus gumiņus. Cēlonis var būt neatbilstoša abu mikrosimbiontu mijiedarbība. Kā izmēģinājumos ar lucernu noskaidrojis Katfords (Catford,

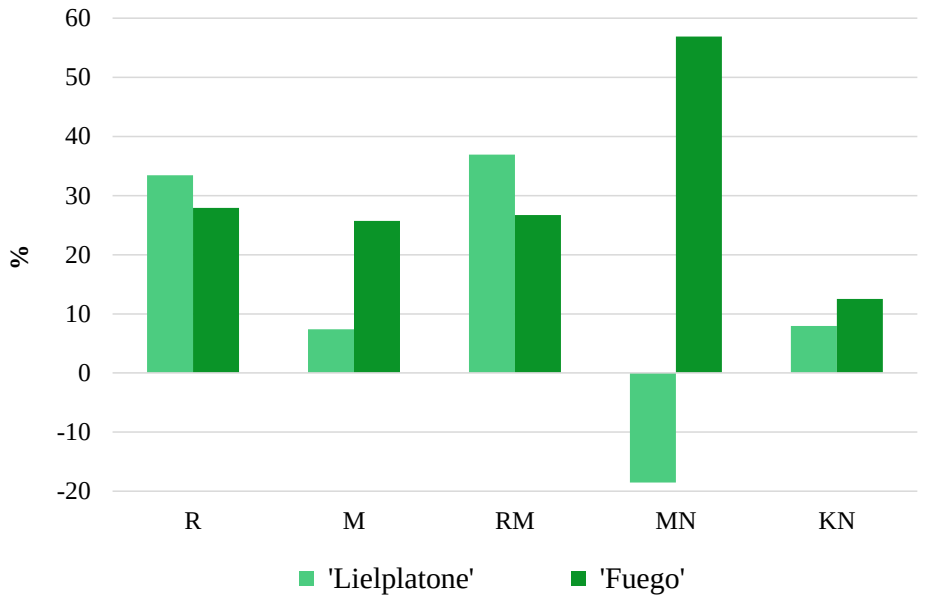
Staehelin, Lerat et al., 2003), uz saknēm, kuras jau ir inokulētas ar mikorizas sēnēm (*Glomus mosseae*), var novērot gumiņbaktēriju darbības inhibēšanu. Samazinājās izveidoto gumiņu skaits un masa. Vairumā literatūras avotu konstatējama labvēlīga simbiontu mijiedarbība, bet ir arī atšķirīgi rezultāti. Larimers (Larimer, Clay, Bever, 2014) konstatējis, ka biotiskajai mijiedarbībai var būt nozīmīgāks efekts nekā abiotiskajiem faktoriem. Gumiņu skaits uz amorfas (*Amorpha canescens*) saknēm bija lielāks mikorizētajiem augiem, bet konstatēta arī dažādu baktēriju celmu atšķirīgā reakcija uz citu simbiontu klātbūtni.

Lauka izmēģinājumos LI2017 sēklas inokulētas ar divu gumiņbaktēriju celmu asociāciju - RV023 un RP407 (tekstā un attēlos variants apzīmēts – R), jo iepriekšējo gadu izmēģinājumu rezultāti norādīja, ka nav iespējams izvēlēties vienu gumiņbaktēriju celmu, kurš būtu vienlīdz aktīvs un efektīvs gan dažādās augsnēs, gan dažādu pupu šķirnēm. Lietojot sēklu inokulēšanai kombinētu preparātu konstatēts, ka šķirnēm 'Lielplatone' un 'Fuego' (3.12. att.), variantos, kur sēklas inokulētas, veidojās lielāki gumiņi nekā kontroles variantā. Abām šķirnēm atšķirīgi rezultāti iegūti variantā, kur sējot iestrādātas mikorizas sēnes un lietots slāpekļa papildmēslojums.



3.11.att. **100 gumiņu masa izteikta % pret kontroles varianta gumiņu masu izmēģinājumā LI2016_A**

Lauka izmēģinājumos 2016. un 2017. gadā izveidoto gumiņu skaitu un lielumu ietekmēja zirņu svītrainā smecernieka (*Sitona lineatus*) kāpuri. Gumiņu uzskaites laikā (pupām ziedēšanas sākumā) ievērojamā daļā gumiņu konstatēti kāpuri. Tāpēc visu gumiņu patieso masu nebija iespējams novērtēt. Kāpuru bojātie gumiņi zaudē aktivitāti. Uz augu saknēm var veidoties jauni gumiņi, tomēr tas rada nelietderīgu auga resursu izmantošanu. Baktērijas izmanto fotosintēzes produktus simbiozes veidošanā, bet gumiņu aktivitāte ir zudusi, pirms augs saņem no gumiņa simbiotiski saistīto slāpekli. Dažādiem tauriņziežiem var veidoties atšķirīgas formas un lieluma gumiņi. Pēc augšanas veida iedala indeterminantajos un determinantajos. Pupām ir indeterminantie gumiņi – tie ir aktīvi visu auga veģetācijas periodu, kamēr augs var fotosintezēt. Gumiņa masa veģetācijas perioda beigās var sasniegt 1000 mg. Ziedēšanas sākumā gumiņu masa vidēji bija 10 līdz 150 mg. Augiem, kuru gumiņos konstatēti smecernieka kāpuri, veidojās jauni, bet sīkāki gumiņi. Gumiņu lielums tiek saistīts ar baktēriju aktivitāti, Lawrie un Wheelers (Lawrie, Wheeler, 1975) norāda, ka pupām aktīvāki gumiņbaktēriju celmi ir tie, kuri veido vidēja izmēra gumiņus. Viņu norādītais vidējais gumiņa izmērs ir 100 – 200 mg (svaiga masa), bet nav norādīts, kurā augu attīstības fāzē gumiņi ievākti.



3.12. att. **100 gumiņu masa izteikta % pret kontroles varianta gumiņu masu izmēģinājumā LI2017**

No rezultātiem var secināt, ka atsevišķu gumiņbaktēriju spēja veidot simbiozi ar pupām ir atkarīga ne tikai no augsnes īpašībām, bet arī no pupu šķirnes un augsnes mikroorganismu populācijas aktivitātes.

Piemērotāko gumiņbaktēriju celmu atlasei un to efektivitātes raksturošanai jālieto vairāki parametri. Gumiņbaktēriju aktivitāti gumiņos nevar raksturot tika ar gumiņu masu un sausni, bet papildus jāvērtē to bioķīmiskā aktivitāte.

Inokulējot pupu sēklas ar gumiņbaktēriju celmiem RP023, RV301, RV407 un RV501 nevar atzīt kādu no baktēriju celmiem par piemērotu visām izmantotajām šķirnēm jebkurā augsnes tipā. Tāpēc lietderīgi veidot vairāku baktēriju celmu asociācijas, arī lietojot dubultinokulācijā kopā ar mikorizas sēnēm.

Dubultinokulācija var pozitīvi ietekmēt gumiņu veidošanos, bet tā kā atsevišķu baktēriju celmu mijiedarbība var atšķirties gan dažāda granulometriskā sastāva augsnē, gan dažādu pupu šķirņu klātbūtnē, tad lietderīgi lietot gumiņbaktēriju asociācijas.

3.2. Mikorizas sēņu sastopamība pupu sakņu sistēmā

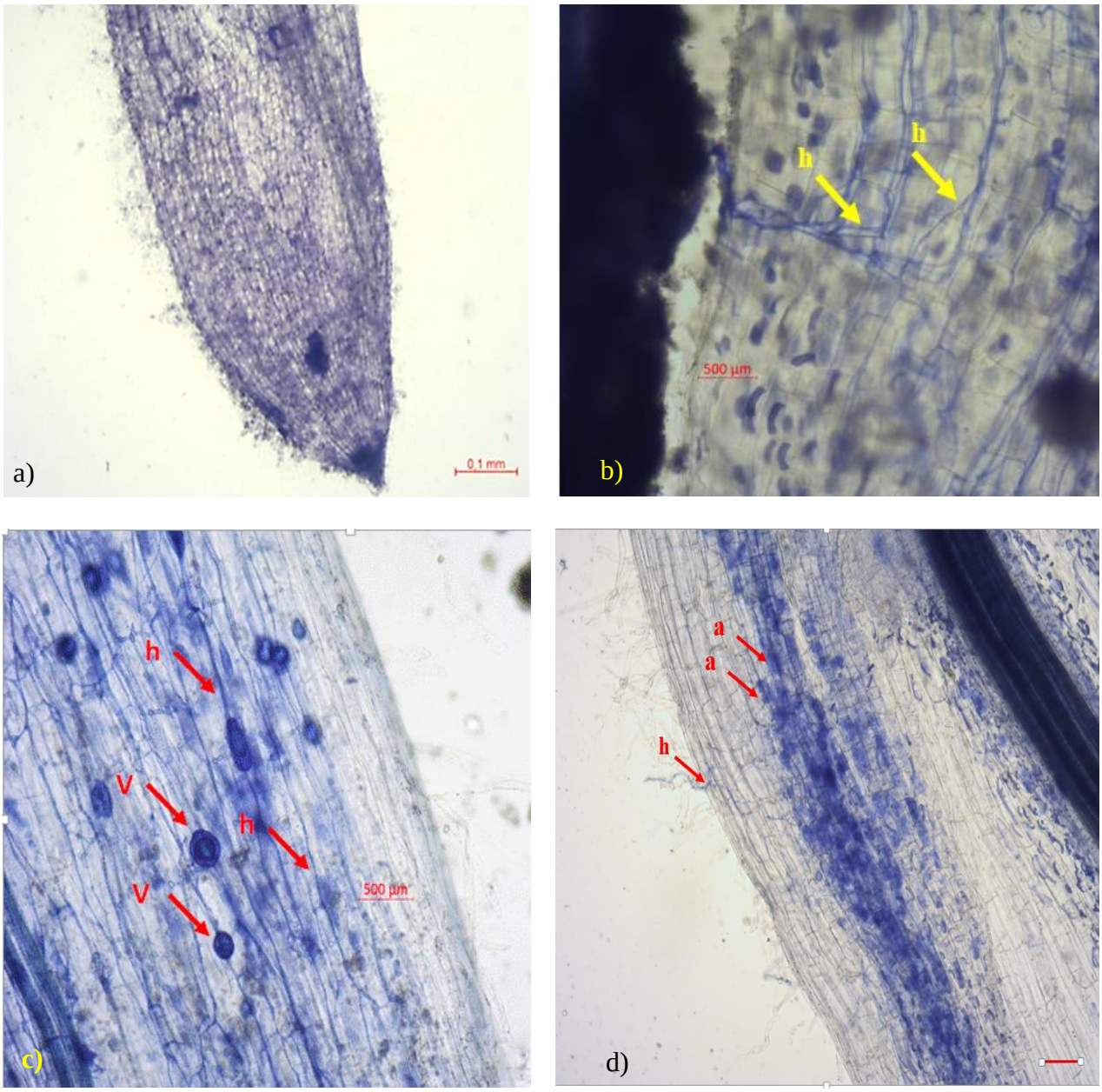
Tauriņzieži un tai skaitā pupas ir augi, kuri var veidot simbiozi gan ar gumiņbaktērijām, gan mikorizas sēnēm. Mikorizas sēņu sastopamība augu saknēs un to ietekmējošie faktori galvenokārt pētīti dabīgajās augu augtenēs. Kultūraugu augšana ietekmē cilvēka intensīva darbība, tāpēc arī augsnes mikrobiotas sastāvs un aktivitāte var atšķirties no cilvēka netransformētas vides. Lai spriestu par mikorizas sēņu inokulātu iedzīvošanos pupu saknēs un ietekmi uz ražas veidošanos, sakņu paraugi ievākti no dažādiem pupu sējumiem. Mikorizācijas pakāpes novērtēšanai sakņu paraugi ievākti no vairākiem sējumiem, kuros nebija veikta pupu sēklu inokulēšana, un augi audzēti ar dažādiem agrotehniskajiem paņēmieniem.

3.2.1. Inokulācijas ietekme uz mikorizas sēņu sastopamību pupu saknēs

Mikorizas sēņu sastopamība un mikorizācijas intensitāte pupu sakņu sistēmā novērtēta lauka un veģetācijas trauku izmēģinājumos. Simbiozes veidošanos ietekmē virkne biotisko un

abiotisko faktoru, tāpēc salīdzinot mikorizas sastopamību pupu saknēs, kas ievāktas dažādo izmēģinājumu laukos un inokulācijas variantos, var novērot atšķirīgu mikorizas sēņu sastopamību un mikorizācijas intensitāti. Pat viena varianta ietvaros var novērot sakņu paraugus, kuros nav konstatējamas sēņu hifas (3.13.att. a.), gan intensīvi mikorizētos sakņu fragmentus (3.13.att., c, d).

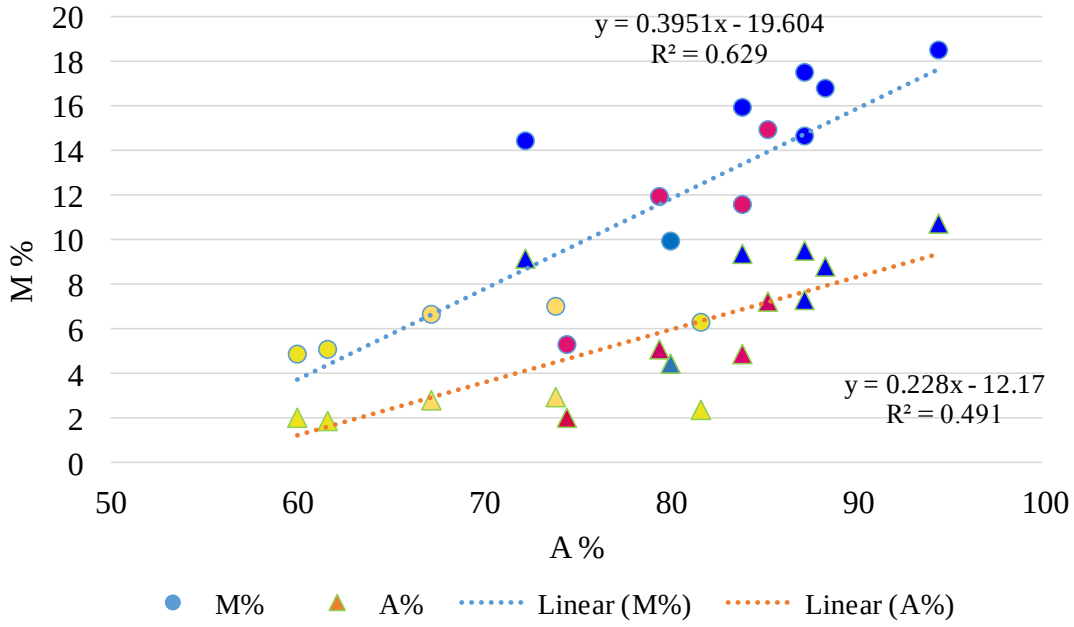
Salīdzinot mikorizācijas parametrus - mikorizu sastopamību sakņu sistēmā (F%), mikorizas kolonizācijas intensitāti sakņu sistēmā (M%) un arbuskulu daudzumu sakņu sistēmā (A%) veģetācijas trauku izmēģinājumā, šķirnēm 'Bartek' un 'Fuego' vareja konstatēt atšķirību starp variantiem ar sēklu inokulēšanu un bez inokulēšanas (3.14.att.)



3.13.att. **Pupu sakņu fragments bez mikorizas struktūrām (a), fragmenti, kuros dominē hifas (b), vezikulas (c) un arbuskuli (d)**

h – sēņu hifas,
v – vezikulas,
a – arbuskuli
(autores foto)

Augstāka sakņu mikorizācijas pakāpe augiem, kuriem sēklas inokulētas ar mikorizas sēņu preparātu, bet nedaudz zemāka pakāpe inokulējot ar gumiņbaktērijām. Neinokulētos augus papildus mēslojot ar minerālo slāpekli, arī varēja novērot augstāku mikorizācijas pakāpi. Efektīvas mikorizas veidošanai nepieciešams, lai saknēs ne tikai būtu sastopamas sēņu hifas, bet arī veidotos arbuskuli. Novērtējot mikorizāciju raksturojošo parametru kopsakarību, var secināt, ka intensīvas mikorizācijas gadījumā, ne vienmēr intensīvi veidojas arbuskuli. Kā norāda determinācijas koeficients (R^2=0.49), tikai 49% gadījumos mikorizas sēnēm kolonizējot auga saknes, intensīvi veidojas arī arbuskuli. Arbuskulu veidošanos var ietekmēt arī auga un mikorizas sēnes mijiedarbība.

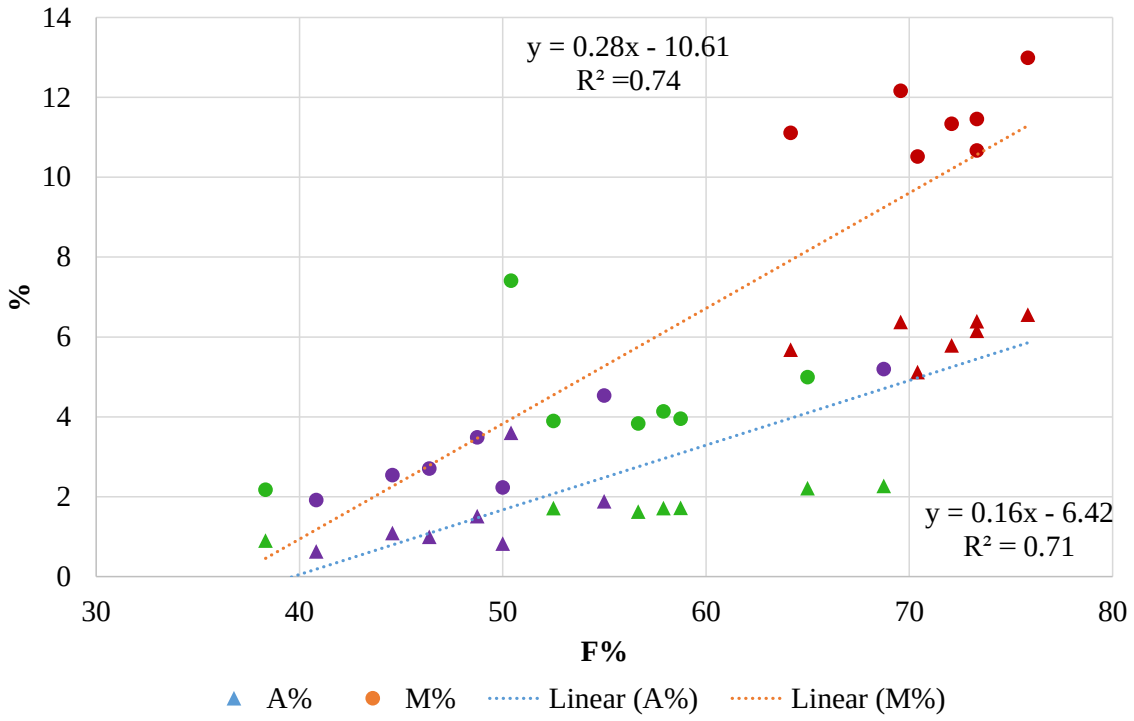


3.14.att. **Mikorizas sēņu kolonizācijas intensitātes sakņu sistēmā (M%) un arbuskulu daudzuma sakņu sistēmā (A%) attiecība pupu saknēs inokulētiem (gumiņbaktērijas, mikoriza) un neinokulētiem augiem veģetācijas trauku izmēģinājumos**

(n=900 sakņu fragmenti)

gumiņbaktērijas
mikorizas sēnes
neinokulēti

Audzējot vienādos apstākļos pupas ‘Lielplatone’, ‘Fuego’ un ‘Bartek’ varēja konstatēt atšķirīgu mikorizācijas pakāpi (3.15. att.). Augstākā mikorizas sēņu sastopamība sakņu sistēmā bija šķirnei ‘Lielplatone’. Atšķirība starp šķirnēm statistiski būtiska (p=0.00014). Arbuskulu sastopamība sakņu fragmentos augstāka bija šķirnei ‘Lielplatone’, un svārstījās no 5.12 līdz 6.55%, bet šķirnēm ‘Fuego’ un ‘Bartek’ tikai robežās no 0.90 līdz 3.60%. Arbuskuli nodrošina vielu apmaiņu starp augu un mikorizas sēni. Veidojot specializētās arbuskulu membrānās lokalizētas fosfātu un amonija jonu H^+-ATPāzes atkarīgo pārnesēju sistēmu (Barker, Tagu, Delp, 1998; Habte, 2000), tāpēc to veidošanās liecina par efektīvu vielu apmaiņu starp augu un mikorizas sēni (Bago, Azcón-Aguilar, Goulet et al., 1998). Rezultāti norāda uz mikorizas sēņu ieviešanās sakņu sistēmā atkarību no pupu šķirnes. Līdzīgi kā veģetācijas trauku izmēģinājumā (3.14.att.), lauka izmēģinājumā saknēs ar augstāku mikorizācijas pakāpi ne vienmēr bija novērojama intensīva arbuskulu veidošanās. Atbilstoši determinācijas koeficientam (R^2=0.71) tikai 71% gadījumu, mikorizas sēnēm kolonizējot, auga saknes, intensīvi veidojās arī arbuskuli.

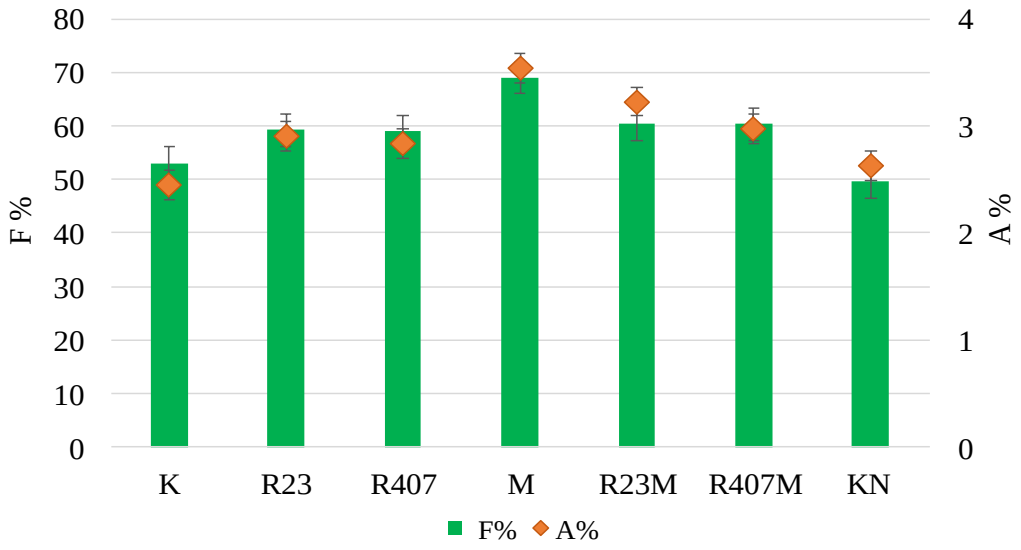


3.15.att. **Mikorizas sēņu kolonizācijas intensitāte sakņu sistēmā (M%) un arbuskulu daudzums pupu sakņu sistēmā (A%) attiecībā pret mikorizu sastopamību sakņu sistēmā (F%) šķirnēm 'Lielplatone', 'Fuego' un 'Bartek' lauku izmēģinājumos 2015. gadā**

(n –1380 sakņu fragmenti)

marķieru krāsa atbilst šķirnēm - Lielplatone' Fuego' Bartek'

Pākšaugiem simbioze var veidoties arī ar augsnē esošajām mikorizas sēnēm, tomēr, salīdzinot veģetācijas trauku izmēģinājumu rezultātus un trīs šķirņu mikorizācijas rezultātus lauka izmēģinājumos konstatēts, ka sēklu inokulēšanai ir pozitīva ietekme uz mikorizācijas intensitāti un arbuskulu veidošanos (3.16. att.). Veicot inokulāciju, sēņu sporas atrodas tiešā sēklas tuvumā un, sporām dīgstot tām iespējams ātrāk saskarties ar auga dīgļsakni. Sporas var sadīgt bez saimniekauga klātbūtnes, bet to dīgšana var apstāties, ja tās nesaņem bioķīmiskos signālu no tuvumā esošā auga saknes. Sporas dīgstot, reaģē uz auga sakņu eksudātiem (piemēram, strigolaktoniem, flavonoīdiem) palielinot hifu zarošanos un metabolisko aktivitāti (Bücking, Abubaker, Govindarajulu et al., 2008, Bücking, Liepold, Ambilwade, 2012). Starp kontroles variantu un variantu, kur sēklas inokulētas ar mikorizas sēņu preparātu konstatēta būtiska (p=0.035) atšķirība, gan mikorizas struktūru sastopamībā sakņu sistēmā, gan arbuskulu veidošanās intensitātē (A%). Pupu sēklu inokulēšana ar gumiņbaktērijām un dubultinokulēšana bija palielinājusi mikorizācijas pakāpi un arbuskulu veidošanos, bet atšķirība no kontroles nebija statistiski būtiska. Dubultinokulēšanas variantos nedaudz vairāk veidojās arbuskuli nekā variantos tikai ar gumiņbaktērijām.



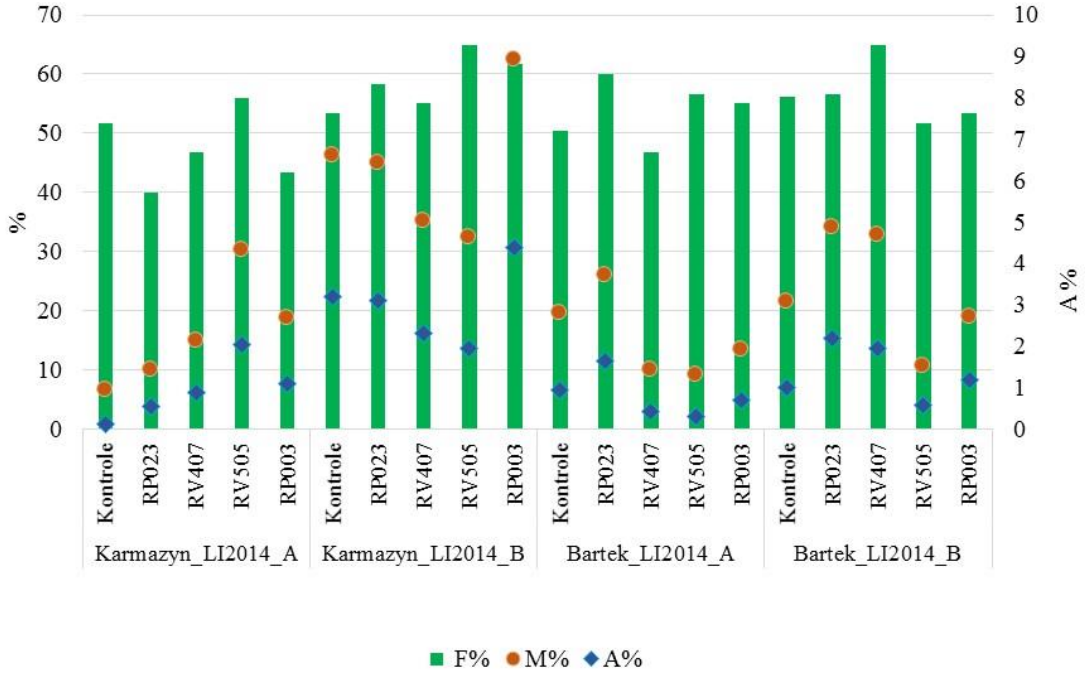
3.16.att. **Mikorizas sēņu struktūru sastopamība un arbuskulu biežums pupu sakņu sistēmā variantos ar dažādiem inokuluma variantiem lauku izmēģinājumos 2015. gadā**
mikorizas sastopamības biežums sakņu sistēmā (F%)
arbuskulu sastopamības biežums sakņu sistēmā (A%)

Simbiozes veidošanos ietekmē virkne vides faktoru, tai skaitā augsnes tips, līdz ar to pieejamās barības vielas un mikroklimats. Augsnes tips konkrētās vietas apstākļi izmaina augsnes dabīgās mikrobiotas kvantitatīvo un kvalitatīvo sastāvu, tai skaitā mikorizas sēņu sugu daudzveidību. Dabīgi augsnē esošo mikorizas sēņu ieviešanās saknēs salīdzināta pupām 'Bartek' un 'Karmazyn' divās atšķirīgās augsnēs - trūdaini kūdrainā glejaugsnē un velēnu podzolaugsnē. Pupas audzētas gan bez gumiņbaktēriju inokulācijas, gan inokulētas ar dažādiem gumiņbaktēriju celmiem. Salīdzinot mikorizas sēņu sastopamību šķirņu 'Karmazyn' un 'Bartek' saknēs, noteikts, ka pastāv būtiska atšķirība starp mikorizācijas pakāpi abās audzēšanas vietās šķirnei 'Karmazyn' (3.17. att.).

Trūdaini kūdrainā glejaugsnē augošajām pupām mikorizas sastopamība saknēs ir zemāka nekā velēnu podzolaugsnē. Statistiski būtiski atšķīrās gan mikorizas sastopamības biežums sakņu sistēmā ($p=0.025$), gan arbuskulu sastopamības biežums ($p=0.031$). Novērtējot inokulācijas ar gumiņbaktērijām ietekmi uz mikorizas sastopamību saknēs, netika konstatēta statistiski būtiska atšķirība. Konstatējama tikai tendence, ka šķirnei 'Karmazyn' mikorizas sastopamība saknēs abās augsnēs augstāka augiem, kuri inokulēti ar gumiņbaktēriju celmu RV505. Arbuskulu sastopamības intensitāte saknēs augstāka ar gumiņbaktēriju celmu RP003 velēnu podzolaugsnē, bet trūdaini kūdrainā glejaugsnē ar gumiņbaktēriju celmu RV505. Šķirnei 'Bartek' mazāk izteikta atšķirība starp abām audzēšanas vietām, tomēr var konstatēt inokulēšanā lietoto gumiņbaktēriju celmu ietekmi.

Velēnu podzolaugsnē mikorizas sastopamība saknēs augstāka ar celmu RV407, bet mikorizas sastopamības intensitāte (M%) un arbuskulu sastopamība saknēs (A%) viszemākā. Trūdaini kūdrainā glejaugsnē mikorizas sastopamība līdzīga variantos, kuri inokulēti ar gumiņbaktēriju celmiem RP023, RV505, RP003, bet arbuskulu sastopamība visaugstākā ar gumiņbaktēriju celmu RV505 (3.19.att.). Auga saknes anatomija un augšanas īpatnības dažāda tipa augsnēs raksturotas arī vairāku autoru darbos. Carrenho ar līdzautoriem (Carrenho, Trufem, Bononi et al., 2007) analizējot zemesriekstu, sorgo un kukurūzas, bet Vilsons un Robards (Wilson, Robards, 1978) miežu sakņu un mikorizas sēņu mijiedarbību konstatēja, ka augsnēs ar augstāku māla saturu mikorizas ieviešanās saknēs ir mazāk izteikta. Norādot, ka blīvākās augsnēs epidermas šūnās ir augstāka suberīna koncentrācija, kas ierobežo mikorizas sēņu iekļūšanu auga saknēs. Pākšaugu saknes nav tik attīstītas kā

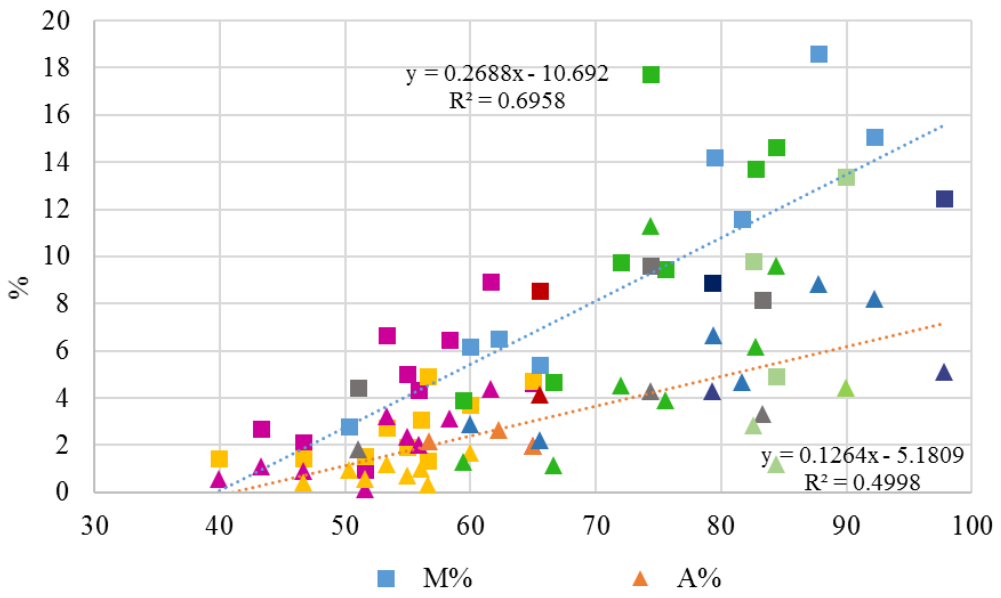
graudzālēm, tāpēc tās intensīvāk saista barības vielas, lai nodrošinātu auga vajadzību. Augsnēs ar augstu fosfora koncentrāciju, augiem nav nepieciešama papildu palīdzība tā uzņemšanai, tāpēc samazinās arī sakņu eksudātu apjoms, bet tas savukārt reducē dīgstošo mikorizas sēņu sporu spēju saistīties pie auga saknēm (Tawaraya, Hashimoto, Wagatsuma, 1998).



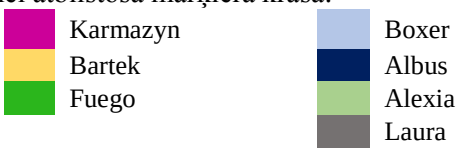
3.17. att. **Mikorizu struktūru sastopamība sakņu sistēmā (F%), sakņu kolonizācijas intensitāte (M%) un arbuskulu sastopamība (A%) ar dažādiem gumiņbaktēriju celmiem inokulētām pupām 'Karmazyn' un 'Bartek' izmēģinājumos LI2014A_A un LI2014_B**

Mikorizas sēņu sastopamība sakņu sistēmā atšķīrās ne tikai augsnēs ar dažādām īpašībā, bet, salīdzinot vairākas, gan lielsēklu, gan sīksēklu šķirnes, novērots, ka izteiktāka mikorizas veidošanās ir sīksēklu šķirnēm. Lielsēklu šķirnēm 'Bartek' un 'Karmazyn' mikorizas sēņu struktūru sastopamība un arbuskulu veidošanās bija mazāk izteikta (3.18. att.).

Inokulējot pupu sēklas ar dažādiem gumiņbaktēriju celmiem, gan veģetācijas trauku, gan lauka izmēģinājumos novērota atšķirīga mikorizācijas intensitāte un arbuskulu veidošanās. Tāpēc 2017. gadā lauka izmēģinājumos pupas bija inokulētas ar divu gumiņbaktēriju celmu kombināciju (RP023 un RV407). Pupu sēklu inokulēšanas ietekme vairāk izpaudās šķirnei 'Lielplatone' (3.19. att.). Mikorizas sēņu struktūru sastopamība pupu saknēs nedaudz lielāka (statistiski nebūtiski) bija kontroles variantā, tomēr mikorizācijas intensitāte (M%) un arbuskulu sastopamība (A%) augstāka bija inokulētajos variantos. Šķirnei 'Fuego' būtiski ($p<0.05$) vairāk arbuskuli bija veidojušies tikai variantā ar mikorizas sēņu preparātu. Minerālā slāpekļa papildmēslojums pēc augu sadīgšanas nebija veicinājis mikorizas sēņu iedzīvošanos pupu saknēs.

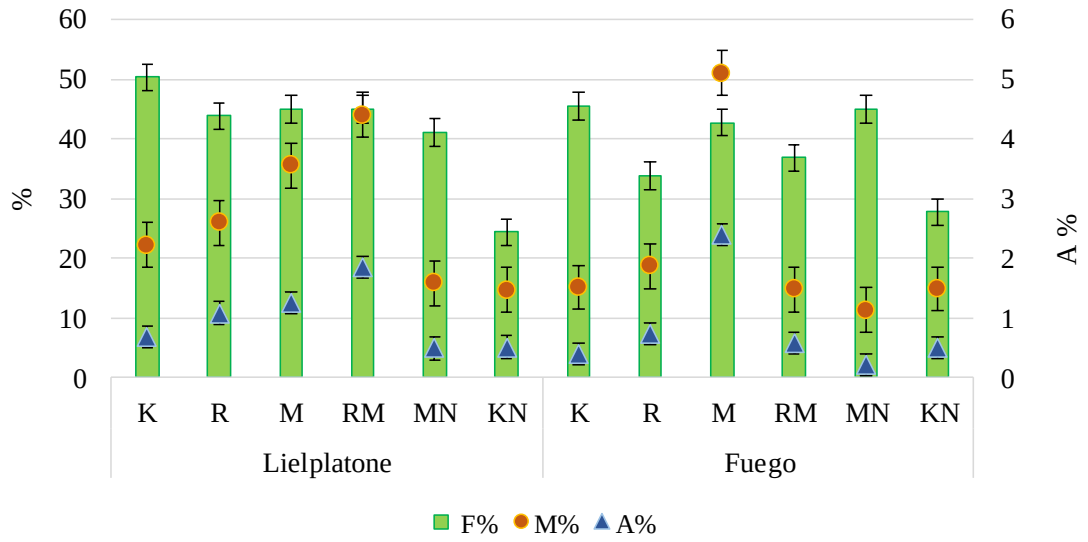


3.18.att. **Mikorizas sēņu iedzīvošanās un sēņu struktūrelementu sastopamības korelācija pupu saknēs dažādās audzēšanas vietās 2015. gadā** (n-2610 sakņu fragmenti)
mikorizas sastopamības biežums sakņu sistēmā (F%);
sakņu kolonizācijas intensitāte sistēmā (M%);
arbuskulu sastopamības biežums sakņu sistēmā (A%);
šķirnei atbilstošā marķiera krāsa:



Kā norāda Meiers un Lindermans (Meyer, Linderman, 1986) vezikulāri-arbuskulārās mikorizas sēnes ir interesantas ar savu mikrobiālo mijiedarbību augsnē, jo to aktivitāte ietekmē mikroorganismu populācijas sastāvu. Savukārt mikroorganismi, atgriezeniski ietekmē mikorizas formēšanos un funkcionēšanu. Šāds rezultāts liecina par mikroorganismu savstarpējo pozitīvo mijiedarbību. Mikorizas sēņu iedzīvošanos saknēs var ietekmēt arī augs. Augi, kuriem audzēšanas apstākļi ir atbilstoši, stimulē simbiotisko mikroorganismu iedzīvošanos. Savukārt mikroorganismi, nodrošinot augiem optimālākus minerālās barošanās apstākļus, paaugstina fotosintēzes intensitāti (Kaschuk, Kuyper, Leffelaar et al., 2009) un veicina augšanu. Tāpēc augu augšana un fotosintēzes intensitāte ir parametri, kuri liecina arī par efektīvas simbiozes izveidošanos.

Augu augšanas apstākļu novērtēšanai lieto dažādus Fotosintēzes procesu raksturo virkne parametru, bet aizvien plašāku pielietojumu gūst hlorofila fluorescences mērījumi un ar to saistītie parametri. Šāds parametrs ir arī auga vitalitātes indekss (*performance index*, PI), kurš raksturo auga spēju efektīvi izmantot barības elementus, sniedz kvantitatīvu informāciju par vispārējo augu stāvokli un to vitalitāti (Kalaji, Jajoo, Oukarroum et al. 2016). Salīdzinot vitalitātes indeksa (1.piel.) izmaiņas un mikorizas sastopamību sakņu sistēmā varēja konstatēt, ka visos variantos starp jūnija un jūlija mērījumu reizēm vitalitātes indekss bija palielinājies. Tas liecina, ka augi veģetācijas perioda pirmajā pusē bija atradušies nelabvēlīgākos apstākļos. Jūnijā zemākais PI indekss bija variantos, kur augi inokulēti ar mikorizas sēnēm un kontroles variantos. Iespējams, ka cēlonis bija intensīvāka mikorizas sēņu kolonizēšana, kas var konkurēt ar augu. Jūlijā variantā, kur augi inokulēti ar mikorizas sēnēm, varēja novērot gan mikorizas sēņu struktūras, gan blīvāk izveidojušos arbuskulus. Vienlaicīgi arī vitalitātes indekss bija paaugstinājies.



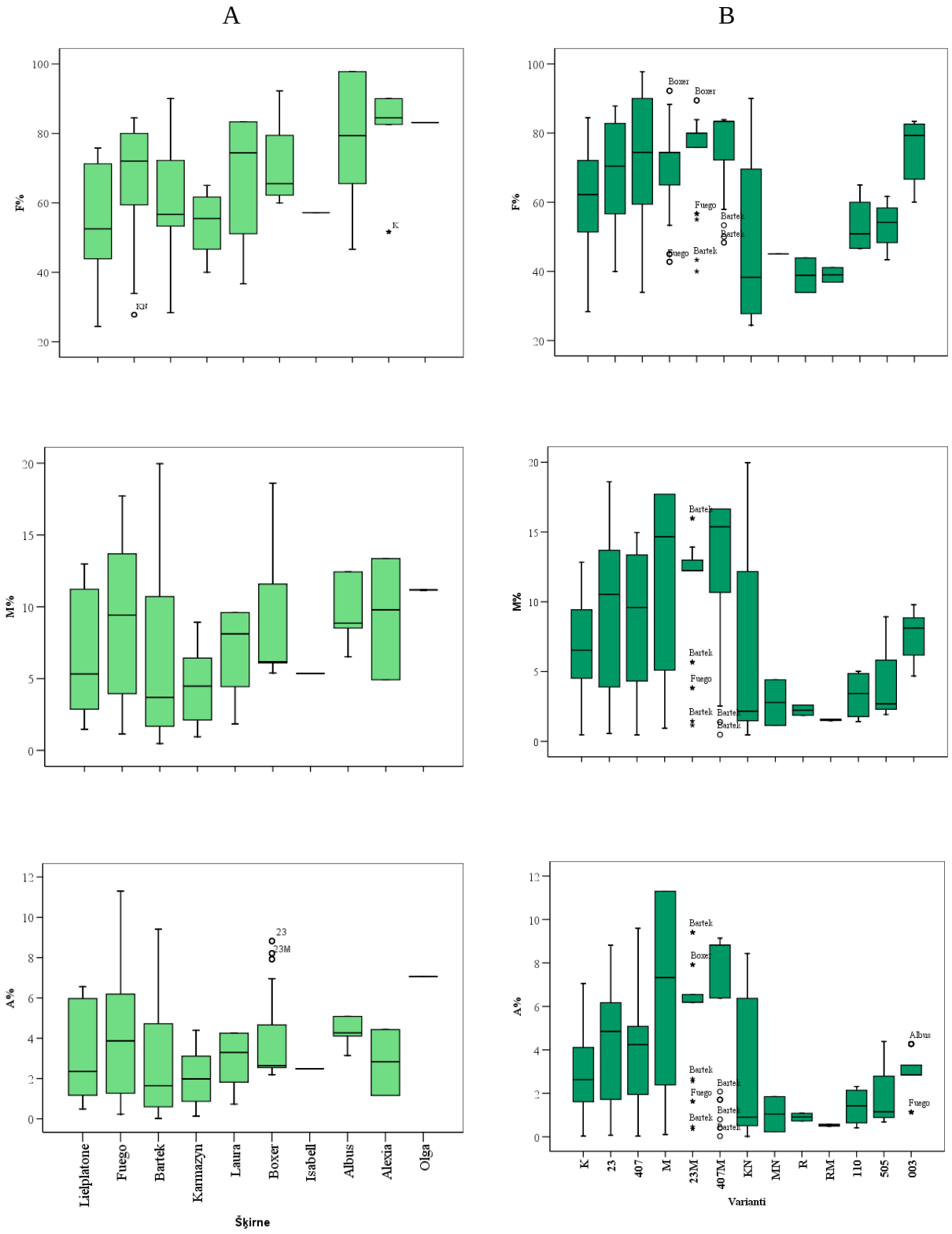
3.19 att. **Mikorizas sēņu sastopamība pupām 'Lielplatone' un 'Fuego' izmēģinājumā LI2017**

F% – mikorizas struktūru sastopamība sakņu sistēmā
M% – mikorizācijas intensitāte sakņu sistēmā
A% – arbuskulu sastopamība sakņu sistēmā

Jūnijā un jūlijā pupas zied, tām veidojas pākstis, tāpēc augšanas apstākļiem jābūt piemērotiem, lai nodrošinātu gan auga, gan mikrosimbiontu vajadzības. Augiem ar dubultinokulāciju vitalitātes indekss augstāks nekā tikai ar mikorizas sēnēm, bet arbuskuli saknēs veidojas mazāk.

Arbuskulu funkcionēšanas rezultātā augiem būtu jāveido lielāka virszemes augu masa un jāuzkrāj sausne. Tomēr ne visos gadījumos to varēja novērot. Tas saskan ar (Lerat, Piche, Lapointe et al., 2003) rezultātiem, ka mikorizētajiem augiem var konstatēt zemāku sausnas daudzumu. Inokulācijā lietotās mikorizas sēnes var nomākt ražas veidošanos, ja augsnes dabīgā mikorizas asociācija ir efektīva. Kā norāda Khaliks un Sanders (Khaliq, Sandes, 2000) ar vienu mikorizas sugu inokulētiem miežiem konstatēja nelielu (3 – 4%) ražas samazinājumu, salīdzinot ar neinokulētiem. Kovacs ar līdzautoriem (Kovacs, Scigetvari, 2002) secina, ka auga dzinumu veidošanās aizkavēšanos ietekmē fotosintēzes produktu plūsmas intensitāte un augam pieejamo barības elementu daudzuma izmaiņas, ja mikrosimbionts konkurē par barības vielām.

Mikorizas sēņu un gumiņbaktēriju mijiedarbība ir interesanta, jo abi mikroorganismi kolonizē saimnieciski nozīmīgu augu – tauriņziežu saknes. Mijiedarbība starp šo grupu mikroorganismiem tiek intensīvi pētīta konstatējot gan ar minerālelementu apmaiņu saistītu mijiedarbību, gan saimniekauga regulētu ar barības elementiem tieši nesaistītu. Tomēr mazāk pētīta ir noteiktu Rhizobium ģints baktēriju sugu un celmu mijiedarbība ar dažādiem mikorizas sēņu celmiem (Ames, Bethlenfalvay, 1987; Pacovsky, Baybe, Bethlenfalvay, 1984). Novērtējot trīs mikorizas sēņu sugu un sešu gumiņbaktēriju celmu mijiedarbības efektu uz lucernas (*Medicago sativa* L.) augšanu minerālelementu uzņemšanu konstatēts, ka pastāv atšķirīga mijiedarbība starp šiem simbiontiem. Atšķirīgu efektu konstatēja gan uz auga augšanu, gan minerālelementu (Ca un Mg) uzņemšanu (Azcon, Rubio, Barea, 1991). Mikorizas sēnes uzlabo auga apgādi ar grūtāk šķīstošajiem barības elementiem, piemēram, fosforu, bet samazinoties augsnes mitrumam, tās var augu papildus apgādāt arī ar slāpekli (Tobar et al., 1994). Trīspusējās simbiozes asociācijas ir efektīvākas slāpekļa un fosfora piegādē augam nekā mikorizas sēnes vai gumiņbaktēriju inokulācija atsevišķi (Azcon, Rubio, Barea, 1991).

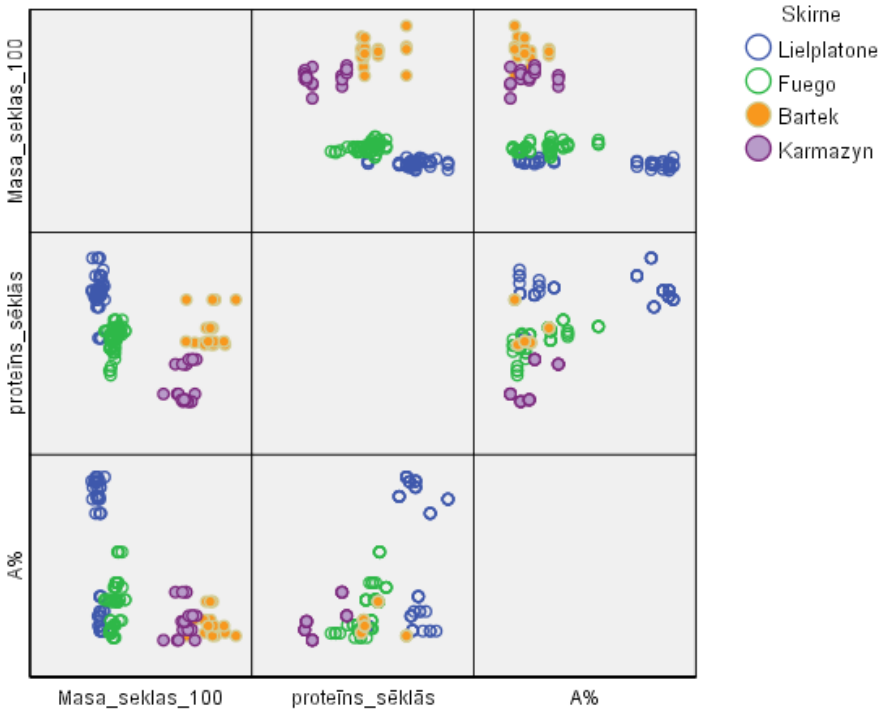


3.20.att. **Mikorizas sēņu struktūru sastopamība dažādu šķirņu pupu saknēs inokulētiem un neinokulētiem augiem atkarībā no šķirnes (A kolonna) un inokulācijas (B kolonna)**

Apkopojot analizēto pupu šķirņu un inokulācijas variantu rezultātus, var secināt, ka mikorizas sēņu izplatība pupu saknēs variē plašā diapazonā. Vairākām sīksēklu šķirnēm ‘Lielplatone’, ‘Fuego’, ‘Laura’ un ‘Boxer’ mikorizas sēņu struktūras (F%) konstatējamas vairāk nekā 60% gadījumu (3.20.att. a). Tomēr mikorizācijas intensitāte (M%) virs 10% bija tikai šķirnēm ‘Lielplatone’ un ‘Boxer’. Abām šķirnēm konstatēta arī intensīvāka arbuskulu

veidošanās. Novērtējot inokulācijas ietekmi ar mikorizas sēnēm atsevišķi un kopā ar gumiņbaktērijām, redzams, ka inokulācija ir pozitīvi ietekmējusi mikorizas sēņu iedzīvošanos pupu saknēs. Vairumā gadījumu intensīvāka mikorizas izplatīšanās un arbuskulu veidošanās saknēs konstatējama variantā ar mikorizas sēņu preparātu (M) un dubultinokulācijas variantā (RM). Zemākā mikorizācijas pakāpe abos kontroles variantos (K un KN) un variantā ar mikorizas sēnēm un slāpekļa papildmēslojumu (MN). Minerālā slāpekļa papildmēslojums nav veicinājis mikorizas sēņu iedzīvošanos pupu saknēs (3.20.att. b).

Mikorizas sēņu struktūru veidošanās ietekme uz pupu sēklu ražu un kvalitāti, novērtējot korelācija starp arbuskulu veidošanās intensitāti, proteīna saturu pupu sēklās un 100 sēklu masu, bija atšķirīga dažādu grupu pupām (3.21. att.).



3.21. att. **Arbuskulu veidošanās intensitātes korelācija ar proteīna saturu pupu sēklās un 100 sēklu masu**

Intensīvāka arbuskulu veidošanās proteīna saturu sēklās paaugstināja šķirnei ‘Lielplatone’, bet rupjsēklu šķirnēm arbuskulu daudzums proteīna saturu sēklās neietekmēja. Kā noskaidrojās izvērtējot mikorizācijas pakāpi un intensitāti dažādām pupu šķirnēm (3.18.att.), rupjsēklu šķirnēm mikorizas sēņu struktūras saknēs bija retāk sastopamas.

3.2.2..Augsnes mikrobiotas un inokulātu mijiedarbība

Auga un mikroorganismu simbiotisko attiecību veidošanos var ietekmēt rizosfēras mikroorganismu, jo augsnes dabīgā un ar inokulāciju ienestā mikrobiota izmaina apstākļus saknes tuvumā. Dabīgā mikrobiota var aktīvi konkurēt ar inokulācijā lietotajiem baktēriju celmiem un mikorizas sēnēm par iespēju veidot simbiozi ar augiem.

Salīdzinot baktēriju un mikroskopisko sēņu skaitu pupu sakņu zonā ziedēšanas sākumā (AS 60 – 65) veģetācijas trauku izmēģinājumos 2016. un 2017. gadā novērotas atšķirības starp inokulātu variantiem. Kaut arī veģetācijas traukos augiem ir nodrošināti līdzvērtīgāki audzēšanas apstākļi visos variantos, tajā pašā laikā sakņu sistēma ir ierobežotā tilpumā. Tāpēc

krasāk var novērot atšķirības kopējā aerobo baktēriju un mikroskopisko sēņu skaita izmaiņās dažādos inokulācijas variantos (2.pielikums). Salīdzinot abu veģetācijas gadu rezultātus, varēja secināt, ka, tikai gumiņbaktēriju RP023 variantā baktēriju kopskaits palielinājās. Citos variantos baktēriju un mikroskopisko sēņu skaits samazinājās vidēji par 11 līdz 27%. Variantos, kur augi inokulēti tikai ar mikorizas sēnēm baktēriju kopskaits samazinājās, bet sēņu skaits nebūtiski palielinājās vidēji par 3.2%. Variantos ar dubultinokulāciju mikroorganismu kopskaits samazinājās tikai atsevišķos variantos (RV407M), bet pārējos variantos palielinājās vidēji pat 0.7 līdz 8.4%. Mikroorganismu skaita izmaiņu varēja ietekmēt sakņu izdalījumi, kuru sastāvs var mainīties no auga fizioloģiskā stāvokļa. Tas saskan ar literatūras datiem, ka augu sakne, izdalot vielmaiņas produktus (Tawaraya, Hashimoto, Wagatsuma, 1994) savukārt var izmainīt mikroorganismu aktivitāti. Baktēriju skaits palielinājās variantos, kur sēklas inokulētas ar abiem mikrosimbiontiem, bet atsevišķi inokulējot, tikai ar gumiņbaktēriju celmu RP023. Inokulējot sēklas ar mikorizas sēņu preparātu, sakņu zonā samazinājās gan baktēriju, gan mikroskopisko sēņu skaits attiecīgi par 27.6 un 25.6%, salīdzinot ar kontroles variantu. Baktēriju telpiskā izvietojuma izmaiņas un biomasa samzināšanos mikorizētu gurķu rizosfērā konstatējis arī Kristensens un Jakobsens (Christensen, Jakobsen, 1993).

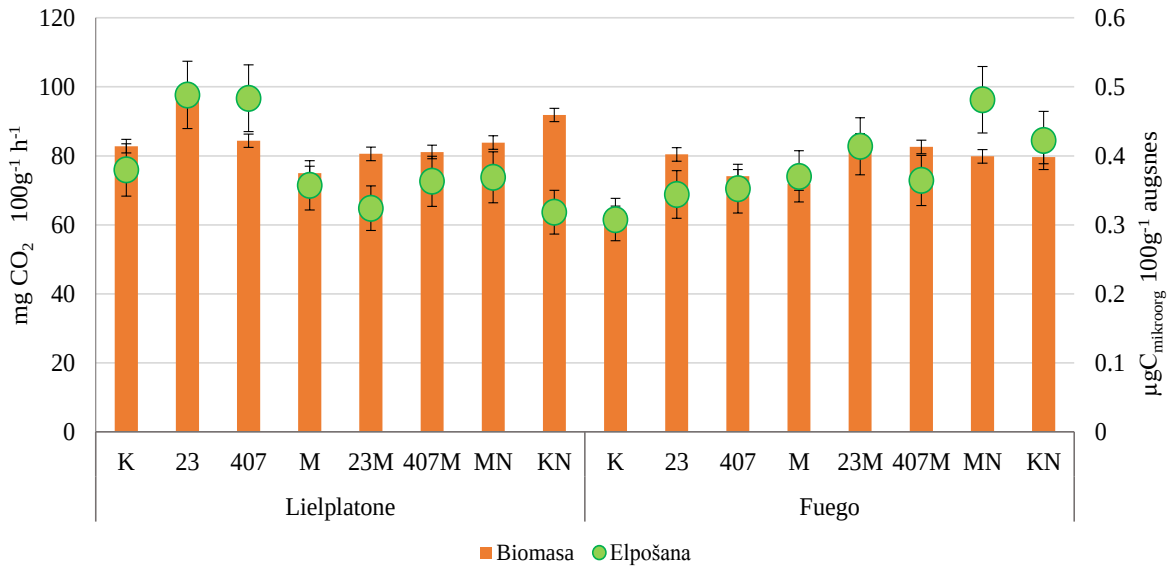
Arī inokulēšanā lietotie mikroorganismi var ietekmēt auga saknes augšanu un fizioloģisko aktivitāti. Mainoties auga eksudātu kvalitatīvajam un kvantitatīvajam sastāvam, ko ietekmē auga fizioloģiskais stāvoklis, var izmainīties mikroorganismu dominējošās grupas, palielināties vai samazināties to daudzveidība. Kā noskaidrojās sēklu dīgtspējas un dīgļsaknes augšanas izmēģinājumos (3.7.att.), inokulēšanā lietotie mikroorganismi var gan stimulēt, gan aizkavēt saknes augšanu.

Lindermans (Linderman, 1988) apkopojot vairāku autoru darbus, norāda, ka mikorizas asociāciju veidošanos labvēlīgi ietekmē rizosfēras mikroorganismi. Pozitīvs efekts uz hifu augšanu novērots pievienojot sterilizētai augsnei nesterilizētas augsnes ekstraktu. Kā cēlonis tiek minēti dažādi mikroorganismu izdalītie gaistošie savienojumi.

Par atšķirīgu inokulācijā lietoto asociāciju mijiedarbību ar augsnes mikroorganismiem un augu saknēm varēja pārliecināties izmēģinājumā arī 2017. gada veģetācijas trauku izmēģinājumā. Pupām 'Bartek' dubultinokulācijas variantā mikroorganismu biomasa zemāka, nekā atsevišķi lietojot gumiņbaktērijas un mikorizas sēnes (3. pielikums). 2017. gadā inokuēšanai lietota gumiņbaktēriju asociācija, tāpēc nebija novērojamas 2016. gadā konstatētās svārstības, variantos ar atsevišķiem gumiņbaktēriju celmiem. Augsnes elpošanas intensitāte, ko ietekmē mikroorganismu aktivitāte, dubultinokulācijas variantā būtiski neatšķīrās no variantiem ar atsevišķiem mikrosimbiontiem.

Lauka izmēģinājumos atšķirības starp inokulātu variantiem, salīdzinot mikroorganismu aktivitāti un skaitu, mazāk izteiktas (3.22.att.), salīdzinot ar veģetācijas traukiem. Augstāka mikroorganismu aktivitāte kontroles variantā ar minerālo slāpekļa mēslojumu un variantos, kur mikorizas inokulēšana bija papildināta ar minerālo slāpekļa mēslojumu, liecina par pieejamā slāpekļa nozīmi mikroorganismu darbībā.

Pēc literatūras datiem mikroskopiskajām sēnēm augsnē var būt atšķirīga ietekme uz mikorizas sēņu sporu dīgšanu un hifu augšanu. Konstatētas sēņu sugas, kuras var aizkavēt mikorizas sēņu sporu dīgšanu, turpretī citām sēņu sugām konstatēta stimulējoša ietekme uz *Glomus mosseae* augšanu un auga sakņu kolonizēšanu (Willis, Rodrigues, Harris, 2013). AM sēņu un saprotrofo sēņu mijiedarbība ir pētīta gan *in vitro* pētījumos, kur konstatēts, ka AM sēnēm un saprotrofām sēnēm var būt stimulējoša, inhibējoša vai neitrāla mijiedarbība uz sporu dīgšanu vai hifu augšanu, gan veģetācjas trauku, un lauka izmēģinājomos. Konstatēts, ka saprotrofās sēnes var ietekmēt AM sēņu attīstību auga saknēs. Novērtējot saprotrofo sēņu populāciju rizosfēras zonā, novērots, ka arī AM sēnes ietekmē saprotrofo sēņus spēju kolonizēt auga saknes, bet mijiedarbība atkarīga no sēņu sugas (Siddiqui, Pichtel, 2008).



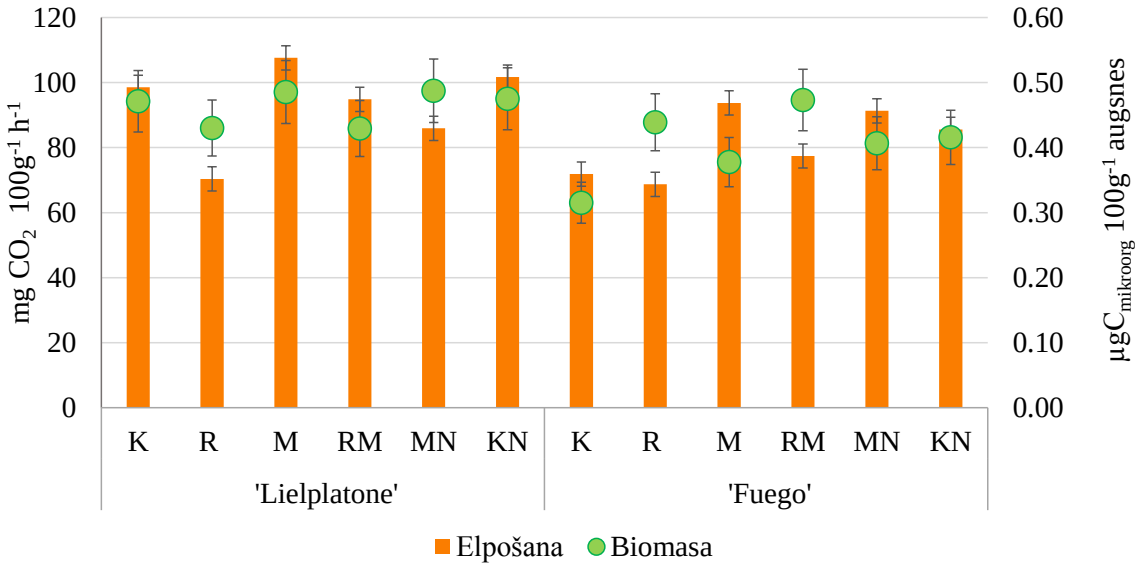
3.22. att. **Mikroorganismu biomasa un augsnes elpošanas intensitāte LI2016_A izmēģinājumā pirms ražas novākšanas**

Salīdzinot baktēriju un mikroskopisko sēņu skaita izmaiņas pupu sakņu zonā ziedēšanas fāzē un pirms ražās novākšanas izmēģinājumā LI_2017 konstatēts, ka mikroskopisko sēņu skaita izmaiņas lielākas bija šķirnei 'Lielplatone', kur veģetācijas beigās bija palielinājies mikroskopisko sēņu skaits sakņu zonā. Šķirnei 'Fuego' mikroskopisko sēņu skaita pieaugums bija vērojams tikai variantos ar gumiņbaktēriju inokulāciju (R) un mikorizas sēnēm, kur lietots papildus minerālais slāpeklis (2. piel., 1.att.). Veģetācijas perioda beigās, abām šķirnēm, būtiski ($p<0.05$) bija palielinājies gumiņbaktēriju skaits sakņu zonā (3.24. att.).

Pupām ziedēšanas fāzē, sakņu zonā baktēriju daudzums lielāks bija variantos ar inokulātu (2. piel., 2.att.). Minerālā slāpekļa papildus mēslojums nebija palielinājis baktēriju skaitu ne kontroles variantā, ne variantā ar mikorizas sēnēm (MN). Šajos variantos šķirnei 'Fuego' arī pirms ražās novākšanas nebija ievērojamas baktēriju skaita izmaiņas. Lielākas izmaiņas abām šķirnēm bija dubultinokulācijas (RM) variantos

Vairāki autori konstatējuši mikorizas palīgbaktērijas (*Mycorrhizae helper bacteria*-MHB), kuras veicina mikorizas sēņu sporu dīgšanu (Johansson, Paul, Finlay, 2003) un asistē mikorizas sēņu funkcionēšanas procesā (Willis, Rodrigues, Harris, 2013). Konstatētas, ka rizosfēras baktēriju pozitīvā ietekme var izpausties arī auga sakņu caurlaidības palielināšanā (Artursson, Finlay, Jansson, 2006), kā arī, stimulējot saimniekauga augšanu, uzlabo mikosimbionta vidi. Mikorizas sēnes tieši vai ar saimniekauga starpniecību var izmainīt rizosfēras mikroorganismu aktivitāti, ietekmējot sakņu eksudātu veidošanos (Gianfreda, 2015; Artursson Finlay, Jansson, 2006).

Abām šķirnēm baktēriju skaits pupu sakņu zonā, pirms ražas novākšanas bija mazāks nekā ziedēšanas laikā, bet mikroskopisko sēņu skaits palielinājās. Līdzīgi, kā 2016. gadā (3.22. att.) arī 2017. gadā (3.23. att.) mikroorganismu daudzuma un aktivitātes izmaiņas izteiktākas bija šķirnei 'Fuego'. Par inokulācijā lietoto mikroorganismu ietekmi uz mikrobioloģisko procesu aktivitāti auga rizosfērā liecina arī vidēja korelācija starp baktēriju skaita izmaiņām rizosfērā un pupu sakņu mikorizācijas intensitāti. ($r=0.48$).

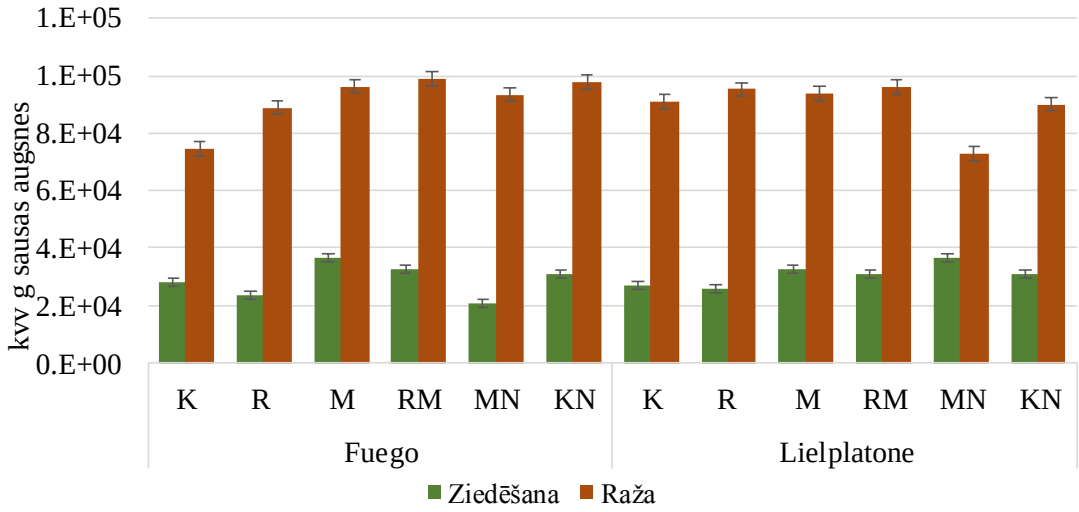


3.23. att. **Mikroorganismu biomasa un augsnes elpošanas intensitāte LI2017 izmēģinājumā pirms ražas novākšanas**

Pēc literatūras datiem (Wamberg, Christensen, Jakobsen et al., 2003) sakņu kolonizācija ar AM mazināja rizosfēras mikroorganismu aktivitāti 30 – 40 dienas. Elpošanas intensitāte augsnē bija lielāka variantos bez AM, jo mikrosimbionti asimilē auga saistītos ogļhidrātus, līdz ar to izmainās sakņu eksudātu daudzums. Savukārt augsnē bez mikorizētiem augiem, brīvi dzīvojošajiem augsnes mikroorganismiem metabolisma procesi saistīti ar lielu CO_2 izdalīšanos, kad mikorizas sēnes var izmantot augu cukurus tieši anabolisma reakcijās bez papildu katabolisma reakcijām un CO_2 ražošana.

Literatūras dati apstiprina rizosfēras mikroorganismu mijiedarbības ietekmi uz simbiozes veidošanos. Bianciotto ar līdzautoriem (Bianciotto, Minerd, Perotto et al., 1996) novērojuši, ka dažas *Rhizobium*, un *Pseudomonas* sugas piestiprinās pie dīgstošajām mikorizas sēņu sporām vai hifām, un saistīšanās pakāpe bija atkarīga no baktēriju celma. Citā izmēģinājumā (Toro, 1998), veicot $^{15}N/^{14}N$ attiecības salīdzināšanu auga dzinumos, konstatēts, ka N_2 saistīšanas intensitāte ar *Rh. meliloti* inokulētai lucernai bija augstāka mikorizētiem augiem, salīdzinot ar nemikorizētiem.

Augsnes kvalitātes uzturēšanā nozīmīga loma ir augu maiņai vai pilnvērtīgai rotācijai, mijot augus, kurus audzējot uzkrājas organiskā viela, minerālelementi, un palielinās mikroorganismu daudzveidība ar augiem, kuri veido lielāku barības vielu iznesi. Barībasvielu uzkrāšanā un mikroorganismu daudzveidības palielināšanā nozīmīgi ir arī pākšaugi, kuri veido simbiozi gan gumiņbaktērijām, gan mikorizai. Pēc šo augu novākšanas augsnē palielinās ne tikai gumiņbaktēriju skaits, bet arī mikorizas sēņu sporas, kas labvēlīgi var ietekmēt pēcaugu. Salīdzinot gumiņbaktēriju daudzumu augsnē ziedēšanas fāzē un veģetācijas perioda beigās, abām šķirnēm konstatētas atšķirīgas izmaiņas variantos ar inokulāciju (3.24.att.). Šķirnei ‘Fuego’, visos variantos ar inokulātiem, gumiņbaktēriju skats palielinājās vairāk nekā kontrolē. Šķirnei ‘Lielplatone’ starp variantiem ar dažādiem inokulātiem, gumiņbaktēriju skaita izmaiņas veģetācijas periodā bija līdzīgas. Mazākais gumiņbaktēriju skaits bija variantā ar mikorizas sēnēm un papildus slāpekļa mēslojumu. Nelielā gumiņbaktēriju skaita atšķirība starp kontroli un inokulētajiem variantiem varēja veidoties auga ietekmes rezultātā. Jūnijā un jūlijā novērtējot pupu vitalitātes indeksu un fotosistēmas darbību (1. piel.), labvēlīgāki apstākļi bija šķirnei ‘Fuego’, bet ‘Lielplatonei’ rādītāji bija zemāki. Tas varēja izraisīt nepietiekamu gumiņbaktēriju nodrošinājumu ar fotosintēzes produktiem un zemāku baktēriju aktivitāti.



3.24.att. **Gumiņbaktēriju skaita izmaiņas izmēģinājuma LI2017 augsnē**
ziedēšana – pupas ziedēšanas fāzē
raža – pupas gatavības fāzē

Tomēr, ja augu maiņā iekļauj augus, kuri neveido mikorizu (piemēra, Brassicacea), tad lietderīgi lietot atkārtotu inokulāciju (Gosling, Hodge, Goodlass et al., 2006). Mikorizas sēņu propogulu saglabāšanos augsnē apstiprināja arī veģetācijas trauku izmēģinājumi, kuros pupas atkārtoti bija sētas pēc gada. Analizējot šķirņu 'Lielplatone' un 'Bartek' sakņu mikorizācijas pakāpi novērots, ka augsnē, kur iepriekš audzēti, inokulētie augi, mikorizas sastopamība kontroles variantu pārsniedz par 5.5 līdz 34.33%.

3.3. Simbiotisko asociāciju izveidošanās ietekme uz pupu (*Vicia faba* L.) augšanu un ražu

Pupu audzēšanas izdevīgums un piemērotība konkrētajai vietai ir atkarīga no virknes abiotisko un biotisko faktoru. Viens no būtiskākajiem faktoriem ir simbiotisko attiecību veidošanās ar augsnes mikroorganismiem. Inokulācijai ar piemērotiem gumiņbaktēriju celmiem, kā arī mikorizas sēnēm vajadzētu paaugstināt gan pupu produktivitāti, gan labvēlīgi ietekmēt pēcaugus. Lai novērtētu inokulumu kombināciju ietekmi uz pupu augšanu un ražas veidošanos, iekārtoti veģetācijas trauku, lauka izmēģinājumi un modeļizmēģinājumi. Veģetācijas perioda ziedēšanas fāzē novērtēti augu veģetatīvie parametri un fizioloģisko procesu norise. Modeļizmēģinājumos skaidrota temperatūras ietekme uz simbiotiskās sistēmas veidošanos. Veģetācijas perioda beigās novērtēta raža un tās kvalitāte.

3.3.1. Simbiotisko asociāciju ietekme uz pupu veģetatīvajiem parametriem ziedēšanas fāzē

Atkarībā no audzēšanas gada, paraugu vākšanas laikā, augi bija sasnieguši 63. līdz 72 attīstības stadiju. Tā kā pupām ziedi plaukst pakāpeniski, tad atsevišķos izmēģinājumos bija varianti, kuros pirmo ziedu vietā bija jau izveidojušies pākstu aizmetņi. Veģetācijas trauku izmēģinājumos nebija statistiski būtiska atšķirība starp inokulācijas variantiem, bet lauka izmēģinājumos atsevišķos gadījumos tā konstatēta. Pupām ziedēšanas fāzē analizēti augu veģetatīvie parametri un salīdzināts hlorofila daudzums, sausnas un proteīna saturs lakstos.

Šķirnei 'Bartek' izmēģinājumā VT2014, variantos ar dažādiem gumiņbaktēriju celmiem, konstatēts atšķirīgs lakstos uzkrātās sausnes un proteīna saturs. Trīs gadu veģetācijas trauku

izmēģinājumos, inokulējot pupu sēklas ar diviem gumiņbaktēriju celmiem atsevišķi vai kopā ar mikorizas sēnēm iegūti neviennozīmīgi ietekmes rezultāti. Ar celmu RP023 bija zemākais hlorofila saturs lapās, kā arī sausnes un proteīna saturs. Augiem, kuri bija inokulēti ar gumiņbaktēriju celmu RV407, pigmentu saturs arī bija zemāks nekā kontrolei, bet augstāks nekā ar celmu RP023, bet dubultinokulācijas variantā ar RV407 sausnas saturs pārsniedz kontroles variantu. Dubultinokulācija ar mikorizas sēnēm proteīna saturs bija zemāks salīdzinot ar atsevišķi inokulēto variantu. Augstākais proteīna saturs lakstos bija variantā, kuru inokulēja tikai ar mikorizas sēnēm. Turpretī 2016. gadā gumiņbaktēriju celms RP023 uzrādīja labākus rezultātus, salīdzinot ar gumiņbaktēriju celmu RV407, vērtējot augu veģetatīvos parametrus. Sausnas daudzums lakstos mazāks bija augiem, kuri inokulēti ar RV407. Šķirnei 'Karmazyn' rezultāti bija līdzīgi, tomēr varēja novērot atšķirīgu reakciju uz dubultinokuāciju. Kaut arī starpība nebija statistiski būtiska, izpaudās tendence, ka virszemes masa, lapu skaits, proteīna saturs dzinumos ir augstāks variantos ar gumiņbaktēriju RP407 un mikorizas sēņu dubultinokulāciju.

Salīdzinot divu rupjsēklu pupu šķirnes 'Bartek' un 'Karmazyn' trīs gadu veģetācijas trauku izmēģinājumos, konstatēts ka inokulācijā lietotajam baktērijas celmam un apstrādei ar mikorizas sēnēm, nav statistiski būtiskas ietekmes uz sausnas uzkrāšanos auga virszemes daļās. Sausnas saturs svārstījās robežās no 104.2 līdz 110.5 mg g^{-1} ($p=0.99$, $RS_{0.05}=44.82$ gumiņbaktēriju celma ietekmei un $RS_{0.05} = 36.60$ mikorizai).

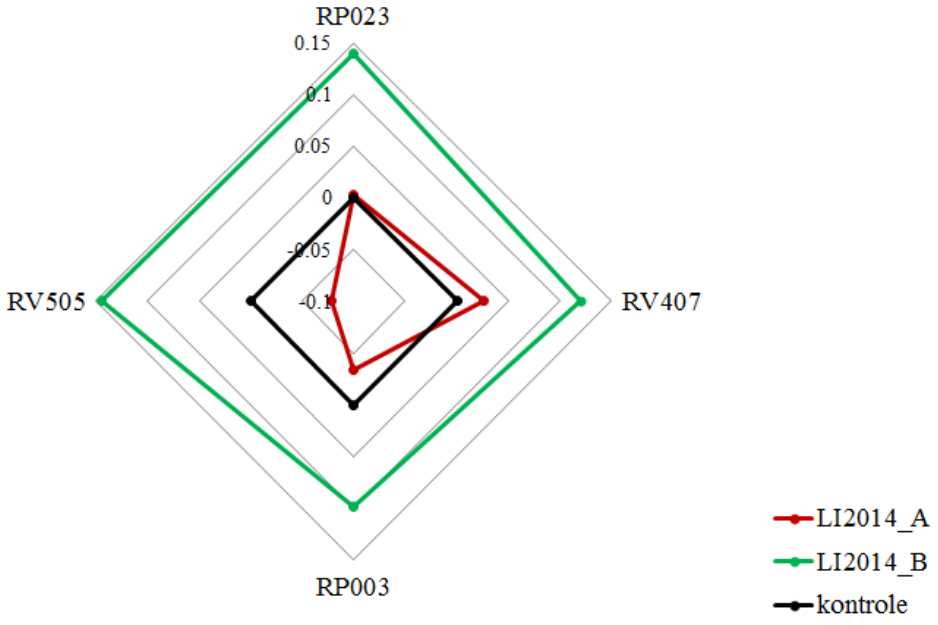
Būtiska ietekme inokulācijai ar gumiņbaktērijām bija uz augu masu ziedēšanas laikā. Vidēji viena auga masa svārstījās no 15.21 līdz 26.9 g. Lielākā masa bija kontroles variantā un augiem, kuri inokulēti tikai ar mikorizas sēnēm, bet atšķirība no kontroles nebija statistiski būtiska ($p=0.47$, $RS_{0.05}=3.39$). Ar gumiņbaktērijām inokulētie augi bija būtiski vieglāki nekā kontroles variantā ($p=0.0001$, $RS_{0.05}=4.15$). Abu gumiņbaktēriju celmu – RP023 un RV407 – ietekme nebija vienāda. Augi ar mazāko masu bija inokulēti ar baktēriju celmu RV407. Vidēji šo augu masa bija par 29%, bet dubultinokulācijas variantā par 34% mazāka. Datu matemātiskā apstrāde parāda, ka inokulāciju ar gumiņbaktērijām 61.8% gadījumu skaidro augu masas izmaiņas, bet inokulācija ar mikorizas sēnēm tikai 1.1%.

Atsevišķos gados novērotas nebūtiskas svārstības un atšķirības starp gumiņbaktēriju celmiem. 2015. gadā inokulējot sēklas tikai ar mikorizas sēnēm šķirnei 'Karmazyn' veidojas smagāki dzinumi un augstāks sausnes daudzums salīdzinot ar 'Bartek'. Lerats ar kolēģiem (Lerat, Piche, Lapointe et al., 2003) konstatējuši, ka dažādas mikorizas sēņu sugas, atšķirīgi ietekmē augu augšanu. Mikorizas sēnes, kuras patērē lielāku apjomu auga fotosintēzes produktu, var aizkavēt augu augšanu. Fotosintēzes produktu novirzīšanu mikroorganismu vajadzībām, var būt cēlonis tam, ka dubultinokulācijas variantos augiem ir mazāka masa.

Gumiņbaktēriju celmu atšķirīga mijiedarbība ar pupām konstatēta, salīdzinot veģetatīvos parametrus šķirnēm 'Bartek'un 'Karmazyn'. Izmēģinājumos LI2014_A un LI2014_B salīdzināta četru gumiņbaktēriju celmu ietekme uz pupu augšanu divās atšķirīgās augsnēs. Gumiņbaktēriju un pākšaugu simbiozes izveidošanās un efektivitātes atkarību no augsnes īpašībām norāda virkne autoru (Klāsens, 1967; Ishac, Angle, Ei-Borollosy et al., 1994; Hafeez, Naeem, Shaheen et al., 2007). Izmēģinājums LI2014_A iekārtots trūdaini glejotā augsnē ar augstāku barības vielu daudzumu, salīdzinot ar velēnu podzolaugsni izmēģinājumā LI2014_B (2.3. tabula). Atšķirīgās augsnes raksturojas ne tikai ar dažādu pieejamo barības vielu sastāvu, bet arī ar mikrobiotas kvalitatīvo un kvantitatīvo sastāvu. Augsnes dabīgā mikrobiota var izmainīt inokulācijā lietoto gumiņbaktēriju aktivitāti. Gumiņbaktēriju aktivitāte nosaka to ietekmi uz augu augšanu. Dažādu gumiņbaktēriju celmu ietekme uz auga fizioloģiskajiem procesiem bija šķirnes specifiska. Šķirnei 'Bartek' izmēģinājumā LI2014_B inokulētajiem augiem konstatēta nebūtiska pigmentu satura samazināšanās, salīdzinot ar kontroli, bet šķirnei 'Karmazyn' gumiņbaktēriju celmi RP023 un RV505 pigmentu saturu paaugstināja. Kontroles augiem hlorofila saturs vidēji bija 33.7 vienības, bet ar RP023 un RV505 attiecīgi 36.6 un 36.5 vienības. Šķirnei 'Karmazyn' ar

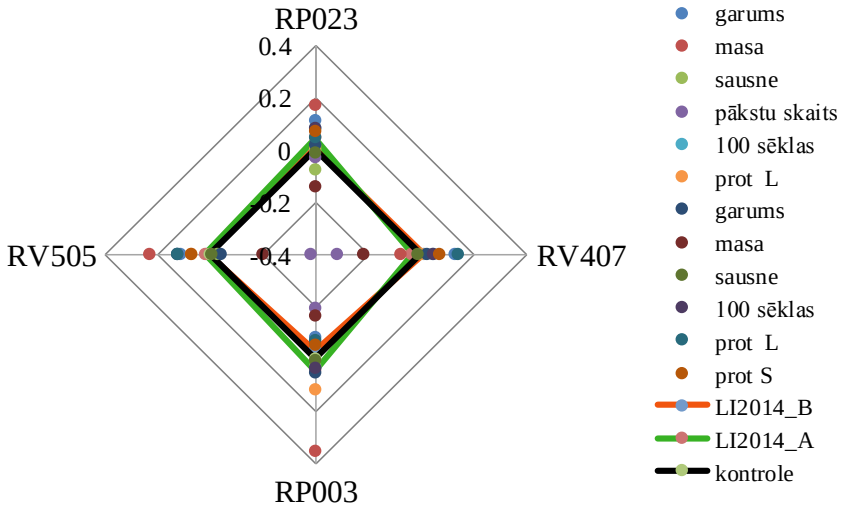
gumiņbaktēriju celmu RP023 izveidojās lielāki gumiņi nekā kontroles augiem, tāpēc var secināt, ka bija izveidojusies efektīvāka simbioze.

Veģetatīvo parametru attiecība inokulētajos variantos pret kontroli abās izmēģinājuma vietās šķirnei 'Bartek' apkopoti 3.25.attēlā.



3.25. att. **Veģetatīvo parametru vidējā attiecība inokulētajos variantos pret kontroles variantu izmēģinājumos LI2014_A un LI2014_B šķirnei 'Bartek'.**

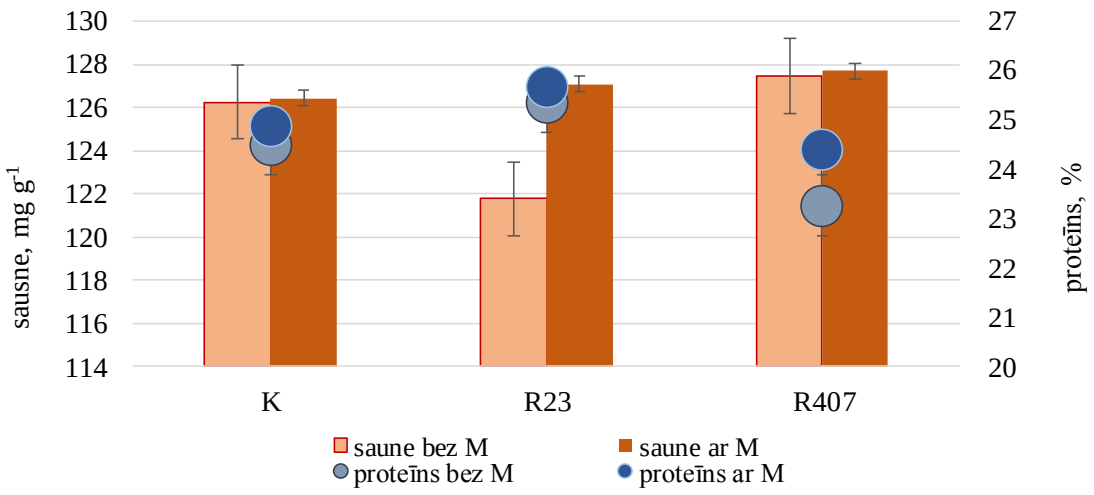
Salīdzinot gumiņbaktēriju ietekmi uz augu parametriem, konstatēta būtiska šķirnes ietekme, kas atšķiras dažādās audzēšanas vietās. Augsnē ar zemāku barības vielu saturu bija būtiskāka gumiņbaktēriju ietekme. Izmēģinājumā LI2014_A tikai atsevišķi parametri pārsniedza kontroles variantu. Summāri, vienīgi ar gumiņbaktēriju celmu RV407 bija iegūts labāks rezultāts nekā kontrolei (3.25.att.).



3.26.att. **Veģetatīvo parametru attiecība inokulētajos variantos pret kontroles variantu izmēģinājumos LI2014_A un LI2014_B šķirnei 'Karmazyn'**

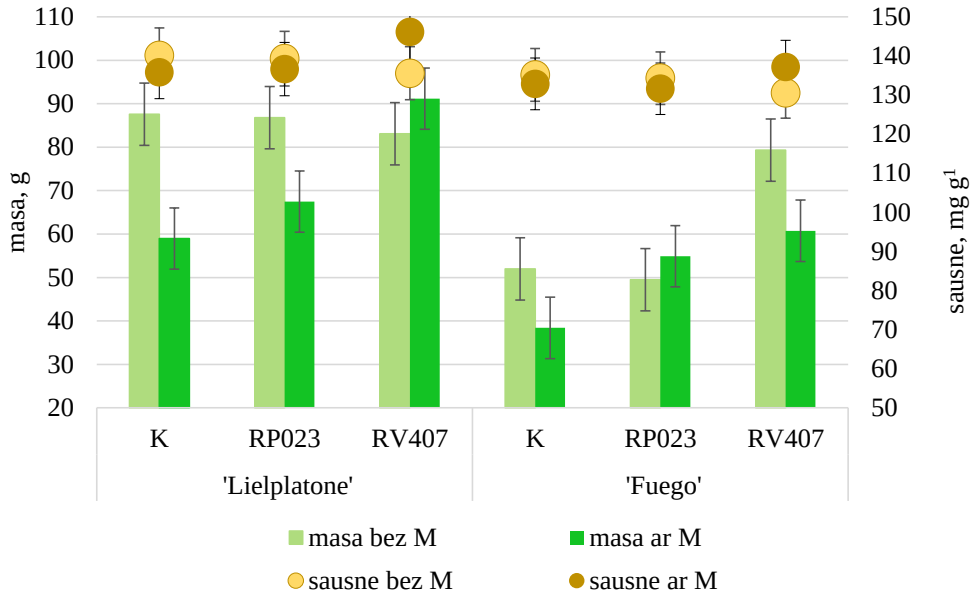
Atšķirīgs rezultāts iegūts šķirnei ‘Karmazyn’ (3.26.att.). Apkopojot inokulācijas efekta koeficientus, var konstatēt, ka inokulācija ar gumiņbaktērijām nav būtiski uzlabojusi augu augšanu nevienā no izmēģinājumu vietām. Nedaudz labāks rezultāts bija izmēģinājumā LI2014_A ar baktēriju celmiem RP023 un RP505.

Izmēģinājumā **LI2014_C** starp inokuluma variantiem attīstības stadijas būtiski neatšķīrās. Lielākā atšķirība starp augiem, kuri inokulēti tikai ar gumiņbaktērijām un dubultinokulācijas variantiem bija ar baktēriju celmu RP023. Pupu lakstos proteīna saturs bija augstāks variantos ar mikorizas sēnēm, bet būtiska atšķirība tikai ar baktēriju celmu RV407 ($p<0.05$) (3.27 att.). Ar baktērijām RV407 inokulēto augu lakstos proteīns bija mazāk salīdzinot gan ar baktēriju RP023 variantu, gan kontroli, tomēr tieši šajā variantā bija lielākā mikorizas sēņu ietekme.



3.27.att. **Sausnes un proteīna saturs lakstos pupām ‘Bartek’ ziedēšanas laikā LI2014 izmēģinājumā**
(M – inokulēti ar mikorizas sēnēm)

2015. gadā lauka izmēģinājumos (LI2015_A) audzētas divas sīksēklu pupu šķirnes ‘Lielplatone’, ‘Fuego’ un divas rupjsēklu pupu šķirnes ‘Bartek’, ‘Karmazyn’. Pupas iesētas 30. aprīlī. Veģetatīvo parametru analizēšanai augi vākti no 30. jūnija līdz 6. jūlijam (61 līdz 67 dienas pēc sējas). Šajā laikā sīksēklu pupas bija sasniegušas 70.–74. attīstības stadiju, ‘bet rupjsēklu šķirnes 60.–65.attīstības stadiju.



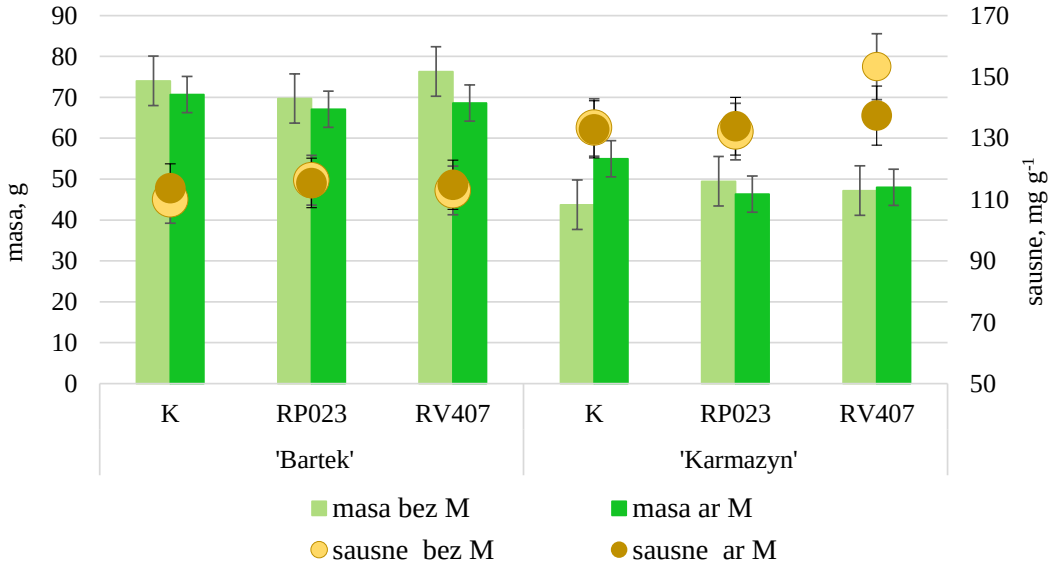
3.28.att. **Pupu lakstu masa un sausne dažādi inokulētos variantos šķirnēm 'Lielplatone' un 'Fuego' izmēģinājumā LI2015_A**

(Mikorizas ietekme 'Lielplatone' $RS_{0.05}$ =18.27, 'Fuego' $RS_{0.05}$ =19.14)

Šķirnei 'Lielplatone' augu masa starp variantiem, kuri inokulēti tikai ar gumiņbaktērijām būtiski neatšķīrās, bet to varēja konstatēt dubultinokulācijas variantā ar baktēriju celmu RP023 (3.28.att.).

Augu masa dubultinokulācijas variantā bija mazāka. Inokulācija ar mikorizas sēnēm bez gumiņbaktērijām arī samazināja augu masu. Līdzīgs rezultāts bija ar šķirni 'Fuego', bet šajā gadījumā augu masa būtiski zemāka bija dubultinokulācijas variantam ar baktēriju celmu RV407.

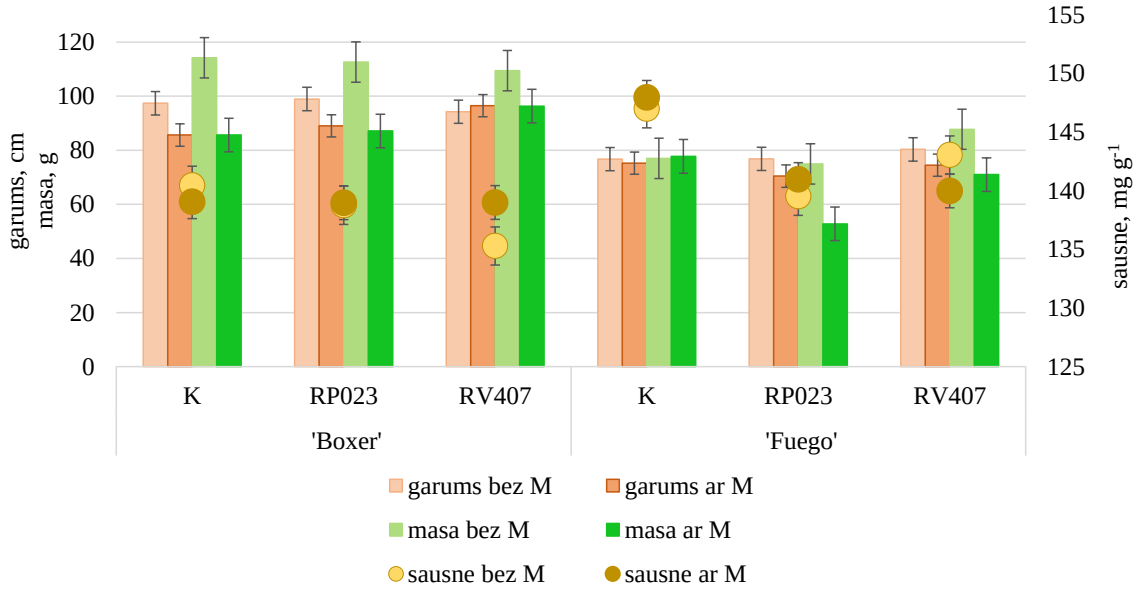
Uzkrātās sausnes daudzums pupu lakstos starp variantiem būtiski neatšķīrās ($p>0.05$), bet novērojama tendence, ka dubultinokulācija ar gumiņbaktēriju celmu RV407 un mikorizas sēnēm ir paaugstinājusi proteīna saturu (3.28.att.) abām šķirnēm. Rupjsēklu pupām atšķirība starp variantiem ar mikorizu un bez bija mazāk izteikta (3.29.att.).



3.29.att. **Pupu lakstu masa un sausna dažādi inokulētos variantos šķirnēm 'Bartek' un 'Karmazyn' LI2015_A izmēģinājumā**

(Mikorizas ietekme 'Bartek' $RS_{0.05}$ =13.55, 'Karmazyn' $RS_{0.05}$ =4.09)

2015. gadā izmēģinājumā LI2015_B audzētas divas sīksēklu šķirnes ‘Boxer’ un ‘Fuego’. Pupu sēklas pirms sējas inokulētas ar gumiņbaktērijām RV407un mikorizas sēnēm atsevišķi, kā arī veikta dubultinokulācija ar gumiņbaktērijām un mikorizas sēnēm. Veģetatīvo parametru analizēšanas laikā pupas bija sasniegušas 70. līdz 76. attīstības stadiju. Inokuluma variants būtiski neietekmēja augu attīstību. Salīdzinot augu veģetatīvos parametrus konstatēts, ka inokulēšanai ar mikorizas sēnēm statistiski būtiska ietekme bija tikai uz atsevišķiem parametriem (3.30. att.). Inokulējot atsevišķi ar gumiņbaktērijām, būtiskas garuma un masas atšķirības nebija konstatētas. Lielākā ietekme bija inokulējot tikai ar mikorizas sēnē, un dubultinokulācijas variantos. Šķirnei ‘Fuego’ augi bija būtiski īsāki (p=0.03) abos dubultinokulācijas variantos, salīdzinot ar kontroli. Šķirnei ‘Boxer’ īsāki augi bija inokulējot atsevišķi ar mikorizas sēnēm un dubultinokulācijas variantā ar RP023. Šajos variantos bija būtiski mazāka augu masa (p=0.04). Uz sausnas uzkrāšanos lakstos būtiska ietekme bija lietotajam gumiņbaktēriju celmam. Šķirnei ‘Boxer’ variantos, kuros sēklas bija inokulētas ar mikorizas sēnēm, nebija būtiska atšķirība sausnas saturā, bet inokulējot tikai ar gumiņbaktērijām RV407, sausnes saturs būtiski samazinājās (p<0.05).



3.30. att. **Vidējā lakstu masa, garums un sausne dažādi inokulētos variantos šķirnēm ‘Boxer’ un ‘Fuego’ izmēģinājumā LI2015_B**

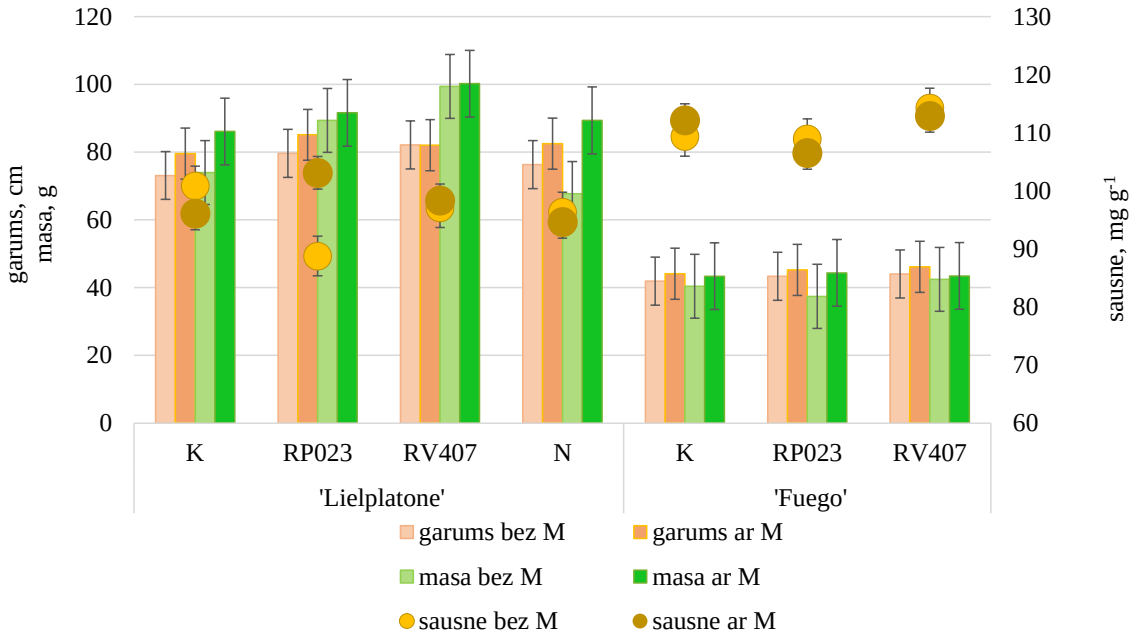
(Mikorizas (M) ietekme: garums $RS_{0.05}$ =4.24, masa $RS_{0.05}$ =12.61)

2016. gadā lauka izmēģinājumos (LI2016_A) pupas iesētas 2. maijā un augu augšanas parametri analizēti 56 dienas pēc sējas (27.06.). Šķirnei ‘Fuego’ augi bija sasnieguši 50 līdz 59, bet ‘Lielplatone’ 65 līdz 68 attīstības stadiju atbilstoši BBCH iedalījumam. Šķirnei ‘Fuego’ ar gumiņbaktērijām inokulētie varianti būtiski atpalika attīstībā (p=0.003), bet šķirnei ‘Lielplatone’ būtiska ietekme bija sēklu inokulēšanai ar mikorizas sēnēm (p=0.007). Ar mikorizas sēnēm inokulētie augi bija sasnieguši 66 līdz 68, bet neinokulētie 63 līdz 66 attīstības stadiju. Lielākā atšķirība bija dubultinokulācijas variantā ar gumiņbaktēriju celmu RP023. Šajā variantā vidēji augu attīstība atšķīrās par trīs stadijām.

Veģetatīvo parametru mērījumu rezultāti šķirnei ‘Lielplatone’ un ‘Fuego’ apkopoti 3.31.att. Šķirnei ‘Lielplatone’ vidējā augu masa kontroles variantos būtiski atšķīrās no augiem, kuri inokulēti ar gumiņbaktērijām (p=0.003, $RS_{0.05}$ = 12.84). Starp variantiem ar vienu mikrosimbiontu un dubultinokulāciju nebija būtiska atšķirība. Sausnas saturs augos būtiski neatšķīrās starp inokulācijas variantiem, izņemot inokulētajiem ar RP023 sausnas saturs bija mazāks nekā kontrolei ($RS_{0.05}$ = 0.62), bet konstatēta pozitīva dubultinokulācijas

ietekme, jo šajā variantā sausnas daudzums pārsniedz kontroli un inokulācijas variantu ar tikai ar gumiņbaktērijām ($RS_{0.05}$ = 0.43).

Šķirnei 'Fuego' augu garumu būtiski ietekmēja inokulācija ar mikorizas sēnēm. Inokulējot atsevišķi ar gumiņbaktērijām tikai celms RV407 būtiski ietekmēja augu garumu ($RS_{0.05}$ = 1.88). Ar gumiņbaktēriju celmu RP023 inokulēto augu garums neatšķīrās no kontroles. Visos variantos, kurus inokulēja ar mikorizas sēnēm atsevišķi vai kopā ar gumiņbaktērijām augu, garums būtiski pārsniedza kontroles variantu (p=0.009, $RS_{0.05}$ = 1.54). Attiecīgi šajos variantos augiem bija vairāk lapu (p=0.002, $RS_{0.05}$ = 0.43). Augiem ar labāk izveidotu lapojumu veidojas labāki apstākļi fotosintēzes procesa norisei. Optimālu fotosintēzes apstākļu veidošanās labvēlīgi ietekmē gan simbiotiskajā asociācijā iesaistītos mikroorganismus, gan nodrošina auga ražas veidošanos.



3.31.att. **Veģetatīvie parametri šķirnēm 'Lielplatone' un 'Fuego' izmēģinājumā LI2016_A**

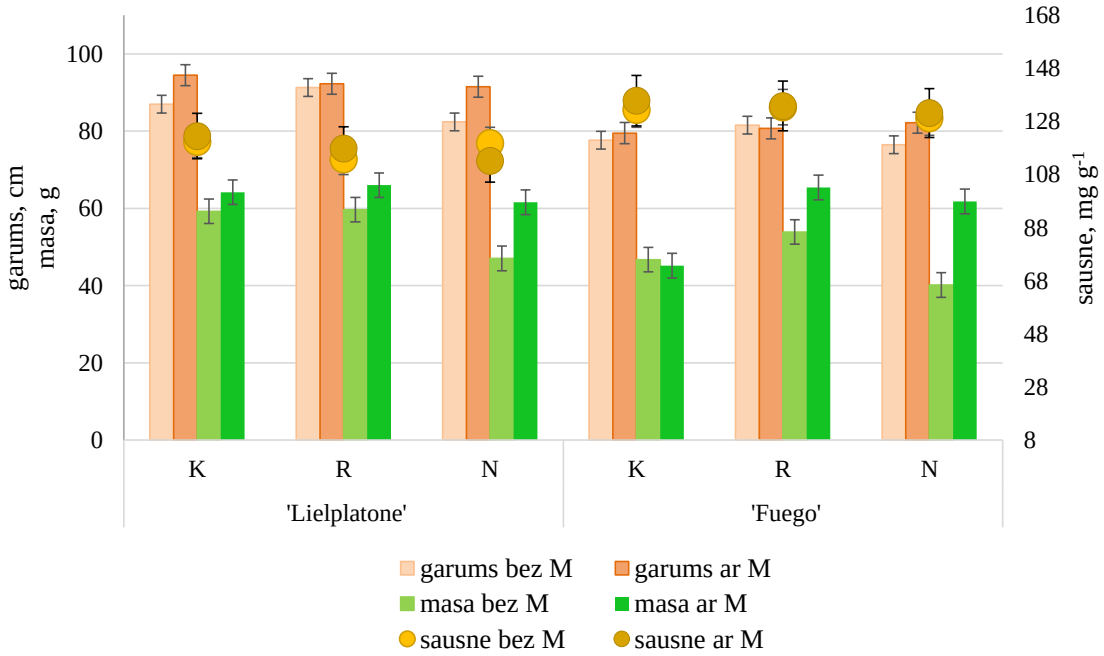
K – varianti bez gumiņbaktēriju inokulācijas, M – inokulēti ar mikorizas sēnēm,
N – bez gumiņbaktēriju inokulācijas, bet papildus slāpekļa minerālmēslojumu

Savukārt izmēģinājumā LI2017 pupu veģetatīvie parametri analizēti 62 dienas pēc sējas (26.06.). Šajā laikā nebija būtiska atšķirība augu attīstībā starp variantiem, bet bija starp šķirnēm (p<0.0002). Šķirne 'Lielplatone' augi bija sasnieguši 62. līdz 67. attīstības stadiju, bet šķirnei 'Fuego' 62. līdz 74. attīstības stadiju. Šķirnei 'Fuego' tālāku attīstības stadiju bija sasnieguši ar gumiņbaktērijām inokulētie augi gan kopā ar mikorizas sēnēm, gan bez tām. Veģetatīvo parametru mērījumu rezultāti šķirnēm 'Lielplatone' un 'Fuego' apkopoti 3.32.attēlā. Sēklu inokulācija ar mikorizas sēnēm būtiski ietekmējusi augu augšanu (p= 0.0002; $RS_{0.05}$ = 3.02) variantos, kuros sēklas nebija inokulētas ar gumiņbaktērijām. Arī augu masa lielāka bija variantos ar mikorizas sēnēm, bet būtiska atšķirība (p=0.036; $RS_{0.05}$ = 8.05) bija tikai variantā ar papildus slāpekļa mēslojumu. Tomēr sausnas saturs variantā ar mikorizas sēnēm un papildus slāpekļa mēslojumu bija būtiski zemāks.

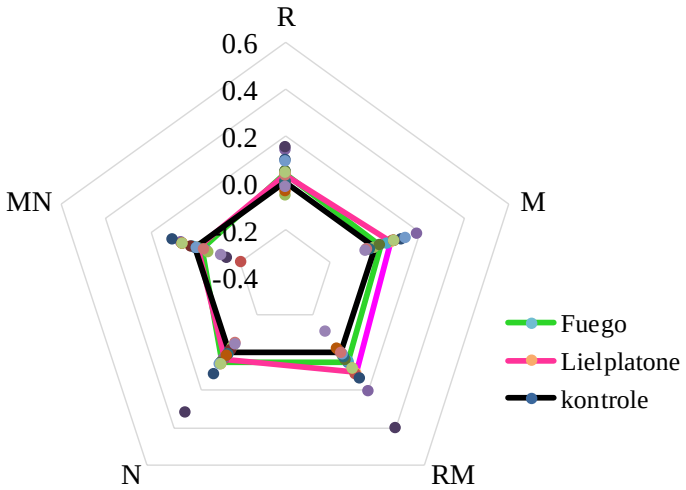
Šķirnei 'Fuego' augu garums lielāks bija tikai variantā ar mikorizas sēnēm un papildu slāpekli, bet atšķirība nebija statistiski būtiska (3.32.att.). Būtiski lielāka augu masa (p=0.0063; $RS_{0.05}$ =7.46) bija variantā kur sēklas inokulētas mikorizas sēnēm un gumiņbaktērijām, kā arī mikorizas sēnēm un papildus slāpekļa mēslojumu.

Veģetatīvo parametru novērtējums ballēs pret kontroli izmēģinājumā LI2017 (3.33.att.) šķirnēm 'Lielplatone' un 'Fuego' parāda pozitīvu ietekmi mikorizas (M) un dubultinokulācijas (RM) variantiem. Mikorizas variants ar papildus slāpekļa mēslojumu

neuzrādīja labāku rezultātu kā dubultinokulācijas variants. Šādi rezultāti liecina, ka abi mikrosimbionti ne tikai spēj kompensēt viens otra nepieciešamību pēc barības vielām, bet pastāv vēl arī cita mijiedarbība.



3.32.att. **Veģetatīvie parametri šķirnēm 'Lielplatone' un 'Fuego' izmēģinājumā LI2017**
K – varianti bez gumiņbaktēriju inokulācijas, R – varianti ar gumiņbaktēriju inokulāciju, N – bez gumiņbaktēriju inokulācijas, bet papildus slāpekļa minerālmēslojumu, M – inokulēti ar mikorizas sēnēm



3.33.att. **Veģetatīvo parametru novērtējums ballēs pret kontroli izmēģinājumā LI2017**

Inokulējot sēklas ar atsevišķiem gumiņbaktēriju celmiem, neviens neuzrādīja būtiski labākus rezultātus visos izmēģinājumos. Tāpēc lietderīgi izmantot gumiņbaktēriju celmu asociācijas. Dubultinokulācijas gadījumā gumiņbaktēriju asiciācijas lietošana var mazināt nepiemērotas kombinācijas negatīvo efektu. Kā novērots izmēģinājumos gumiņbaktēriju celmi RP023 un RV407 dažādām pupu šķirnēm var uzrādīt atšķirīgu efektu.

Auga un mikroorganismu mijiedarbība var auga augšanu un fizioloģiskos procesus uzlabot, bet var radīt arī stresa situāciju. Fotosintēzes procesa parametru izmaiņas ir jutīgs indikators, reaģējot uz stresa situāciju. Būtiskākās izmaiņas uzrādīja augu vitalitātes indekss (PI), kas šķirnei 'Lielplatone' samazinājās, bet šķirnei 'Fuego' palielinājās (1. piel.) Vitalitātes indeksa samazināšanās raksturo augam nelabvēlīgu apstākļu periodu. Fotosintēzes procesa reakcijas centru darbības efektivitāti raksturo mainīgās fluorescences un maksimālās fluorescences attiecība (F_v/F_m), kas ir atkarīga no otrās fotosistēmas kvantu efektivitātes. Šķirnei 'Fuego' zem optimālās attiecības (0.79 – 0.84) attiecība bija tikai jūnijā. Zemākā vērtība bija kontrolei (0.67) un ar mikorizas sēnēm inokulētajiem augiem (0.69). Šķirnei 'Lielplatone' visos variantos F_v/F_m attiecība bija zemāka par optimālo un svārstījās robežās no 0.70 – līdz 0.75. Starp mērījumu reizēm attiecības vērtība nedaudz palielinājās tikai variantam ar papildus slāpekļa mēslojumu. 'Lielplatonei' samazinājās arī fotosintēzes aktīvo centru fotoķīmiskās aktivitātes (F_v/F_0).

Hlorofila fluorescences mērījumu rezultāti saskan ar hlorofila satura izmaiņām pupu lapās jūnijā un jūlijā. Šķirnei 'Lielplatone' hlorofila satura izmaiņas nebija būtiskas. Jūlijā nedaudz paaugstinājies bija hlorofila saturs dubultinokulācijas variantā, bet atšķirība nebija būtiska. Līdzīgas svārstības bija arī hlorofila fluorescences parametros. Šķirnei 'Fuego' jūlijā būtiski ($p< 0.001$) palielinājās hlorofila saturs pupu lapās, salīdzinot ar jūniju. Līdzīgas izmaiņas bija arī fluorescences parametros. Pigmentu satura un fotosintēzes reakcijas centru stāvokļa svārstības var liecināt, ka abām šķirnēm nav bijuši vienlīdzīgi augšanas apstākļi.

Atšķirīgs inokulācijas efekts uz hlorofila saturu lapās konstatēts arī 2016. gadā. Šķirnēm 'Isabell' un 'Laura' ar gumiņbaktērijām RV407 inokulētajiem augiem bija ne tikai augstāka dehidrogenāžu aktivitāte gumiņos, bet arī augstāks hlorofila saturs pupu lapās, attiecīgi par 3.29% un 3.98%. Šķirnei 'Vertigo' hlorofila daudzums inokulētajiem augem bija par 6.12% augstāks, kaut arī dehidrogenāžu aktivitāte gumiņos bija līdzīga kā neinokulētajiem augiem.

Hlorofila saturs un fluorescences parametri, kā arī dažādu pigmentu grupu attiecība lapās ir indikators auga augšanas apstākļu novērtēšanai. Biežāk lieto hlorofilu summu un hlorofila a un b attiecību. Arī atmosfēras molekulārā slāpekļa simbiotiskās saistīšanas efektivitātes raksturošanai pigmentu satura izmaiņas un fotosintēzes sistēmas darbība ir atzīti parametri. Dažkārt lauka un veģetācijas izmēģinājumos iegūtie rezultāti ir pretrunīgi. Piemēram, ar gumiņbaktēriju celmu RP023 atsevišķi un kombinācijā ar mikorizas sēņu preparātu inokulētajiem augiem, VT2014 izmēģinājumā konstatēts zemāks pigmentu saturs (attiecīgi 40.29 un 40.14 vienības), salīdzinot ar augiem lauka izmēģinājumā (LI2014_C), attiecīgi 41.10 un 41.75 vienības.

Pigmentu daudzuma izmaiņas dažādu mikrosimbiontu klātbūtnē bija atšķirīgas. Apkopojot hlorofila datus izmēģinājumā VT2014 nav konstatētas statistiski būtiskas atšķirības starp inokulācijas variantiem ($p>0.05$). Hlorofila daudzums bija robežās no 43.2 vienībām kontroles variantā, lidz 44.73 variantā ar mikorizas sēnēm. Novērojama tendence, ka augiem dubultinokulācijas variantos, pigmentu saturs ir nedaudz augstāks, salīdzinot ar inokulāciju tikai ar gumiņbaktērijām. Līdzīgi rezultāti iegūti arī Arumugama u.c (Arumugam, Rajasekaran; Nagarajan et al., 2010) izmēģinājumos ar vignām (*Vigna unguiculata* L.), kur inokulētajiem augiem (gumiņbaktērijas un mikorizas sēnes) pumpurošanās un ziedēšanas fāzē konstatēts augstāks pigmentu saturs nekā kontroles augiem. Turpretī šķirnei 'Karmazyn' bija augstāks hlorofila saturs ($p=0.001$, $RS_{0.05} = 2.10$) visos variantos ar mikorizas sēnēm un atsevišķi ar RP407 inokulētajam, salīdzinot ar kontroli. Hlorofila daudzums bija robežās no 43.3 vienībām kontrolē, līdz 54.9 vienībām variantā ar mikorizas sēnēm.

Atšķirīgais mikrosimbiontu mijiedarbība ar saimniekaugu saskan ar literatūras datiem. Izmēģinājumā ar pupiņām un vairākām gumiņbaktēriju mikorizas sēņu sugu kombinācijām novērots, ka simbioze ne vienmēr stimulējoši ietekmē auga augšanu (Franzini, Azcón, Mendes et al., 2010). Atšķirīgu, dažādu gumiņbaktēriju celmu, ietekmi uz hlorofila un proteīna saturu pupiņu lapās konstatējuši arī Safikhani ar līdzautoriem (Safikhani, Morad, Reza, 2013).

Pēc 2014. un 2015. gadu izmēģinājumiem noskaidrots, ka atsevišķu gumiņbaktēriju celmu lietošana sēklu inokulācijai negarantē efektīvas simbiozes izveidošanos. Tāpēc inokulācijai izveidotas gumiņbaktēriju celmu asociācijas. Bija izveidotas divas asociācijas, kur R1 (RP023, RP003) apvienoja trīs gumiņbaktēriju celmus, izdalītus no gumiņiem, kuri izveidojušies uz zirņu saknēm, bet R2 (RV407, RV505) no gumiņbaktērijām, kuras izdalītas no pupu sakņu gumiņiem. 2016. gadā **iekārtots veģetācijas trauku izmēģinājums (VT2016_B).** Ziedēšanas fāzē, analizējot hlorofila daudzumu lapās, konstatēta būtiska atšķirība (p=0.0001) starp variantiem, kur augi inokulēti ar gumiņbaktēriju asociācijām, mikorizas sēnēm, veikta dubultinokulācija un kontroles variantu. Kontroles augu lapās hlorofila dauzums bija 37.71 vienība, bet variantos ar inokulētajiem augie bija robežās no 41.21 līdz 45.75 vienības ($RS_{0.05}$ = 2.96). Augstākais hlorofila saturs bija augiem, kuri inokulēti tikai ar mikorizas sēnēm (45.75 vienības). Abas izveidotās gumiņbaktēriju asociācijas līdzīgi ietekmēja sausnes uzkrāšanos auga dzinumos. Sausnes saturs nebija būtiski atšķirīgs starp inokulantu variantiem, lai gan abos dubultinokulācijas variantos bija zemāks hlorofila saturs nekā variantos, kur mikrosimbionti lietoti atsevišķi.

2017. gadā izmēģinājumi **VT2017** un **LI2017** iekārtoti ar gumiņbaktēriju asociāciju, kura izveidota no diviem gumiņbaktēriju celmiem – RP023 (izdalīts no zirņu sakņu gumiņa) un RV407 (no pupu sakņu gumiņa). Asociācijaā iekļauti gumiņbaktēriju celmi, kuri jau iepriekš atradās kolekcijā un bija iekļautie iepriekš pārbaudīto asociāciju sastāvā. Veģetatīvie parametri analizēti jūlijā, kad pupas 'Bartek' bija sasniegušas 63.–73. attīstības stadiju. Starp inokulācijas variantiem būtiski atšķīrās augu masa un lapu skaits. Nebija būtisku atšķirību augu garumos un lapu skaitā, bet atšķīrās 10 lapu masa un sausnas saturs lapās (3.2.tab.). Vieglākas lapas un zemāku sausnes saturu bija variantos ar mikorizas sēnēm un dubultinokulācijas variantā. Tomēr augstāks pigmentu saturs bija variantā, kur augi inokulēti ar mikorizas sēnēm.

3.2.tabula

Augu parametri šķirnei 'Bartek' izmēģinājumā VT2017 ar inokulantu variantiem

Inokulācijas variants	10 lapu masa, g	sausne, mg g^{-1}	pigmentu saturs, mg g^{-1}		
			hlorofils a	hlorofils b	karotinoīdi
K	3.4^{a}	145.7^{ab}	1.41^{a}	0.51^{a}	0.41^{a}
R	3.3^{a}	149.8^{a}	1.46^{a}	0.52^{a}	0.42^{a}
M	2.7^{b}	143.2^{b}	1.56^{b}	0.55^{b}	0.46^{b}
RM	3.1^{ab}	143.9^{b}	1.46^{a}	0.52^{a}	0.43^{a}

starp skaitļiem kolonnās, kas apzīmēti ar dažādiem burtiem, ir statistiski pierādāma starpība (Dunkana kritērijs, p=0.05)*

Pigmentu saturs lapās un virszemes daļu masas attiecība pret sakņu masu liecina par labvēlīgiem apstākļiem augu augšanai.

Kā noskaidrojās modeļizmēģinājumos, inokulāta ietekme uz auga sakņu augšanu konstatējama jau dīgšanas laikā un augu agrīnajās augšanas stadijās, tāpēc veģetācijas izmēģinājumos salīdzināta pupu lakstu un sakņu masa. Tomēr nav zināms, vai būtiska ietekme saglabājas visu auga veģetācijas periodu. Šķirnei 'Bartek' starp inokulumu variantiem netika konstatēta būtiska atšķirība nevienā no izmēģinājuma gadiem. Šķirnei 'Karmazyn' lielāka sakņu sistēmas masa bija kontrolei un dubultinokulācijas variantā ar gumiņbaktēriju celmu RP023 izmēģinājumā VT2016_A. Izmēģinājumā VT2017 konstatēts,

ka saknes masa būtiski neatšķīrās ar mikorizu inokulētajiem augiem, tomēr dubultinokulācijas variantos veidojās nedaudz lielāka, nekā augiem bez gumiņbaktērijām. Augu virszemes daļas un saknes masas attiecība kontroles variantā bija 0.86, bet ar mikorizas sēnēm inokulētajiem augiem 1.05. Dubultinokulācijas variantā 0.93, bet inokulējot tikai ar gumiņbaktērijām 0.81.

Par auga fizioloģiskā stāvokļa izmaiņām liecina ne tikai fotosintēzes procesa parametru izmaiņas. Mikroorganismi, jo īpaši mikorizas sēnes, uzskata par būtiskiem faktoriem, kuri var ietekmēt auga nodrošinājumu ar barības vielām un ūdeni. Mainoties videi sakņu zonā, izmainās barības vielu uzņemšana un fotosintēzes intensitāte. Rezultātā var konstatēt atšķirīgu ūdens aiztures spēju ar dažādiem inokuluma variantiem. Novērtējot auga ūdens aiztures spēju pupām, kuras inokulētas ar dažādiem inokuluma variantiem, konstatēta būtiska atšķirība ($p=0.00001$; $RS_{0.05} = 1.85$) starp kontroli un variantiem ar gumiņbaktēriju asociācijām (4. piel. 1.att.). Mazākie ūdens zudumi, tātad labākā ūdens aiztures spēja abām šķirnēm bija variantā, kur augi inokulēti ar mikorizas sēnēm. Lielākie ūdens zudumi bija kontroles variantos šķirnei 'Lielplatone', bet šķirnei 'Fuego' kontroles un variantā ar gumiņbaktērijām. Salīdzinot abas šķirnes, redzams, ka 'Lielplatonei' bija lielāks ūdens zudums, kas liecina, ka augiem nav bijuši optimāli apstākļi, ko apstiprina arī hlorofila fluorescences fotosintēzes sistēmas novērtējums.

Mikroorganismu asociāciju atšķirīgā ietekme uz augu ūdens aizturi bija kobstatēta arī izmēģinājumos ar gumiņbaktēriju asociācijām (VT2016_B). Augiem, kuri inokulēti ar gumiņbaktēriju asociācijām ūdens zudums bija lielāks (4.piel. 2.att.)Izpaudās arī abu asociāciju atšķirīgā mijiedarbība ar augu un mikorizas sēnēm. Ar pirmo asociāciju (R1) inokulētie augi zaudēja mazāk ūdeni nekā ar otro asociāciju (R2) inokulētie. Pievienojot mikorizas sēnes, ietekme izmainījās un mazāki ūdens zudumi bija kombinācijai R2M, salīdzinot ar R1M. Inokulācija ar mikorizas sēnēm nodrošināja augiem optimālākus augšanas apstākļus par to liecināja hlorofila saturs lapās, uzkrātā sausne un ūdens aiztures spēja.

No veģetatīvo parametru novērtējuma var secināt, ka inokulātu ietekme uz augu atšķiras ne tikai dažādos gados, bet konstatējama arī šķirnes ietekme.

Vairākos izmēģinājumos konstatēts, ka pupu lakstu garums ar mikorizas sēnēm inokulētajiem augiem samazinājās par 5-8%, salīdzinot ar kontroles augiem, bet masa, atsevišķos gadījumos, līdz pat 28%. Augu masas samazināšanos var skaidrot ar simbiotisko sistēmu formēšanos, kuras laikā mikrosimbionti paterē fotosintēzes procesā sintezētos organiskos sacienojumus. Izveidojoties simbiotiskajai asociācijai, gumiņbaktērijas saistot atmosfēras molekulāro slāpekli, ar papildu minerālvielām apgādā ne tikai augu, bet arī mikorizas sēnes. Veidojoties plašākai mikorizosfērai, gan augi, gan gumimiņbaktērijas, papildus tiek apgādāti ar fosforu, kas nepieciešams bioķīmiskajos procesos. Efektīvas simbiozes rezultātā augi ar fotosintēzes procesu var nodrošināt savas vajadzības un mikrosimbiontu prasības.

3.3.2. Simbiotisko asociāciju ietekmes novērtējums uz pupu ražu un tās kvalitāti

Ziedēšanas fāzē pupām bija konstatēta atšķirīga mikrosimbiontu ietekme uz veģetatīvajiem parametriemģetācijas trauku, tā arī lauka izmēģinājumos. Ražu veidojošo parametru (stublāju, pākstu skaits) novērtēšanai augi ievākti pirms ražas novākšanas. Pupām noteikts proteīna saturs.

Vērtējot pupu 'Bartek' veģetatīvos parametrus bija konstatēta atšķirīga inokulācijā lietoto baktēriju celmu ietekme. Zemākais proteīna saturs lakstos bija ar gumiņbaktēriju celmu RP023. Atšķirīga inokulātu ietekme izpaudās arī uz ražu. Pozitīvs efekts bija augu inokulēšanai ar mikorizas sēnēm uz ražas veidošanos un proteīna saturu. Kopējā tendence - gumiņbaktēriju dubultinokulācijas variantos ar mikorizas sēnēm raža bija augstāka nekā kontrolē. Ar baktēriju RP023 un mikorizas sēnēm izveidojās par 6%, bet ar RV407 par 11% lielāka raža nekā kontroles variantā. Inokulācija tikai ar mikorizas sēnēm ražu paaugstināja

par 13%, salīdzinot ar kontroli. Inokulācija ar mikorizas sēnēm arī veģetācijas periodā veicināja augstāku proteīna saturu lakstos, salīdzinot ar kontroli. Lietotajiem inokulātiem bija būtiska (p=0.007) ietekme uz proteīna uzkrāšanos sēklās. Salīdzinot inokulāciju ar atsevišķiem gumiņbaktēriju celmiem, proteīna daudzums sēklās augstāks bija ar gumiņbaktēriju RV407 (30.7%) inokulētajiem augiem, bet ar RP023 (29.5%) bija zemāks. Zemākais proteīna daudzums bija kontrolē (27.2%).

Ražas paaugstināšau varēja veicināt optimālāku fotosintēzes apstākļi, jo vairumā gadījumu variantos ar mikorizas sēnēm augiem bija augstāks hlorofila daudzums. Škirnei 'Karmazyn' izmēģinājumos VT2016_A variantos ar mikorizas sēnēm hlorofila daudzums bija būtiski (p=0.001) lielāks.

Turpinot salīdzināt gumiņbaktēriju celmu efektivitāti, izmēģinājums VT2015 iekārtots ar divām pupu šķirnēm 'Bartek' un 'Karmazyn'. Veģetācijas perioda laikā starp abām šķirnēm nebija būtiska atšķirība. Ar mikorizas preparātu inokulētām pupām 'Karmazyn' bija smagāki dzinumi un augstāks sausnes daudzums, bet atšķirība nebija statistiski būtiska. Salīdzinot proteīna saturu lakstos, veģetācijas periodā, un sēklās redzams, ka abām šķirnēm augstāks proteīna daudzums bija ar mikorizas sēnēm inokulātajos variantos. Arī sēklās, ar mikorizas sēnēm inokulētajos variantos, abām šķirnēm, bija augstāks proteīna sdauddzums.

Lielākā atšķirība starp atsevišķu inokulāciju ar gumiņbaktērijām un dubultinokulāciju bija konstatēta baktērijām RP023. Abām šķirnēm bija korelācija starp proteīna saturu lakstos veģetācijas periodā un uzkrāto proteīna saturu sēklās. Ar mikorizas sēnēņu preparātu neinokulētajos variantos korelācijas koeficients $r=0.66 > r_{0.05,\ 24} = 0.40$, bet inokulētajiem variantiem $r=0.69 > r_{0.05,\ 24} = 0.40$. Atšķirība starp variantiem nebija tik izteikta, kā iepriekšējā gada rezultātos. Iegūtie rezultāti saskan ar Jia un līdzautoru (Jia et al., 2004) iegūtajiem rezultātiem, vērtējot dubultinokulācijas efektu uz pupu ražu, lietojot divus atšķirīgus slāpekļa mēslojuma fonus, kā arī Shinde un Thakur (Shinde, Thakur, 2016) iegūtajiem rezultātiem ar zirņiem. Abos pētījumos dubultinokulācijas variantos bija iegūta augstāka raža. Tomēr abos pētījumos atšķīrās noteiktais sausnas saturs augos.

Apkopojot trīs gadu rezultātus konstatēts, ka inokulācijai ar gumiņbaktērijām ir būtiska ietekme uz proteīna uzkrāšanos gan lakstos ziedēšanas sākumā (p=0.04), gan sēklās (p=0.001). Nebūtiska ietekme ir inokulācijai tikai ar mikorizas sēnēm (p=0.91 un p=68). Konstatējama atšķirīga gumiņbaktēriju celmu ietekme (3.3. tabula).

3.3.tabula

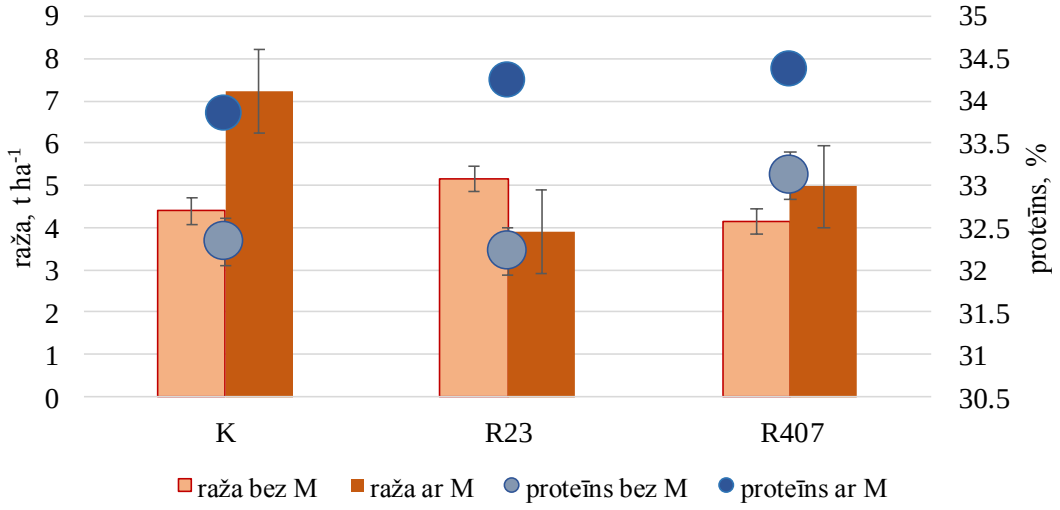
Vidējais proteīna daudzums lakstos un sēklās veģetācijas trauku izmēģinājumos šķirnei 'Bartek'

Inokulācijas variants	Proteīns dzinumos, %		Proteīns sēklās, %	
	Bez mikorizas	Ar mikorizu	Bez mikorizas	Ar mikorizu
K	19.54 [ab]	19.64 [b]	21.37 [a]	21.42 [a]
RP023	19.88 [b]	20.47 [c]	29.18 [b]	28.11 [b]
RV407	18.17 [a]	17.70 [a]	31.25 [b]	30.73 [b]

Augam labvēlīgos augšanas apstākļos un ar efektīvu simbiotisko sistēmu vajadzētu veidot optimālu virszemes auga masu, lai varētu iegūt sēklu ražu ar augstu proteīna saturu. Salīdzinot veģetatīvo parametru un proteīna uzkrāšanos dzinumos un sēklās varēja konstatēt ciešu korelāciju starp sausni lakstos un lakstu masu gan variantos kuri inokulēti ar mikorizas sēnēm ($r=0.81 > r_{0.05,36} = 0.33$), gan bez mikorizas sēnēm ($r=0.92 > r_{0.05,27}= 0.38$). Vidēji cieša korelācija konstatēta starp lakstu masu un proteīnu saturu lakstos variantos kuri inokulēti tikai ar gumiņbaktērijām ($r=0.51 > r_{0.05,24}= 0.40$) un dubultinokulācijas variantos ($r=0.45 > r_{0.05,24}= 0.40$).

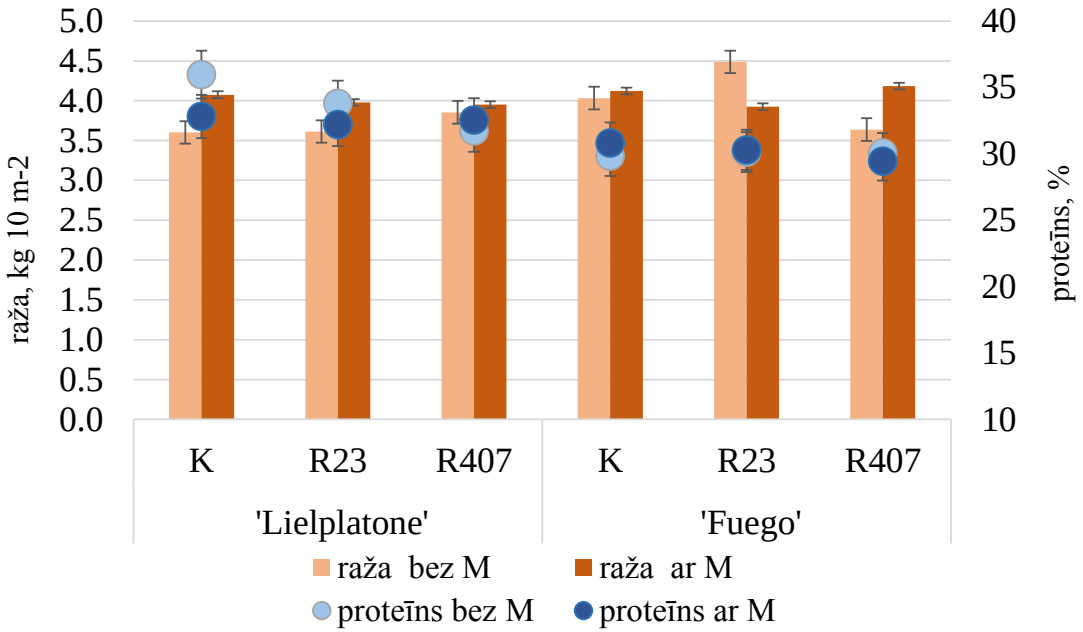
Atšķirībā no rezultātiem, kuri bija iegūti veģetācijas traukos (VT2014), raža LI2015 izmēģinājumā būtiski lielāka, salīdzinot ar kontroli bija tikai variantā ar mikorizas sēnēm.

Tomēr visos inokulācijas variantos ar mikorizas sēnēm sēklās bija augstāks proteīna saturs (3.34.att.).

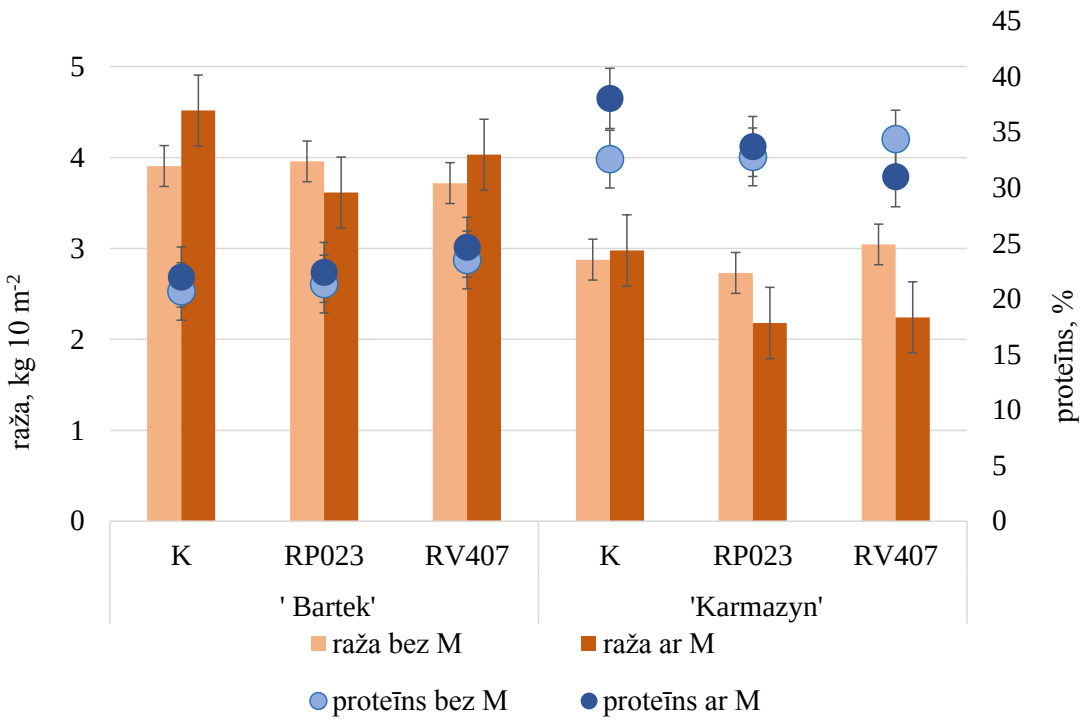


3.34.att. **Raža un proteīna saturs lakstos pupām 'Bartek' ziedēšanas laikā LI2015 izmēģinājumā**
(M – inokulēti ar mikorizas sēnēm)

Novērtējot inokulācijas varianta ietekmi uz ražu, vairāk izpaudās šķirnes faktors. 'Lielplatonei' augstāka raža bija ar mikorizas sēnēm inokulētajam variantam un dubultinokulācijas variantam ar baktērijām RP023 (3.35.att.), bet abos variantos proteīna saturs sēklās bija nedaudz zemāks nekā variantā bez mikorizas. Šķirnei 'Fuego' labvēlīga ietekme bija dubulinokulācijai ar baktēriju celmu RV407 un mikorizas sēnēm, bet ar baktēriju celmu RP023 efekts bija pretējs.



3.35. att. **Pupu sēklu raža un proteīna saturs šķirnēm 'Lielplatone' un 'Fuego' izmēģinājumā LI2015_A**
K – varianti bez inokulācijas ar gumiņbaktērijām; R23 – varianti inokulēti ar gumiņbaktēriju celmu RP023, R407 – varianti inokulēti ar gumiņbaktēriju celmu RV407, M – inokulēti ar mikorizas sēnēm



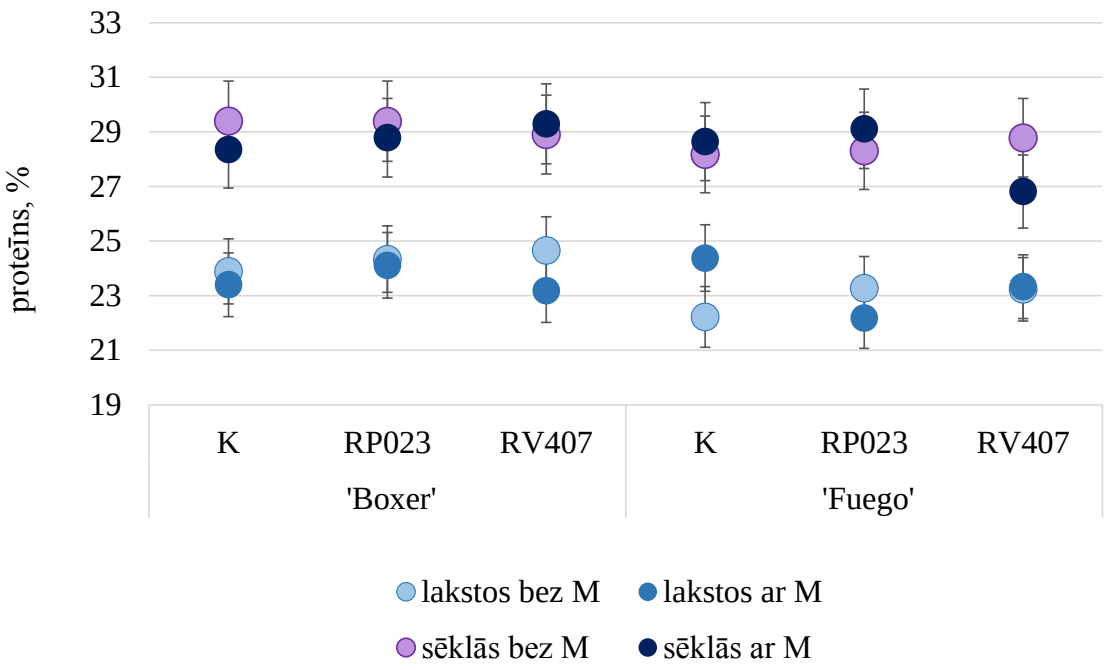
3.36. att. **Pupu sēklu raža un proteīna saturs šķirnēm 'Bartek' un 'Karmazyn' izmēģinājumā LI2015_A**

K – varianti bez inokulācijas ar gumiņbaktērijām; R23 – varianti inokulēti ar gumiņbaktēriju celmu RP023, R407 – varianti inokulēti ar gumiņbaktēriju celmu RV407, M – inokulēti ar mikorizas sēnēm

Rupjsēklu šķirnēm augstāka raža iegūta tikai variantos, kuri inokulēti ar mikorizas sēnēm bez gumiņbaktērijām (3.36.att.). Šķirnei 'Karmazyn' dubultinokulācija ar baktērijām RV407 un mikorizas sēnēm samazināja arī proteīna saturu sēklās.

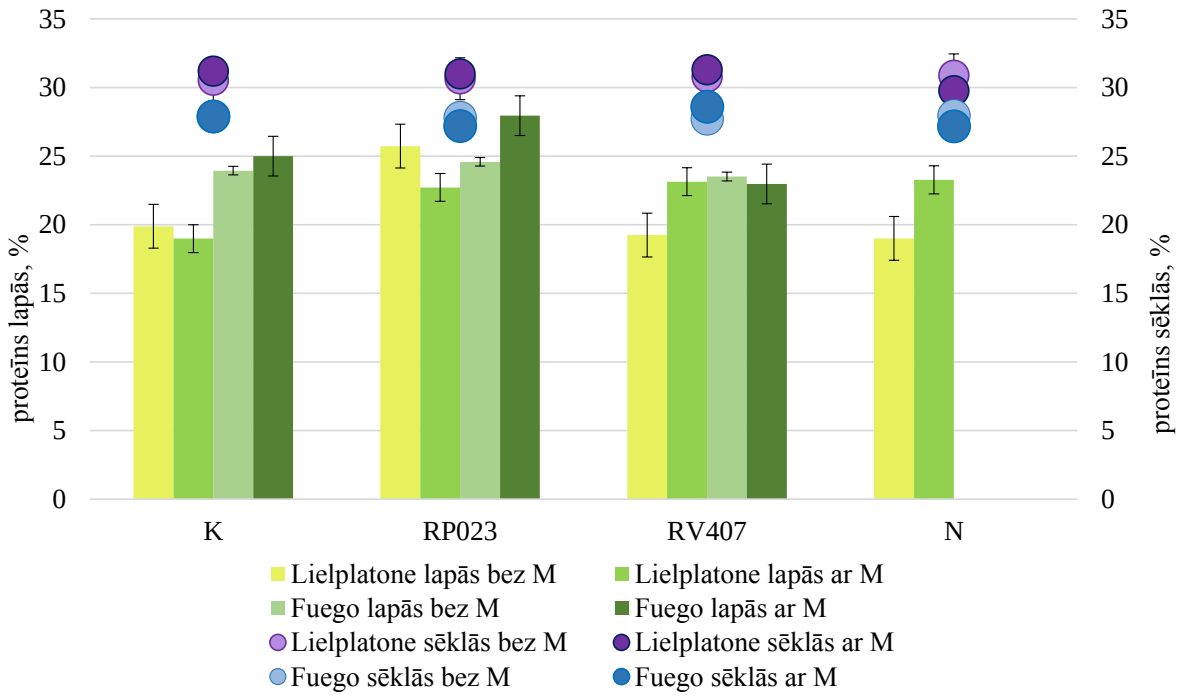
Izmēģinājumā LI2015_B proteīna saturs sēklās, variantos ar mikorizas sēnēm, bija nedaudz augstāks, bet nebūtisks. Dubultinokulācija ar gumiņbaktērijām RV407 un mikorizas sēnēm šķirnei 'Fuego' proteīna saturu samazināja ($p=0.02$, $RS_{0.05}=0.32$) (3.37.att.).

Optimālu fotosintēzes apstākļu veidošanās labvēlīgi ietekmē gan simbiotiskajā asociācijā iesaistītos mikroorganismu, gan nodrošina auga ražas veidošanos. Izmēģinājumā (LI2016_A) šķirnei 'Fuego' līdzīgi kā 'Lielplatonei' augu veģetatīvajās daļās sausnas daudzums starp inokulācijas variantiem būtiski neatšķīrās. Tomēr salīdzinot proteīna saturu dzinumos veģetācijas periodā un uzkrāto proteīna daudzumu sēklās (3.38.att.) redzams, ka pārsvarā visos variantos sēklās proteīns vairāk uzkrājas variantos ar mikorizas sēnēm. Lielākā atšķirība ir šķirnei 'Fuego' starp variantu, kur augi inokulēti tikai ar gumiņbaktēriju celmu RV407 un dubultinokulācijas variantu. Pretēja sakarība iegūta variantos, kur augi papildus mēsloti ar slāpekļa minerālmēslojumu. Šajā gadījumā variantā ar mikorizas sēņu inokulāciju, proteīna saturs sēklās samazinājās.



3.37. att. **Proteīna saturs lakstos veģetācijas periodā un sēklās dažādi inokulētos variantos šķirnēm 'Boxer' un 'Fuego' izmēģinājumā LI_2015_B**

K – varianti bez inokulācijas ar gumiņbaktērijām, M – inokulēti ar mikorizas sēnēm

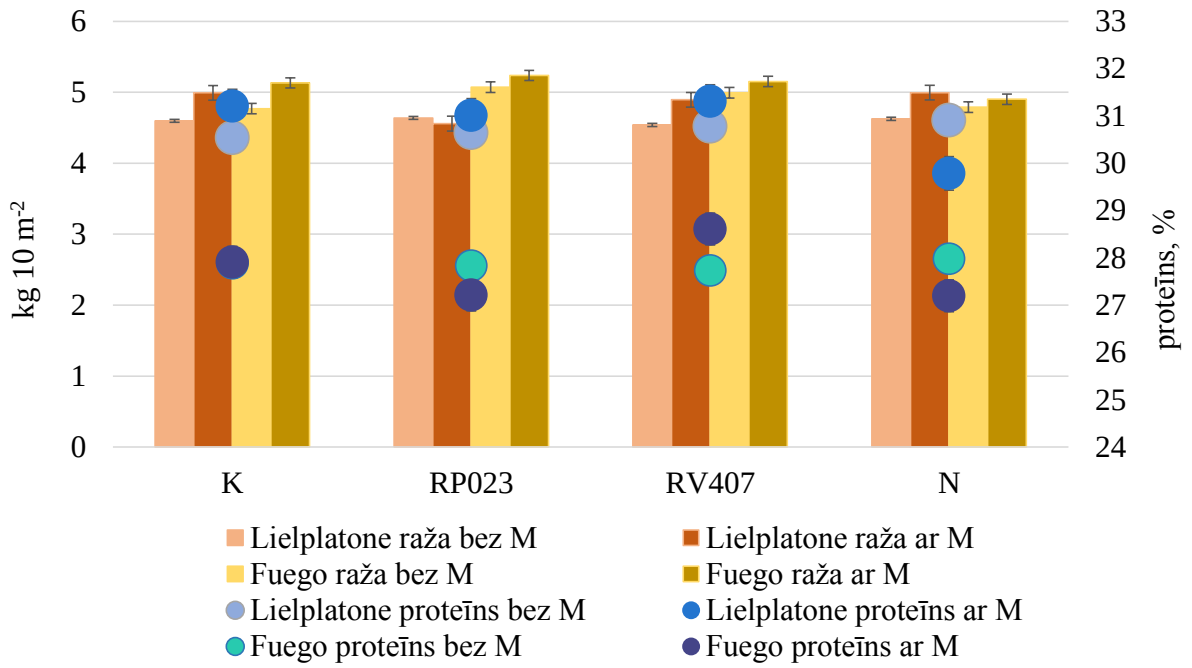


3.38. att. **Proteīna saturs pupu lakstos un sēklās šķirnēm 'Fuego' un 'Lielplatone' izmēģinājumā LI2016**

K – varianti bez inokulācijas ar gumiņbaktērijām, N – varianti bez inokulācijas ar gumiņbaktērijām, bet ar papildus slāpekļa mēslojumu

Novērtējot izvedotās simbiozes ietekmi uz pupu ražu konstatēts, ka mikorizas sēņu pievienošanu inokuluma sastāvā, vairumā gadījumu palielina ražu (3.39.att.). Mikorizas sēņu ietekme uz ražu ir statistiski būtiska ($p=0.00035$; $RS_{0.05}=0.14$). Tomēr ne visos variantos

atšķirība ir statistiski nozīmīga. Nebūtiska ietekme bija tikai dubultinokulācijas variantā ar baktērijām RP023 un mikorizas sēnes ar papildus slāpekļa mēslojumu.



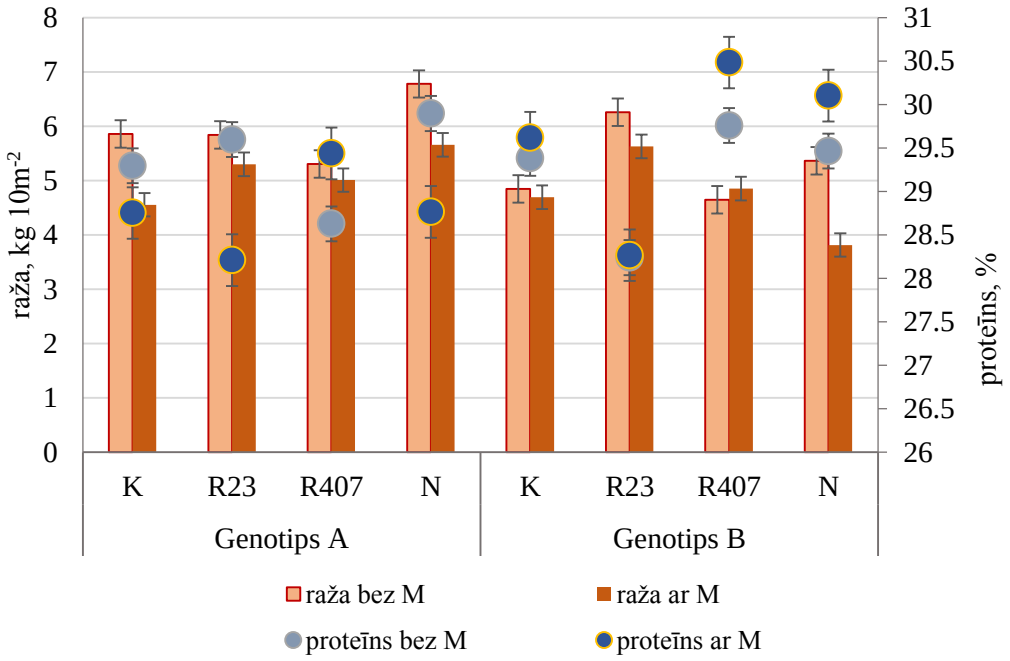
3.39. att. **Pupu sēklu raža un proteīna saturs šķirnēm 'Lielplatone' un 'Fuego' LI2016_A izmēģinājumā**

K – varianti bez inokulācijas ar gumiņbaktērijām, M – inokulēti ar mikorizas sēnēm, N – varianti bez inokulācijas ar gumiņbaktērijām, bet ar papildus slāpekļa mēslojumu

Proteīna daudzums sēklās dubultinokulācijas variantos augstāks abām šķinēm ar gumiņbaltērijām RV407. Proteīna daudzums palielinājās 'Lielplatonei'par 0.78, bet 'Fuego'par 0.88 procentiem. Variantos ar mikorizas sēnēm un papildu slāpekļa mēslojumu proteīna daudzums sēklās mazāks. Papildus slāpekļa mēslojums mikorizēto augu sēklās, proteīna daudzumu samazināja par 0.78 līdz 1.13%.

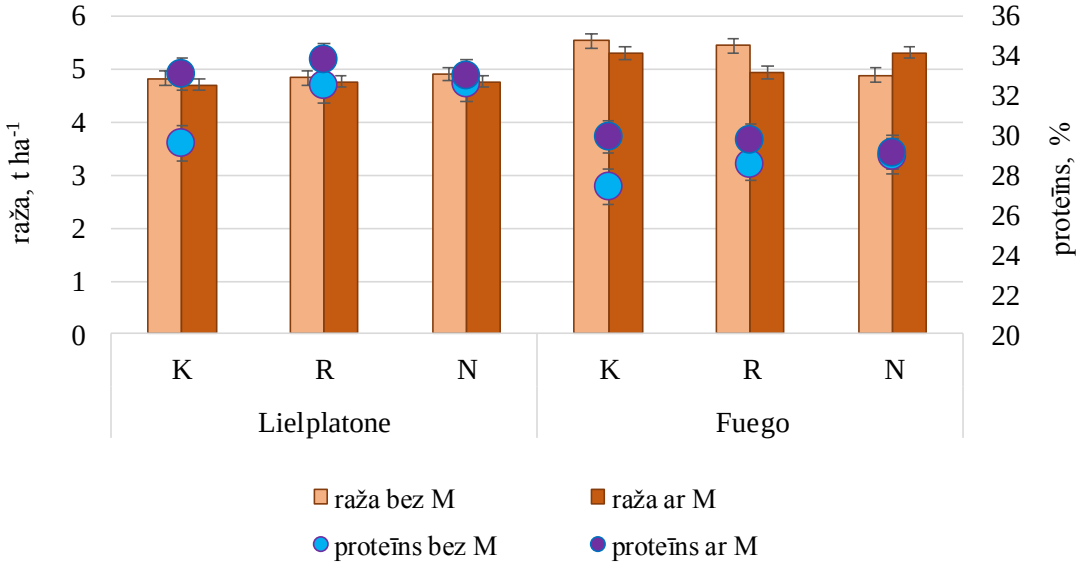
2016. gadā izmēģinājumā LI2016_B salīdzināta inokulācijas ietekme uz diviem lielsēklu pupu genotipiem. Veģetatīvo parametru analizēšanas laikā pupas bija sasniegušas 71.–75. attīstības stadiju. Inokulācijas variats ietekmēja proteīna daudzumu lakstos. Genotipam B abi gumiņbaktēriju celmi uzrādīja pozitīvu efektu. Pievienojot inokulācijā arī mikorizas sēnes, ietekmes efekts bija pretējs. Genotipam A dubultinokulācija veicināja proteīna daudzuma palielināšanos lakstos. Tomēr šāda sakarība nesaglabājās, vērtējot uzkrāto proteīna daudzumu sēklās (3.40.att.). Tikai ar gumiņbaktēriju celmu RV407 dubultinokulācijas variantā abiem genotipiem proteīna saturs sēklās bija augstāks nekā kontrolē, vai atsevišķi ar mikorizas sēnēm.

Izmēģinājumā LI2017 sēklu inokulēšanai lietota gumiņbaktēriju asociācija. Vērtējot ražu veidojošos komponentus konstatēts, ka izveidoto pākstu skaits būtiski neatšķīrās ne starp šķirnē, ne variantiem. Vidēji vienam augam izveidojās 12 – 16 pākstis. Atšķīrās 100 sēklu masa starp variantiem, kuri bija inokulēti ar mikorizas sēnēm un neinokulētajos. Šķirnei 'Lielplatone' vidējā 100 sēklu masa bija 41.3 g, bet variantos, kur lietota inokulācija ar mikorizas sēnēm 42.9 g. Atšķirība statistiski būtiska ($p=0.02$, $RS_{0.05} = 1.32$).



3.40.att. **Raža un proteīna saturs sēklās LI2016_B izmēģinājumā**
K – varianti bez inokulācijas ar gumiņbaktērijām; R23 – varianti inokulēti ar gumiņbaktēriju celmu RP023, R407 – varianti inokulēti ar gumiņbaktēriju celmu RV407, M – inokulēti ar mikorizas sēnēm

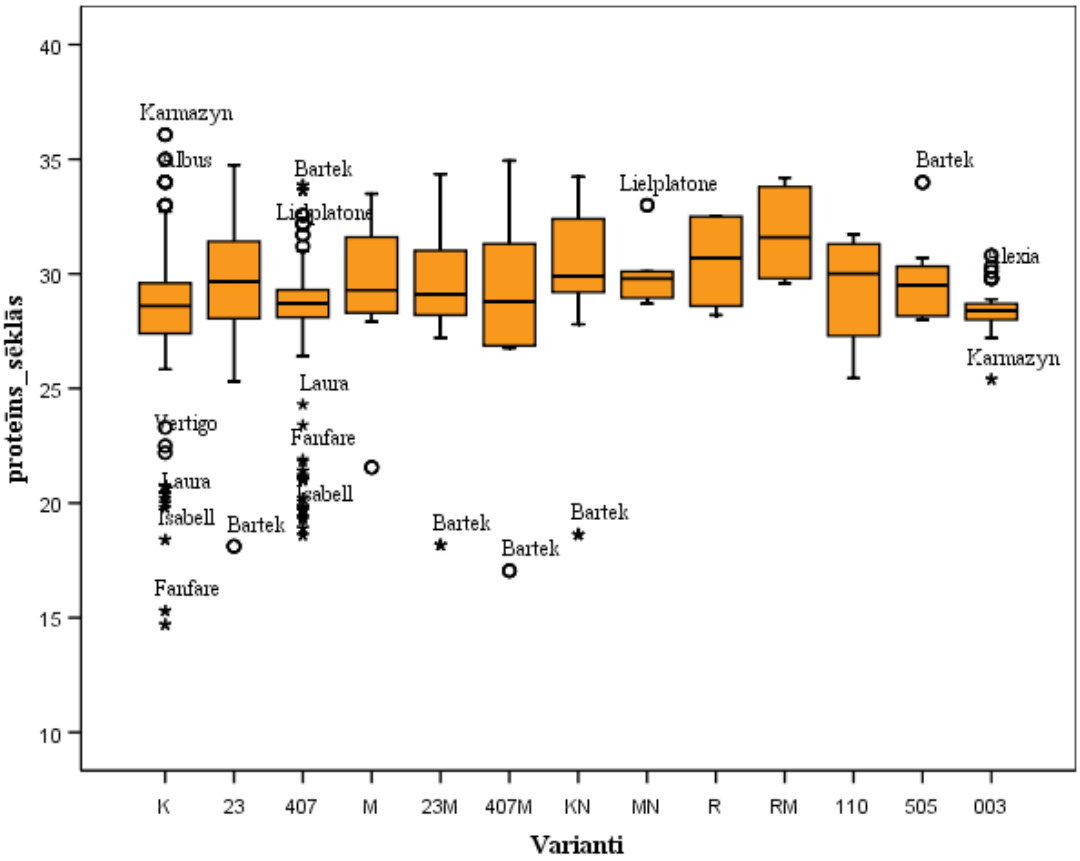
Šķirnei 'Fuego' vidējā 100 sēklu masa bija 54.6 g, bet variantos, kur lietota inokulācija ar mikorizas sēnēm 57.0 g. Atšķirība statistiski būtiska ($p<0.001$, $RS_{0.05} = 0.79$). Proteīna saturs noteikts pupu lakstos ziedēšanas fāzē un sēklās. Statistiski būtiska atšķirība starp variantiem, kur sēklas inokulētas ar mikorizas sēnēm bija tikai sēklās ($p<0.001$) (3.41.att.). Ziedēšanās fāzē lakstos proteīns vairāk veidojās variantos, kuros sēklas bija inokulētas.



3.41. att. **Raža un proteīna saturs sēklās šķirnēm 'Lielplatone' un 'Fuego' LI2017 izmēģinājumā**
K – varianti bez inokulācijas ar gumiņbaktērijām, R – varianti, kuros sēklas inokulētas ar gumiņbaktērijām, N – varianti bez inokulācijas ar gumiņbaktērijām, bet ar papildus slāpekļa mēslojumu

3.3.3. Inokulācijas efekta novērtējuma kopsavilkums

Iekārtojot izmēģinājumus dažādās audzēšanas vietās, lai novērtētu inokulācijai lietoto gumiņbaktēriju aktivitāti un ietekmi uz ražu, konstatēta augsnes apstākļu un šķirnes ietekme. Apkopojot vairāku veģetācijas periodu datus, var novērot mainīgu inokulācijas efektu uz pupu ražu un tās kvalitāti. Proteīna saturs ir nozīmīgs iegūtās ražas kvalitātes rādītājs. Salīdzinot dažādu inokulācijas variantu ietekmi uz proteīna uzkrāšanos sēklas konstatēts, ka inokulētajos variantos vidēji proteīna saturs ir augstāks nekā kontrolē. Apkopojot visu analizēto šķirņu proteīna analīžu rezultātus (3.42.att.) redzams, ka lielākas svārstības ap vidējo vērtību inokulāciju variantos ar vienu atsevišķu mikrosimbiontu. Variantos, kur inokulātu veido atsevišķi gumiņbaktēriju celmi, vidējais proteīna saturs sēklās būtiski neatšķīrās no dubultinokulācijas varianta ar mikorizas sēnēm. Proteīna saturu sēklās ietekmē ne tikai sēklu inokulēšanai lietotie mikroorganismi, bet arī audzēšanas apstākļi. Gumiņbaktēriju celmiem RP003, RV505 un RP110 bija konstatējams būtisks audzēšanas vietas ietekmes efekts. Pozitīva ietekme bija inokulātam, kura sastāvā iekļauti vairāki gumiņbaktēriju celmi (varianti R un RM). Tas mazina konkrētās audzēšanas vietas un vides apstākļu ietekmi uz gumiņbaktēriju aktivitāti un spēju veidot simbiozi ar pupām. Trīspusējās simbiozes pozitīvā ietekme uz proteīna uzkrāšanos sēklās arī lielāka bija variantā ar gumiņbaktēriju asociāciju (RM variants).



3.42.att. **Proteīna saturs (%) pupu sēklās ar dažādiem inokulātu variantiem**

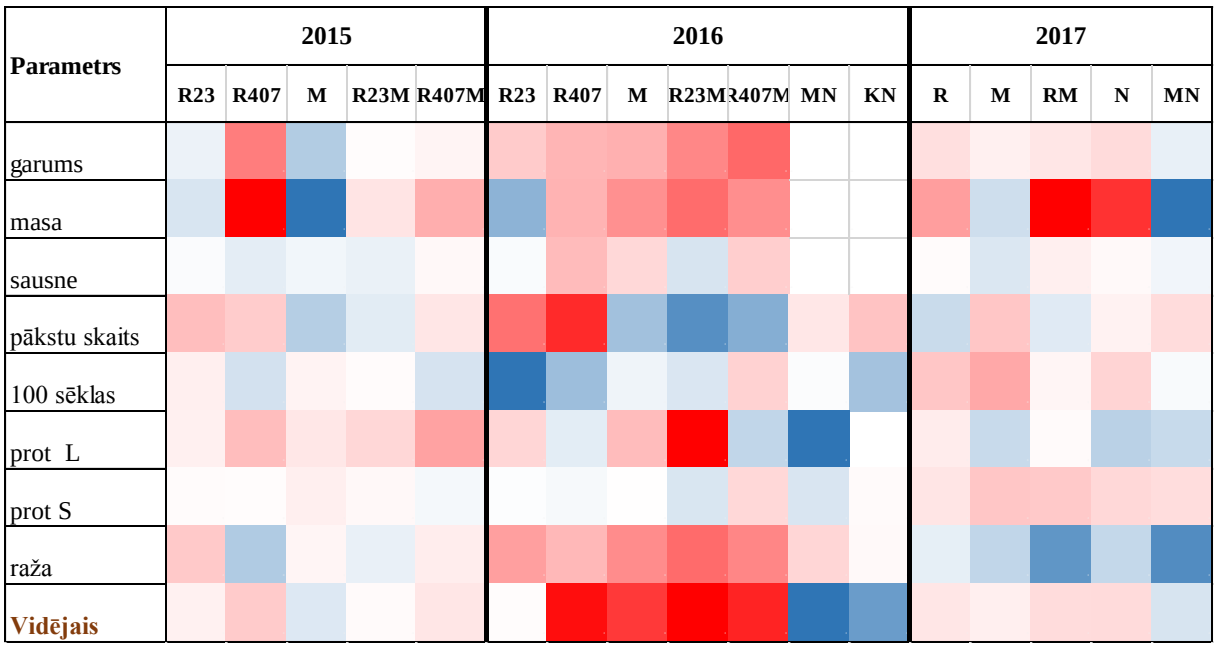
Inokulācijas ietekmes būtiskumsuz veģetatīvajiem parametriem un ražu novērtēts, salīdzinot inokulētos variantus pret kontroli. Ietekme izteikta ar koeficientu, kura vērtība svārstās no -1 (negatīvs efekts salīdzinot ar kontroli) līdz 1 (pozitīvs efekts, salīdzinot ar kontroli) un atainots krāsu kartē. Kontroles varianta vērtības atbilst 0 punktam (2.4.att.).

Veģetatīvo parametru un ražas izmaiņas salīdzinot pret kontroli šķirnei ‘Lielplatone’ atainoti krāsu kartē (3.43. att.). Trīs gadu rezultāti neparāda viennozīmīgi vienu labāko inokulācijas variantu. Tā kā izmēģinājumi katru gadu bija ierīkoti citā laukā, var secināt, ka konkrētās audzēšanas vietas apstākļiem ir būtiska ietekme uz simbiozes efektivitāti. Vairumā gadījumu pozitīvs efekts uz augu veģetatīvajiem parametriem ir dubultinokulācijas variantos. Atsevišķi lietojot noteiktus gumiņbaktēriju celmus, ir lielāka varbūtība, ka introducētās baktērijas nebūs konkurētspējīgas ar augsnes gumiņbaktēriju populāciju, vai tām būs nepiemēroti apstākļi efektīvas simbiozes izveidošanai. 2015. gadā vairums analizēto veģetatīvo parametru labāki bija kontroles augiem. Tēpēc, kaut arī inokulētajos variantos raža bija iegūta augstāka nekā kontrolē, proteīna saturs sēklās bija zemāks. Pretējs rezultāts bija 2017. gadā, kad inokulētajiem augiem raža bija iegūta zemāka, nekā kontrolē, bet ar augstāku proteīna saturu. Augstākais proteīna saturs sēklās bija dubultinokulācijas variantā (RM).

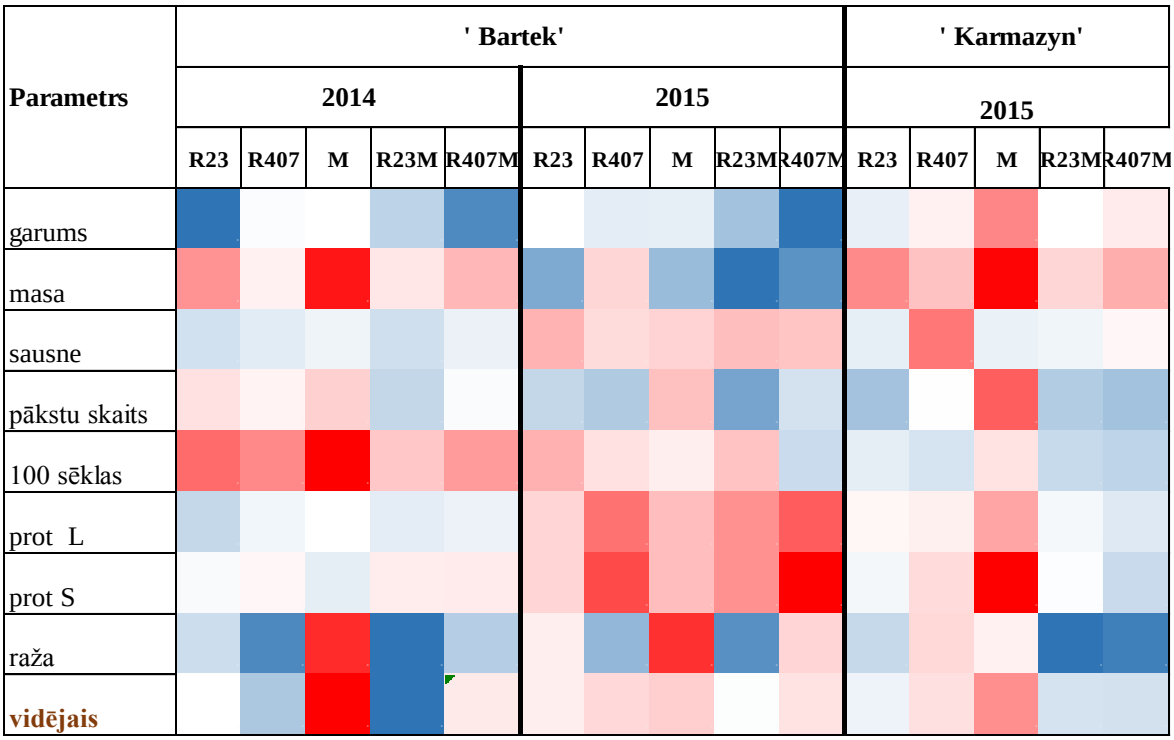
Krāsu kartē šķirnei ‘Fuego’ (3.44.att.) arī nav izteikti viena labākā inokulācijas varianta. Atšķirībā no ‘Lielplatones’ šķirnei ‘Fuego’ ir mazāk par kontroli labāku (kartē sarkanā krāsā) variantu. Analizētajiem parametriem ir mazāka atšķirība no kontroles. 2015. gadā labāks rezultāts bija variantos, kur inokulēšanā lietots gumiņbaktēriju celms RV407. Dubultinokulācijai bija potīvāks rezultāts nekā ar baktēriju RP023. 2016. gadā ietekme saglabājās līdzīga, proteīna saturs sēklās augstāks bija dubultinokulācijas variantā ar celmu RV407. Līdzīgi, kā ‘Lielplatonei’, 2017. gadā raža zemāka bija variantos ar inokulāciju, bet augstāks proteīna saturs. Lābākais inokulāta variants bija dubultinokulācija (RM) un mikorizas sēnes atsevišķi (M).

Šķirnei ‘Lielplatone’ simbiozes veidošanai labvēlīgāks bija 2017. gads, bet šķirnei ‘Fuego’ 2016. gads, bet mazāk piemērots 2015. gads. Īpaši izteikta atšķirība pa gadiem ir šķirnei ‘Lielplatone’. Veģetācijas perioda pirmajā pusē, kad veidojas arī simbioze un augam jāveido virszemes masa, lielākās atšķirības bija mēneša nokrišņu summā. Mazāk par normu maijā nokrišņi bija 2017. gadā, jūnijā, 2015. gadā.

3.43. att. **Krāsu karte lauka izmēģinājumu rezultātiem šķirnei ‘Lielplatone’**
prot L – proteīna saturs lakstos ziedēšanas fāzē
prot S – proteīna saturs sēklās



3.44. att. **Krāsu karte lauka izmēģinājumu rezultātiem šķirnei 'Fuego'**
prot L – proteīna saturs lakstos ziedēšanas fāzē
prot S – proteīna saturs sēklās



3.45. att. **Krāsu karte lauka izmēģinājumu rezultātiem šķirnei 'Bartek' un 'Karmazyn' 2015. gadā**
prot L – proteīna saturs lakstos ziedēšanas fāzē
prot S – proteīna saturs sēklās

Rupjsēklu šķirnei 'Bartek' lauka izmēģinājumu rezultāti atšķiras pa gadiem (3.45.att.). Ja 2014. gadā labāko rezultātu uzrādīja variants, kur augi bija inokulēti ar mikorizas sēnēm, tad 2015. gadā pozitīvais efekts bija vājāk izteikts, lai gan pozitīva ietekmes tendence uz ražas

veidošanos saglabājās. 2014. gadā bija vērojama mikorizas sēņu pozitīvā ietekme uz vairākiem parametriem (lakstu masa, 100 sēklu masa, raža), bet pozitīvā ietekme pilnībā nesaglabājās dubultinokulāciju variantos.

Šķirnei 'Karmazyn' inokulācija ar mikorizas sēnēm uzrādīja pozitīvu ietekmi (3.45.att.). Piemērotāks bija gumiņbaktēriju celme RV407, bet dubultinokulācija ar mikorizas sēnēm abiem gumiņbaktēriju celmiem veidoja negatīvu rezultātu. Tas apstiprina auga ietekmi uz mikrosimbiontu darbību, un inokulāta izvēlē ņemt vērā arī mikrosimbiontu mijiedarbību ar konkrētās augu šķirni. Šķirnei 'Karmazyn' un dubultinokulācija lietotajiem mikroorganismiem bija negatīva ietekme gan uz ražū, gan proteīna saturu sēklās. Šķirnei 'Karmazyn' visbiežāk varēja konstatēt nepiemērotus audzēšanas apstākļus, kas ietekmē arī mikrosimbiontu darbību.

Vairumā gadījumu pupu veģetatīvie parametri (lapu skaits, dzinumu skaits, masa) starp variantiem būtiski neatšķīrās. Ziedēšanas fāzē inokulētajiem augiem var konstatēt īsākus un vieglākus lakstus. To var skaidrot ar fotosintēzes nepietiekamo intensitāti, lai optimāli nodrošinātu ar fotosintēzes produktiem arī mikrosimbiontus. Starp parametriem, kuri izteiktāk varētu raksturot mikrosimbiontu ietekmi (lakstu masa un sausne, proteīna saturs lakstos un sēklās) atsevišķos izmēģinājumos varēja konstatēt arī būtisku atšķirību.

Secinājumi

1. LLU LF Augsnes un augu zinātņu institūta gumiņbaktēriju kolekcijas baktēriju celmi uzrāda atšķirīgu aktivitāti un spēju veidot simbiozi ar pupām. No pārbaudītajiem baktēriju celmiem nevar izvēlēties vienu, kurš vienlīdz efektīvi darbotos dažādos vides apstākļos. Salīdzinot dehidrogenāžu darbības tīrkultūrā, aktīvākais bija gumiņbaktēriju celms RV505, tomēr tā aktivitātes bija svārstīga dažādos augsnes tipos.

2. Pozitīvi rezultāti iegūti lietojot gumiņbaktēriju celmu asociācijas, kas ļauj novērst viena atsevišķa baktēriju celma konkurētspējas un efektivitātes izmaiņas, ko var ietekmēt vides faktori un augsnes esošo mikroorganismu aktivitāte.

3. Mikorizas sēņu klātbūtni varēja konstatēt visos analizētajos augšņu tipos. Atšķīrās mikorizācijas pakāpe (F%) un arbuskulu sastopamība (A%) sīksēklu un rupjsēklu pupām. Šķirnēm 'Bartek' un 'Karmazyn' arbuskulu veidošanās intensitāte saknēs bija zemāka nekā sīksēklu pupu šķirnēm. Rupjsēklu pupām mikorizācijas pakāpe svārstījās no 40% līdz 51.1%, bet sīksēklu no 65% līdz 97%. Attiecīgi arī arbuskulu sastopamība rupjsēklu šķirnēm bija no 0.13% līdz 1.14%, bet sīksēklu pupām no 4.39% līdz 11.30%.

4. Mikorizas sēņu lietošana kopā ar gumiņbaktērijām bija stimulējoša ietekme uz mikorizas struktūru veidošanos saknēs. Īpaši izteikti tas izpaudās, ja lietoja gumiņbaktēriju asociācijas. Dubultinokulācijas variantos augiem noteikts augstāks hlorofila daudzums salīdzinot ar kontroles augiem vai inokulējot tikai ar gumiņbaktērijām.

5. Minerālā slāpekļa papildmēslojums neveicināja mikorizas sēņu iedzīvošanos pupu saknēs. Vidējā mikorizācijas pakāpe bija zemāka, salīdzinot ar dubultinokulācijas variantiem. Šajos variantos konstatēta proteīna daudzuma samazināšanās sēklās vidēji par 0.70 – 1.15%.

6. Dubultinokulācijas variantos var konstatēt pozitīvu ietekmi uz augu ražu un tās kvalitāti, tomēr pozitīvā ietekme nebija konstatēta katrā veģetācijas periodā. Vairumā gadījumu izpaudās tikai pozitīva tendence. Inokulēšanā lietojot atsevišķus gumiņbaktēriju celmus, piemērotāks dubultinokulācijai bija RV407. Lietderīgi atsevišķu gumiņbaktēriju celmu vietā lietot asociāciju

PATEICĪBAS

Vēlos izteikt pateicību maniem kolēģiem Augsnes un augu zinātņu institūta Augu bioloģijas nodaļā par palīdzību izmēģinājumu iekārtošanā, kopšanā un novākšanā.
Profesoram, Dr. habil agr. Aldim Kārkliņam par augšņu identifikāciju.
Profesoram, Dr. habil. sc. ing. Pēterim Rivžam par palīdzību datu matemātiskajā apstrādē.
Dr. sc.ing. Ingmāram Cinkmanim par flavonoīdu sastāva analīzēm.
Dr. biol. Ligitai Liepiņai par konsultācijām, metodisko palīdzību darbā ar mikorizas sēnēm.
Dr.biol. Vilhelmīnei Šteinbergai par palīdzību darbā ar Augu bioloģijas nodaļas gumiņbaktēriju kolekciju.
Biotehnoloģiju zinātniskā laboratorijas pētniecei Dr. sc. ing. Lienei Strautai par proteīna analīžu veikšanu.
MPS Pēterlauki kolektīvam un Merabam Katamadzem par līdzdalību lauku izmēģinājumu ierīkošanā un ražas novākšanā.
LF studentiem Martai Liepiņai, Kristapam Zīvertam, Lāsmai Lapiņai, Ernestam Čakānam par palīdzību izmēģinājumu iekārtošanā un datu vākšanā.

IZMANTOTĀS LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Aarle I., Olsson A. (2003). Fungal Lipid Accumulation and Development of Mycelial Structures by Two Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Applied and Environmental Microbiol*, Vol. 69, No. 11, p. 6762–6767.
2. Abbott L.K., Robson A.D., Gazey C. (1994). Selection of inoculant of vesicular-arbuscular mycorrhizas. ***In**: Methods in microbiology*. Ed. by Norris J.R., Read D.J., Varma A.K., Academic Press, London, p. 121–150.
3. Abbott, L, Gazey, C. (1992). An ecological view of the formation of VA mycorrhizas. *Plant and Soil*, Vol. 159, No. 1, p. 69–78.
4. Abusin S.A.E., Hassan A.B., Babiker E.E. (2009). Nutritional evaluation of cooked faba bean (*Vicia faba* L.) and white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Aust J Basic Appl Sci*., Vol. 3, No. 3, p. 2484–2490.
5. Agegnehu G., Ghizaw A., Sinebo W. (2006). Yield performance and land-use efficiency of barley and faba bean mixed cropping in Ethiopian highlands. *Europ. J. Agronomy*, Vol. 25, p. 202–207.
6. Albrecht C., Geurts R., Bisseling T.(1999). Legume nodulation and mycorrhizae formation; two extremes in host specificity meet. *EMBO*, Vol. 18, p. 281–288.
7. Alghamdi S.S. (2009) Chemical Composition of Faba Bean (*Vicia faba* L.) Genotypes under Various Water Regimes. *Pakistan Journal of Nutrition*, Vol.8, p. 477–482. DOI: 10.3923/pjn.2009.477.482.
8. Allen J.W., Shachar-Hill Y. (2009). Sulfur Transfer through an Arbuscular Mycorrhiza. *Plant Physiology*, Vol. 149, No. 1, p. 549–560.
9. Ames R., Bethlenfalvay, G.R. (1987). Localized increase in nodule activity but no competitive interaction of cowpea rhizobia due to pre-establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New Phytol*., Vol. 106, p. 207–215.
10. Ames R.N., Reid C.P., Porter L.K., Cambardella C. (1983) Hyphal uptake and transport of 0nitrogen from two 15N-labelled sources by Glomus mosseae, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.*, Vol. (95), p. 381–396.
11. Antoun H., Bordeleau L.M., Sauvageau R. (1984). Utilizationof the tricarboxilic acid cycle intermediates and symbiotic effectiveness in *Rhizobium meliloti*. *Plant Soil.*, Vol. 77, p. 29–38.
12. Antunes P., Goss M. (2005). Communication in the Tripartite Symbiosis Formed by Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Rhizobia and Legume Plants: A Review. ***In**: Roots and Soil Management: Interactions between Roots and the Soil*. Ed. by Zobel, R. W.; Wright, S. F. Vol. 48, p. 199–122.
13. Antunes P.M., Deaville D., Goss M. (2006). Effect of two AMF life strategies on the tripartite symbiosis with Bradyrhizobium japonicum and soybean. *Mycorrhiza*, Vol.16, p. 167–173.
14. Arbid M.S., Marquardt R.R. (1985). Hydrolysis of the toxic constituents (vicine and convicine) in fababean (*Vicia faba* L.) food preparations following treatment with β-glucosidase. *J Sci Food Agric*. Vol. 36, No.9, p.839–846.
15. Artursson V., Finlay R.D., Jansson J.K. (2006) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology*, Vol.8, No. 1, p.1–10.
16. Arumugam R; Rajasekaran S; Nagarajan S. (2010). Response of Arbuscular mycorrhizal fungi and Rhizobium inoculation on growth and chlorophyll content of *Vigna unguiculata* (L). *J. Appl. Sci. Environ. Manage*. Vol. 14, No. 4 p. 113–115.
17. Atkins C., Pate J., Shelp B. (1984). Effects of Short-Term N_2 Deficiency on N Metabolism in Legume Nodules'. *Plant Physiology*, Vol.76, p. 705–710.
18. Augé R.M. (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, Vol. 11, p. 3–42.

19. Augkopība. 2004. Galv. red. A. Ruža. Jelgava: LLU, 374 lpp.
20. Ayub M., Nadeem M.A., Naeem, M., Tahir M., Tariq M., Ahmad W. (2012). Effect of different levels of P and K on growth, forage yield and quality of cluster beans (*Cyamopsis tetragonolobus* L.). *The Journal of Animal & Plant Sciences*, Vol. 22, No. 2, p. 479–483.
21. Azcon R., Rubio R., Barea J.M. (1991). Selective interactions between different species of mycorrhizal fungi and Rhizobium meliloti strains, and their effects on growth, N_2-fixation (^{15}N) and nutrition of *Medicago sativa* L. *New Phytologist*, Vol. 117, p. 399–404.
22. Azcón-Aguilar C., Barea, J. M. (1996). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*,Vol. 6, p.457–464.
23. Bago B, Pfeffer P, Shachar-Hill Y (2000) Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. Plant Physiol 124: 949–957
24. Bago B., Pfeffer P., Shachar-Hill Y. (2001) Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *New Phytologist*, Vol. 149, p. 4–8.
25. Bago B.B., Azcón-Aguilar C., Goulet A., Piche Y. (1998). Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, Vol. 139, p. 375–388.
26. Balodis R., Gaile Z., Kreita Dz., Litke L. (2016). Dažādu agrotehnisko elementu ietekme uz lauka pupu ražu. ***No****: Zinātniski praktiskās konferences „Līdzsvarotā lauksaimniecība"rakstu krājuma,* 8.–11 lpp.
27. Barker S.J., Tagu D., Delp G. (1998) Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. *Plant Physiol* .Vol. 116, p. 1201–1207.
28. Beck D.P., Wery J., Saxena M.C., Ayadi A. (1991). Dinitrogen fixation and nitrogen balance in cool-season food legumes. *Agron. J.* Vol. 83, p. 334–341.
29. Begum A., Leibovitch S., Migner P., Zhang F. (2001). Specific flavonoids induced nod gene expression and pre- activated nod genes of Rhizobium leguminosarum increased pea (Pisum sativum L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *J Exp Bot.*, Vol. 52, No. 360, p. 1537–1543. DOI: https://doi.org/10.1093/jexbot/52.360.1537.
30. Bethlenfalvay G. J. (1992). Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen-fixing legumes: problems and prospects. *Methods Microbiol*. Vol. 24, No. 375–389.
31. Bethlenfalvay G., Newton W.E. (1991). Agro-ecological aspects of the mycorrhizal, nitrogen-fixing legume symbiosis. ***In****: The rhizosphere and plant growth*. Ed. by Keister A., Cregan N. p. 349–354.
32. Bianciotto V., Minerd D., Perotto S., Bonfante P. (1996). Cellular interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria. *Protoplasma*, Vol. 193, p. 123–131.
33. Bishop J., Jones H.E., Lukac M., Potts S.G. (2016) Insect pollination reduces yield loss following heat stress in faba bean (*Vicia faba* L.). *Agric Ecosyst Environ*. Vol. 220, p. 89–96. https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.12.007
34. Bohlool B.B., Ladha J.K., Garrity D.P., George T. (1992). Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. *Plant and Soil.* Vol.141, No. 1-11.
35. Boland M.J. and Schubert K.R. (1983). Biosynthesis of purines by a proplastid fraction from soybean nodules. *Arch. Biochem. Biophys*. Vol. 220, p. 179–187
36. Bond D.A., Lawes D.A., Hawtin G.C., Saxena M.C., Stephens J.S. (1985). Faba bean (*Vicia faba* L.). ***In:*** *Grain Legume Crops.* Ed. by Summerfield R.J., Roberts E.H., London, UK: William Collins Sons, p. 199–265.
37. Bonfante P., Requena N. (2011). Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol*. Vol. 14, No.4, p. 451–457. doi:10.1016/j.pbi.2011.03.014

38. Bora P. (2014). Anti-Nutritional Factors in Foods and their Effects. Journal of *Academia and Industrial Research*. Vol. 3, p. 285–290.
39. Bordeleau L.M., Prévost D. (1994) Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and Soil*, Vol. 161, p. 115–125.
40. Bottomley P.J., Myrold D.D. (2007) Biological N inputs. ***In*: *Soil microbiology, ecology, and biochemistry.*** Ed. by Paul A.E., Elsevier, p. 365–385.
41. Boucher D., James S., Keeler K. (1982). The ecology of mutualism. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* Vol.13, p.15–47
42. Bradford D.M., Schwab E. (2012). Symbiosis:"Living Together" in Chaos. *Studies in history of biology*, Vol.4, No. 4, p. 7–25.
43. Brockwell J., Bottomley P., Thies, J.E. (1995). Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: A critical assessment. *Plant and Soil*. Vol. 174 p. 143–180. DOI: 10.1007/BF00032245.
44. Brundrett M. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, Vol. 154, No. 275–304.
45. Brundrett M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol. Rev.*, Vol. 79, p.473–495.
46. Brundrett M., Bougher N., Dell B., Grove T., Malajczuk N. (1996). Working with Mycorrhizas in Forestery and Agriculture. *Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra* .p. 347.
47. Bruns T.D., Arnold A.E., Hughes K.W. (2008) Fungal networks made of humans: UNITE, FESIN, and frontiers in fungal ecology. *New Phytologist.* Vol. 177, p. 586–588.
48. Bücking H., Abubaker, J., Govindarajulu M., Tala M., Pfeffer P.E., Nagahashi G., Lammens P. (2008). Root exudates stimulate the uptake and metabolism of organic carbon in germinating spores of Glomus intraradices. *New Phytologist*. Vol. 180, p. 684–695 . DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02590.
49. Bücking H., Heyser W. (2003) Uptake and Transfer of Nutrients in Ectomycorrhizal Associations: Interactions between Photosynthesis and Phosphate Nutrition. *Mycorrhiza*, Vol.13, p. 59–68.
50. Bücking H., Liepold E., Ambilwade P. (2012). The role of the Mycorrhizal Symbiosis in Nutrient Uptake of Plants and the Regulatory Mechanisms Underlying. InTech, p. 107–138.
51. Bücking H., Shachar- Hill Y. (2005). Phosphate uptake, transport and transfer by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is stimulated by increased carbohydrate availability. *New Phytologist*, Vol. 165, p. 899–912.
52. Cabrejas M., Aquilera Y., Pedrosa M., Cuadrado C., Hernandez T., Diaz S., Esteban R. (2009). The impact of dehydration process on antinutrients and protein digestibility of some legume fluors. *Food Chemistry*, Vol. 114, p. 1063–1068.
53. Cahill F., Elle E., Smith R., Shore H. (2008). Disruption of a belowground mutualism alters interactions between plants and their floral visitors. *Ecology*, Vol. 89, No. 7, p. 1791–1801.
54. Carranca C., Torres M.T, Madeira M. (2015).Underestimated role of legume roots for soil N fertility. *Agronomy for Sustainable Development*, Vol. 35, No. 3, p.1095–1102.
55. Carrenho R., Trufem S.F., Bononi V.L., Silva E.S. (2007). The effect of different soil properties on arbuscular mycorrhizal colonization of peanuts, sorghum and maize. *Acta bot. bras*. Vol. 21, No. 3, p. 723–730.
56. Carter K.R., Rawlings J., Orme-Johnson W.H., Becker R.R., Evans H.J. (1980). Purification and characterization of a ferredoxin from Rhizobium japonicum bacteroids. *J. Biol. Chem*. Vol. 255, p. 4213–4233.
57. Catford J.G., Staehelin C., Lerat S., Piche Â Y., Vierheilig, H. (2003). Suppression of arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation in split-root systems of alfalfa after

pre-inoculation and treatment with Nod factors. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 54, No. 386, p. 1481–1487.
58. Chagnon P.L. (2014). Ecological and evolutionary implications of hyphal anastomosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol*, Vol. 88, p. 437–444.
59. Cheeke P.R. (1971). Nutritional and physiological implications of saponins: a review. *Can J Anim Sci*, Vol. 51, No. 3, p. 621– 632.
60. Chen Z., MacKenzie A.F., Fabnous M.A. (1992). Soybean nodulation and grain yield as influences by N-fertilizer rate, plant population density and cultivar in southern Quebec. *Can. J. Plant Sci*. Vol. 72, p. 1049–1056.
61. Christensen H., Jakobsen I. (1993). Reduction of bacterial growth by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in the rhizosphere of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Biol and Fert of Soil*., Vol. 15, p. 253–258.
62. Cleveland C.C., Townsend A., Schimel D.S., Fisher H., Howarth R.W., Hedin L.O., Perakis S.S., Latty E.F., Von Fisher J., Elseroad A., Wasson F. (1999). Global pattern of terrstrial biological nitrogen (N_2) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochemical cycles*.Vol.13, p. 623–645.
63. Cook R. (1977). The Biology of Symbiotic Fungi. *John Wiley and Sons, London*, p. 282.
64. Cooper J.E. (2007). Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied microbiology*. Vol. 103, p. 1355–1365.
65. Cre´pon K., Marget P., Peyronnet C., Carroue´e B., Arese P.,Duc G. (2010). Nutritional value of faba bean (*Vicia faba* L.) seeds for feed and food. *Field Crops Researc*, Vol.115, p. 329–339 .
66. Crush J.R. (1974). Plant growth response to vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New phytologist*, Vol. 73, p. 743–749.
67. Dantun G., Grashoff C. (1984). Vegetative and Reproductive Growth of Faba beans (*Vicia faba* L.) as influenced by water supply. ***In:*** *Vicia faba*: *Agronomy, Physiology and Breeding.* Ed. by. Dawkins, P.D ., Heath T.C., Lockwood M.C., Springer Science & Business Media, pp.47–61.
68. Day D.A., Poole P. S., Tyermanc S.D., Rosendahl, L. (2001). Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cell. Mol. Life Sci.* Vol. 58, p. 61–71.
69. De Hoff P.L., Brill L.M., Hirsch A.M. (2009). Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Mol Genet Genomics*, Vol. 282, p.1–15.
70. DeJong T.M., Brewin N.J., Johston A.W., Phillips, D. A. (1982). Improvement of Symbiotic Properties in Rhizobiurn legurninosarurn by Plasmid Transfer. *Journal of General Microbiology*, Vol. 128, p. 1829–1838.
71. Denison R.F, Kiers E.T. (2011). Life Histories of Symbiotic Rhizobia and Mycorrhizal Fungi. *Current Biology*, Vol. 21, p. 775–785. DOI:10.1016/j.cub.2011.06.018.
72. Denison R.F. (2000). Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. *Am. Nat*. Vol. 156, p. 567–76.
73. Depret G., Hout S., Allard M., Breuil M., Nouaim R., Laguerre G. (2004). Long-term effects of crop management on *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations. *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 51, p. 87–97.
74. Desbrosses G.D., Stougaard J. (2011). Root Nodulation: A Paradigm for How Plant-Microbe Symbiosis Influences Host Developmental Pathways.*Cell Host & Microbe*, Vol. 10, p. 348–358: DOI 10.1016/j.chom.2011.09.005 .
75. Dickson S.D., Smith F.A., Smith S.E. (2007). Structural differences in arbuscular mycorrhizal symbioses: more than 100 years after Gallaud, where next? *Mycorrhiza*, Vol. 17, No. 17, p. 375–393.
76. Downie L.A. (2014). Legume nodulation. *Current Biology*, Vol. 24, No. 5, p. 184–190.

77. Drissner D., Kunze G., Callewaert N., Gehrig P., Tamasloukht M., Boller T., Felix G., Amrhein N., Bucher M. (2007). Lyso-Phosphatidylcholine is a Signal in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Science*, Vol. 318, p. 265–268.
78. Drouin P., Prevost D., Antoun H. (2000). Physiological adaptation to low temperatures of strains of Rhizobium leguminosarum bv. viciae associated with Lathyrus spp. *FEMS Microbiol. Ecol*., Vol. 32, p. 111–120.
79. Duc G, Bao S., Baum M., Redden B., Sadiki M., Suso M.J., Vishniakova M., Zong X. (2010) Diversity maintenance and use of *Vicia faba* L. genetic resources. *Field Crops Res.* Vol. 115, No. 3, p. 270–278. doi.org/10.1016/j.fcr.2008.10.003.
80. Duc G., (1997). Faba bean (*Vicia faba* L.). *Field crops Res*., Vol. 53, p. 99–109.
81. Duc G., Trouvelot A., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (1989). First report of non-mycorrhizal plant mutants (myc-) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant Sci*., Vol. 60, p. 215–222.
82. Duodu S., Carlsson G., Huss-Danell K., Svenning M.M. (2007) Large genotypic variation but small variation in N2 fixation among rhizobia nodulating red clover in soils of northern Scandinavia. *J Appl Microbiol.*, Vol. 102, p. 1625–1635.
83. Eason W.R., Newman E.I., Chuba P. (1991). Specificity of interplant cycling of phosphorus: The role of mycorrhizas. *Plant and Soil*, Vol.137, No. 2, p. 267–274.
84. Eckart J.F., Raguse C.A. (1980). Effects of diurnal variation in light and temperature on the acetylene reduction activity (nitrogen fixation) of subterranean clover. *Agron. J*. Vol. 72, p. 519–523.
85. Eiropas parlamenta un padomes regula (ES) Nr. 1307/2013; Eiropas Savienības Oficiālais Vēstnesis.
86. El-Ghandour I.A., El-Sharawy M.A., Abdel-Moniem E.M. (1996). Impact of vesicular mycorrbizal fungi and Rhizobium on the growth and P, N and Fe uptake by faba-bean. *Fertizer Research*, Vol. 43, p. 43–48.
87. Escuredo P.R., Minchin F.R., Gogorcena Y., Iturbe-Ormaetxe I., Klucas R.V., Becana M. (1996). Involvement of activated oxygen in nitrate-induced senescence of pea root nodules. *Plant Physiology*, Vol. 110, p. 1187–1195.
88. Farrand S.K., Van Berkum P.B., Oger P. (2003). Agrobacterium is a definable genus of the family Rhizobiaceae. *Int. J. Syst.Evol.Microbiol*., Vol. 53, p. 1682–1687.
89. Fellbaum C.R., Gachomo E.W., Beesetty Y., Choudhari S., Strahan G.D., Pfeffer P.E., Kiers E.T., Bucking H. (2012). Carbon Availability Triggers Fungal Nitrogen Uptake and Transport in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, Vol. 109, No. 7, 2666–2671.
90. Finan T.M., Wood J.M., Jordan D.C. (1981). Succinate transport in Rhizobium leguminosarum. *J. Bacteriology*, Vol. 148, p. 193–202.
91. Franzini V.I., Azcón R., Mendes F.L.,Aroca R. (2010). Interactions between *Glomus* species and *Rhizobium* strains affect the nutritional physiology of drought-stressed legume hosts. *Journal of Plant Physiology*, Vol. 167, p. 614–619.
92. Frey-Klett P., Garbaye J., Tarkka M. (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*, Vol. 176, p. 22–36.
93. Fyson A., Sprent, J.I. (1982). The Development of primary root nodules on *Vicia faba* L. grown at two temperatures. *Ann. Bot.*, Vol. 50, p. 681–692.
94. Gage D.J. (2004). Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 68, No. 2, p. 280–300. DOI:10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004.
95. Gallardo K., Thompson R., Burstin J. (2008). Reserve accumulation in legume seeds. C. R. Biol. 331, 755–762. doi:10.1016/j.crvi.2008.07.017
96. Garg N., Geetanjali (2007). Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling. *Agron. Sustain. Dev.* Vol. 27, p. 59–68.
97. George E., Jakobsen I. (1995). Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Uptake of

Phosphorus and Nitrogen from Soil. *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 15, No. 3, p. 257–270. DOI 10.3109/07388559509147412.
98. George T., Singleton P. (1992). Nitrogen Assimilation Traits and Dinitrogen Fixation in Soybean and Common Bean. *Agronomy Journal*, Vol. 84(6). 1020–1025.
99. Gianfreda L. (2015). Enzymes of importance to rhizosphere processes. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, Vol. 15, No. 2, p. 283–306.
100. Gonzalez E.M., Aparicio-Tejo P.M., Gordon A.J., Minchin F.R., Royuela M., Arrese-Igor C. (1998). Water-deficit effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 49, p. 1705–1714.
101. Gosling P., Hodge A., Goodlass, G., Bending, G.D. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Vol. 113, p. 17–35.
102. Graham P. (2008). Ecolohy of the root-nodule bacteria of legumes. ***In:*** *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*, Ed. By Dilworth H.M.J. et al., Springer Science+Business Media B.V., p. 23–28.
103. Graham P.H., Vance C.P. (2003). Update on Legume Utilization Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, Vol. 131, p. 872–877. DOI: 0.1104/pp.017004.872
104. Griffiths D.W., Ramsay G. (1996). The distribution of pyrimidinone glucosides in developing seedlings of *Vicia faba* and *Vicia narbonensis*. *J Sci Food Agric*. Vol. 72, No. 4, p.469–475.
105. Grunwald U., Guo W.B., Fischer K., Isayenkov S., Ludwig-Müller J., Hause B., Yan X.L., Kuster H., Franken P. (2009). Overlapping Expression Patterns and Differential Transcript Levels of Phosphate Transporter Genes in Arbuscular Mycorrhizal, Pi-Fertilised and Phytohormone-Treated *Medicago truncatula* Roots. *Planta*, Vol. 229, No. 5, p. 1023–1034.
106. Guether M., Neuhauser B., Balestrini R., Dynowski M., Ludewig U., Bonfante P.A. (2009). Mycorrhizal-Specific Ammonium Transporter from Lotus japonicus Acquires Nitrogen Released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plant Physiology*, Vol. 150, No. 1, p. 73–83.
107. Habte M. (2000). Mycorrhizal fungi and plant nutrition. ***In:*** *Plant nutrient management in Hawaii's soils, approaches for tropical agriculture.* Ed. by Silva J.A., Uchida R., University of Hawaii at Manoa. p. 127–133.
108. Hafeez F.Y., Naeem F., Shaheen N., Malik K.A. (2007). Nodulation of Sesbania spp., by introduced rhizobia in competition with naturalized strains in different soil types. *Pak. J. Bot.*, Vol. 39, No. 3, p. 919–929
109. Harborne J.B., Williams C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, Vol. 55, p. 481–504.
110. Harris D., Pacovsky R.S., Paul E.A. (1985). Carbon economy of Soybean-Rhizobium-Glomus association. *New Phytologist*, Vol. 101, p. 427–440.
111. Harrison M.J., Dewbre G.R., Liu J.A. (2002). Phosphate Transporter from Medicago truncatula Involved in the Acquisition of Phosphate Released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *The Plant Cell*, Vol. 14, p. 2413–2429.
112. Hartwig U.A., Maxwell C.A., Joseph C.M., Phillips D.A. (1990). Interactions among flavonoid nod gene inducers released from alfalfa seeds and roots. *Plant Physiol*., Vol. 91, p. 1138–1142.
113. Hartwig U.A., Phillips D.A. (1991). Release and Modification of nod-Gene-Inducing Flavonoids from Alfalfa Seeds. *Plant Physiol*. Vol. 95, p. 804–807.
114. Hassan S., Mathesius U. (2012). The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions , *Journal of Experimental Botany*, Vol. 63, No. 9, p. 3429–3444.
115. Hayman D.S. (1982). Influence of Soils and Fertility on Activity and Survival of

Vesicular – Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Phytopathology*, Vol. 72, No. 8, p. 1119–1125.
116. He X.H., Crichley C., Bledsoe C. (2003) Nitrogen transfer within and between plants through common mycorrhizal networks (CMNs). *Crit. Rev. Plant Sci*. Vol. 22, p. 531–567.
117. Heijden van der M.G.A., Bardgett R.D., van Straalen N.M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, Vol. 11, p. 296–310.
118. Heijden van der M.G.A., Scheublin R. (2007). Functional traits in mycorrhizal ecology: their use for predicting the impact of arbuscular mycorrhizal fungal communities on plant growth and ecosystem functioning. *New Phytologist*, Vol. 174, p. 244–250.
119. Helber N, Wippel K, Sauer N, Schaarschmidt S, Hause B, Requena N.A. (2011). Versatile Monosaccharide Transporter that Operates in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus Glomus sp. is Crucial for the Symbiotic Relationship with Plants. *Plant Cell*, Vol. 23, p. 3812–3823.
120. Herman D., Firestone M.K., Nuccio E., Hodge A. (2012) Interactions between an arbuscular mycorrhizal fungus and a soil microbial community mediating litter decomposition. *FEMS Microbiol Ecol.*, Vol. 80, p. 236–247.
121. Hernandez-Jimenez M.J., Lucas M.M., Rosario de Felipe M. (2002). Antioxidant defence and damage in senescing lupin nodules. *Plant Physiology and Biochemistry* , Vol. 40, p. 645–657.
122. Hibbet D., Binder M., Bisfoff J. et al., (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, Vol. 111, p. 509–547.
123. Hijikata N., Murase M., Tani C., Ohtomo R., Osaki M., Ezawa T. (2010). Polyphosphate has a Central Role in the Rapid and Massive Accumulation of Phosphorus in Extraradical Mycelium of an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *New Phytologist*, Vol. 186, No. 2, p. 285–289.
124. Hirsch A.M. (1992.) Tansley Review, 40. Devolopmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*, Vol. 122, p. 211–237.
125. Hirsch, A.M. (1999). Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 2, p. 320–326.
126. Hossain, M.S., Mortuza, M.G. (2006). Chemical composition of Kalimatar, a locally grown strain of faba bean (*Vicia faba* L.). *Pak. J. Biol. Sci*., Vol. 9 , p. 1817–1822.
127. Imhof S. (2001). Subterranean structures and mycotrophy of the achlorophyllous *Dictyostega orobanchoides* (Hook.) Miers (*Burmanniaceae*). *Rev Biol Trop*., Vol. 49, p. 239–247.
128. Ishac Y.Z., Angle J.S., Ei-Borollosy M.E., El-Demerdash M.E., Mostafa M.i., Fares C.N. (1994). Groth of *Vicia faba* as affected by inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* in two soils. *Biol.Fert.Soils*, Vol. 17, p. 27–31.
129. Jason J.T., Graham A.H., Philip S.P. (2012). What determines the efficiency of N_2-Fixing Rhizobium-Legume Symbioses? *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 60, p. 325–389.
130. Jia Y., Gray V.M., Straker C.J. (2004). The influence of Rhizobium and Arbuscular Mycorrhizal fungi on Nitrogen and Phosphorus Accumulation by *Vicia faba*. *Annals of Botany*, Vol. 94, p. 251–258.
131. Jin H., Pfeffer P.E., Douds D.D., Piotrowski E., Lammers P.J., Shachar-Hill Y. (2005) The Uptake, Metabolism, Transport and Transfer of Nitrogen in an Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *New Phytologist*, Vol. 168, No. 3, p. 687–96.
132. Johansson J.F., Paul R.L., Finlay, R.D. (2004) Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 48, p.1–13.

133.Joner E.J., Jakobsen I. (1995). Uptake of 32P from labeled organic matter by mycorrhizal and nonmycorrhizal subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L*). Plant Soil*, Vol. 172, p. 221–227.
134.Jurševskis L., Holms I., Freimanis P. (1988). Augkopība. Rīga, Zvaigzne, 510 lpp.
135.Kaimi E., Mukaidai T., Tamaki M. (2007). Screening of Twelve Plant Species for Phytoremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil. *Plant Prod.Sci*. Vol. 10, No. 2, p. 211–218.
136.Kalaji H.M., Jajoo A., Oukarroum A. et al. (2016). Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiol Plant.* Vol. 38, No. 102 https://doi.org/10.1007/s11738-016-2113-y.
137.Kaschuk G., Kuyper T., Leffelaar P., Hungria M., Giller K. (2009). Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 41, p. 1233–1244.
138.Kaschuk G., Leffelaar P., Giller K., Alberton O., Hungria M., Kuyper T.W. (2010). Responses of legumes to rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi: A meta-analysis of potentional photosynthate limitation of symbioses. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 42, p. 125–127.
139.Kessel van C., Hartley C. (2000) Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation? *Field Crops Research* ,Vol.65, p. 165–181.
140.Khaliq A., Sanders F.E. (2000). Effects of vesicular–arbuscular mycorrhizal inoculation on the yield and phosphorus uptake of field-grown barley. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 32, p. 1691–1696.
141.Khan D.F., Peoples M.B., Schwenke G.D., Felton W.L., Chen D., Herridge D.F. (2003). Effects of below-ground nitrogen on N balances of field grown faba bean, chickpea and barlay. *Aust.J.Agric.Res*., Vol. 54, No. 3, p. 333–340.
142.Kiers E.T. Denison R.F. (2008). Sanctions, cooperation, and the stability of plant-rhizosphere mutualisms. A*nnual Review of Ecology, Evolution, and Systematic*s, Vol. 39, p. 215–236.
143.Kiers E.T., Duhamel M., Beesetty Y., Mensah J.A., Franken O., Verbruggen E., Fellbaum C.R., Kowalchuk G.A., Hart M.M., Bago A., Palmer T.M., West S.A., Vandenkoornhuyse P, Jansa J, Bücking H. (2011). Reciprocal Rewards Stabilize Cooperation in the Mycorrhizal Symbiosis. *Science*, Vol. 333, p. 880–882.
144.Klāsens V. (1967). Rhizobium leguminosarum Frank. izplatība Latvijas PSR augsnēs un to simbiozes aktivitāte. Disertācija, 200 lpp.
145.Koch A.M., Croll D., Sanders I.R. (2006). Genetic variability in a population of arbuscular mycorrhizal fungi causes variation in plant growth. *Ecol Lett.*, Vol. 9, p. 103–110. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00853.x.
146.Köpke U., Nemecek T. (2010). Ecological services of faba bean. *Field Crop Research*. Vol. 115, p. 217–233.
147.Kovacs G.M., Scigetvari C. (2002). Mycorrhizae and other root-associated fungal structures of the plants of a sandy grassland on the Great Hungarian Plain. *Phyton,* Vol. 42, No. 2, p. 211–223.
148.Krupa U. (2008). Main Nutritional and antinutritional compounds of bean seeds. *Pol. J. Food Nutr. Sci*., Vol. 58, p. 149–155.
149.Kucey R.M.N., Paul E.A. (1982). Carbon flow, photosynthesis, and N_2 fixation in mycorrbizal and nodulated faba beans (*Vicia faba* L.). *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 14, p. 407–412.
150.Laguerre G, Depret D., Bourion V., Duc G. (2007). *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* genotypes interact with pea plants in developmental responses of nodules, roots and shoots. *New Phytologist*, Vol. 176, p. 680–690.
151.Larimer A.L., Clay K., Bever J. (2014). Synergism and context dependency of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia with a prairie legume.

Ecology, Vol. 95, No, 4, p. 1045–1054.
152. Larose G., Chenevert R., Moutoglis P., Gagne S., Oiches Y., Vierheilig H. (2002). Flavonoid levels in roots of Medicago sativa are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *J. Plant Physiol.*, Vol. 159, p. 1329–1339.
153. Larralde J., Martínez J.A. (1991). Nutritional value of faba bean: effects of nutrient utilization, protein turnover and immunity. ***In***: *Present status and future prospects of faba bean production and improvement in the Mediterranean countries.* Ed. by Cubero J.I., Saxena M.C.Zaragoza, CIHEAM, p. 111–117.
154. Lauku kultūraugu mēslošanas normatīvi. (2013). Atb. Red.: Kārkliņš, A., Ruža. A. Jelgava, LLU, 55 lpp.
155. Lawrie A.C., Wheeler C.T. (1975). Nitrogen fixation in the root nodules of *Vicia faba* L. in relation to the assimilation of carbon I. Plant growth and metabolism of photosynthetic assimilates. *New Phytologist*, Vol. 74, No. 3, p. 429–436.
156. Layzell D.B., Rochman P., Canvin D.T. (1984). Low root temperatures and nitrogenase activity in soybean. *Can. J. Bot*., Vol. 62, p. 965–971.
157. Leigh J., Hodge A., Fitter A.H. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material. *New Phytologyst*, Vol. 181, p. 199–207.
158. Lerat A., Piche Y., Lapointe L., Vierheilig H. (2003). Variable carbon-sink strength of different *Glomus mosseae* strains colonizing barley roots. *Can. J. Bot*. Vol. 81, p. 886–889.
159. Linderman R.G. (1988). Mycorrhizal interractions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology*, Vol. 78, p. 366–371.
160. Lira J., Lima M.D.A., Arruda A.S.T., Smith J.R.F. (2005). Effect of root temperature on nodule development of bean, lentil and pea. *Soil.Biol. Biochem.*, Vol. 37, p. 235–297.
161. Lo´pez-Bellido L., Lo´pez-Bellido R.J., Redondo R., Benı´tez J. (2006) Faba bean nitrogen fixation in a wheat-based rotation underrainfed Mediterranean conditions: Effect of tillage system. *Field Crops Research* , Vol. 98, No. 2, p. 253–260.
162. Lodwig E.M., Hosle A.H., Bourdes A., Findlay K., Allaway D., Karunakaran R., Downie J.A., Poole P.S. (2003). Amino acid cycling drives nitrogen fixation in the legume – Rhizobium symbiosis. *Nature*, Vol. 422, p. 722–726.
163. Lum M.R., Hirsch A.M. (2003). Roots and their symbiotic microbes: strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrient-limited environment. *J. Plant Growth Regul.*, Vol. 21, p. 368–382.
164. LVS ISO 14240-1:1997. Soil quality – determination of soil microbial biomass. Part 1: Substrate induced respiration method.
165. Lynd J.Q., Hanlon E.A., Odell G.V. (1984). Nodulation and nitrogen fixation by arrow leaf clover: effects of phosphorus and potassium. *Soil Biol Biochem*., Vol. 16, p. 589–594.
166. Mäder P., Fliessbach, D., Dubois A., Gunst L., Fried P., Niggli U. (2002). Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science* , Vol. 296, p. 1694–1697.
167. Mahon J.D. (1977). Root and nodule respiration in relation of acetylene reduction in intact nodulated peas. *Plant Physiologia*, Vol. 60, p. 812–816.
168. Maj D., Wielbo J., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A. (2010). Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum. Microbiological Research*. V.165, p. 50–60.
169. Maltais-Landry G. (2015). Legumes have a great effect on rhizosphere properties (pH, organic acids and enzyme activity) but a smaller impact on soil P compared to other cover crops. *Plant Soil*, Vol. 94, p.139–154.
170. Mandal S.M., Chakraborty D., Dey S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant – microbe symbioses. Plant Signaling & Behavior, Vol.5, p. 359 – 368.

171. Marulanda A., Porcel R., Barea J.M., Azcon R., 2007. Drought tolerance and antioxidant activities in lavender plants colonized by native drought-tolerant or drought-sensitive Glomus species. *Microb. Ecol*., Vol. 54, p. 543–552.
172. Matamoros M.A., Baird L.M., Escuredo P.R., Dalton D.A., Minchin F.R., Iturbe-Ormaetxe I., Rubio M.C., Moran J.F., Gordon A.J., Becana M. (1999). Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiology*, Vol. 121, p. 97–111.
173. Meyer R. Linderman G.L. (1986). Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum. Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 18, No. 2, p. 191–196.
174. Mierziak J., Kostyn K., Kulma A. (2014). Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules*, Vol. 19, p. 16240–16265.
175. Minchin F.R., Witty J.F. (2005). Respiratory/carbon costs of symbiotic nitrogen fixation in legumes. ***In:*** *Plant Respiration,* Ed. by Lambers H., Ribas-Carbo M. Springer, Dordrecht, p. 195–205.
176. Moore D., Robson G., Trinci T. (2011). 21st century guidebook to fungi. Cambridge University Press, Cambridge,.p. 605.
177. Mortimer P.E., Perez-Fernandez M.A., Valentine A.J. (2008). The role of arbuscular mycorrhizal colonization in the carbon and nutrient economy of the tripartite symbiosis with nodulated *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 40, p. 1019–1027.
178. Munkvold L., Kjøller R., Vestberg M., Rosendahl S., Jakobsen I. (2004). High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, Vol. 164, No. 357–364. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01169.x.
179. Nap J.P., Bisseling T. (1990). Develeopmental Biology of a Plant- procariote Symbiosis: The Legume Root Nodule. *Science*, Vol. 250, p. 948–954.
180. Nemecek T., von Richthofen J., Dubois G., Casta P., Charles R., Pahl H. (2008). Environmental impacts of introducing grain legumes into European crop rotations. *Europ.J.Agrinomy*, Vol. 28, p. 380–393.
181. Newcomb W. (1981). Nodule morphogenesis and differentiation. ***In:*** *Biology of the Rhizobiaceae*, suppl. 13, International Review of Cytology. Ed. by Giles K.L., Atherly A. G., Academic Press, New York. p. 247–298.
182. Nutman P. S., Hearne R. (1979). Persistence of nodule bacteria in soil under longterm cereal cultivation. *Rothamsted Experimental Station Report*, p. 77–90.
183. Oehl F., Sieverding E., Ineichen K., Mader P., Boller T., Wiemken A. (2003). Impact of Land Use Intensity on the Species Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Agroecosystems of Central Europe. *Applied and Environm. Microbiol.,*. Vol. 69, p. 2816–2824.
184. O'hara G.W., Boonkerd D., Dilworth I. (1988). Mineral constraints to nitrogen fixation. *Plant and Soil*, Vol. 108, p. 93–110.
185. Oresnik I.J., Pacarynuk L.A., O'Brien S.H.P., Yost C., Hynes M.F. (1998) Plasmid-encoded catabolic genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*: evidence for a plant-inducible rhamnose locus involved in competition for nodulation. *Mol Plant Microbe Interact.,* Vol. 11, p. 1175–1185.
186. Oresnik I.J., Twelker S., Hynes M.F. (1999) Cloning and characterization of a *Rhizobium leguminosarum* gene encoding a bacteriocin with similarities to RTX toxins. *Appl Environ Microbiol*., Vol. 65, p. 2833–2840.
187. Ossler J.N., Zielinski C.A, Heath K.D.T. (2015). Tripartite mutualism: Facilitation or trade-of s between rhizobial and mycorrhizal symbionts of legume hosts. *American Journal of Botany*, Vol. 102, No. 8, p. 1332–1341.
188. Pacovsky R.S., Baybe H.G., Bethlenfalvay G.J. (1984) Symbiotic Interactions between Strains of Rhizobium phaseoli and Cultivars of *Phaseolus vulgaris* L.. *Crop Science*,

Vol. 24, p. 101–105.
189. Parte, A.C. (2018). LPSN — List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68, 1825-1829; DOI: 10.1099/ijsem.0.002786.
190. Patrick J., Stoddard F.L. (2010) Physiology of flowering and grain filling in faba bean. *Field Crops Research*, Vol. 115, p. 234–242. doi:10.1016/j.fcr.2009.06.005.
191. Pearson J.N., Jakobsen I. (1993). Symbiotic exchange of carbon and phosphorous between cucumber and three arbuscular mucorrhizal fungi. *New Phytologist*, Vol. 124, p.481–488.
192. Pell M., Stenström J., Granhall U. (2005). Soil respiration. ***In:*** *Microbiological methods for assessing soil quality*. Ed. by Bloem J. et al., p. 117–126.
193. Peoples M.B., Brockwell J., Herridge D.F., Rochester B., Alves A., Urquiaga S,. Boddey R.M., Dakora F.D., Bhattarai S., Maskey S.L., Sampet C., Rerkasem B., Khans D.F., Hauggaard-Nielsen B., Jensen S. (2009). The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis*, Vol. 48, p. 1–17.
194. Peoples M.B., Brockwell J., Herridge I.J., Rochester B. (2009). The contribution of nitrogen -fixing crop legumes to the productivity of agricultural system. *Symbiosis*, Vol. 48, p. 1–17.
195. Peoples M.B., Craswell E.T. (1992). Biological nitrogen Fixation: Investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant and Soil*, Vol. 141, p. 13–39.
196. Peoples M.B., Herridge D.E., Ladha J.K. (1995). Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant and Soil*, Vol. 174, p. 3–28.
197. Perret X., Steahelin C., Broughton J. (2000). Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiology and molecular biology reviews*, p. 180–201.
198. Petrussa E., Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Vianello A. (2013). Plant Flavonoids–Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. *Int. J. Mol. Sci*., Vol. 14, p. 14950–14973.
199. Phillips D.A. (1971). Abscisic acid inhibition of root nodule initiaton in *Pisum sativum*. *Planta*, Vol. 100, p. 181–190.
200. Plassard C., Barry L., Eltrop L., Mousain D. (1994). Nitrate uptake in maritima pine (Pinus pinaster) and the ectomycorrhizal fungus Hebeloma cylindrosporum: effect of ectomycorrhizal symbiosis. *Can. J. Bot*., Vol. 72, p. 198–197.
201. Poole P.S., Hynes M.F., Johnston W.B., Tiwari R.P., Reeve W.G., Downie J.A. (2008). Physiology or root-nodule bacteria. ***In:*** *Nitogen-fixing Leguminous Symbioses*, Ed. by Dilworth M.J., James E.K., Sprent J.I., Newton W.E. Springer, Dordrecht, p.241–292.
202. Powell J.R., Parrent J.L., Hart H.H., Klironomos J.H., Rillig M.C., Maherali H. (2009). Phylogenetic trait conservatism and the evolution of functional trade-offs in arbuscular mycorrhizal fungi. *Proc. R. Soc. B*, Vol. 276, p. 4237–4245.
203. Prell J., Poole P. (2006). Metabolic Changes of Rhizobia in Legume Nodules. *Trends Microbiology*, Vol. 14, No. 4, p. 161–168.
204. Pringle A., Moncalvo J.M., Vilgalys R. (2000). High levels of variation in ribosomal DNA squences within and among spores of a natural population of the arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora colossica*. *Mycologia*, Vol. 92, p. 259–268.
205. Puppo A., Groten K., Bastian F., Carzaniga R., Soussi M., Lucas M., Felipe R., Harrison J., Vanacker H., Foyer C.H. (2005). Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytologist*, Vol. 165, p. 683–701
206. Rainbird R.M., Hitz W.D., Hardy R.W.F. (1984) Experimental determination of the respiration associated with soybean/Rhizobium nitrogenase function, nodule maintenance, and total nodule nitrogen fixation. *Plant Physiol.*, Vol. 75, p. 49–53.

207. Randhawa G. S., Hassani R. (2002). Role of Rhizobial Bio-synthetic Pathways of Amino Acids, Nucleotide Bases and Vitamins in Symbiosis. *Ind. J. Exp. Biol*. Vol. 40, p. 755–764.
208. Rashid M.H. Krehenbrink M., Akhtar, M.S. (2015) Nitrogen-Fixing Plant-Microbe Symbioses. ***In:*** *Sustainable Agriculture Reviews.* Ed by. Lichtfouse E. Springer, p.193–234. DOI 10.1007/978-3-319-09132-7_4.
209. Ravnskov S, Jakobsen I. (1995). Functional Compatibility in Arbuscular Mycorrhizas Measured as Hyphal P Transport to the Plant. *New Phytologist*, Vol. 129, p. 611-618.
210. Read D.J.J., Duckett G., Francis R., Ligrone R., Russell A. (2000). Symbiotic fungal associations in 'lower' land plants. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.B.*, Vol. 355, p. 815–831. DOI: 10.1098/rstb.2000.0617.
211. Reynolds H., Hartley A., Vogelsang K., Bever D., Schultz P. (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi do not enhance nitrogen acquisition and growth of old-field perennials under low nitrogen supply in glasshouse culture. *New Phytologist.* Vol. 167, p. 869–880.
212. Rillig M.C., Mummey D.L. (2006). Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, Vol. 171, p. 41–53.
213. Robaszkiewicz A.A., Bartosz G., Lawrynowicz M., Soczynski M. (2010). The role of polyphenols, β-carotene, and Lycopene in the Antioxidative Avtion of the extracts of Dried, Edible Mushrooms. *J. of Nutrition and Metabolism*. Article ID173274, doi.org/10.1155/2010/173274.
214. Rochfort S., Panozzo, J. (2007). Phytochemicals for health, the role of pulses. *J Agric Food Chem.*, Vol. 55, No. 20, p. 7981–7994.
215. Rowland G.G. (1980). The effect of initial seed moisture content on germination, stand and yield of faba Beans (*Vicia faba*) and Peas (*Pisum sativum*) in Western Canada. ***In:*** *Vicia faba: Physiology and Breeding*: *Proceedings of a Seminar in the EEC Programme of Coordination of Research on the Improvement of the Production of Plant Proteins*. Ed. by Thomson R. p. 101–123.
216. Rowland G.G., Gusta V. (1977) Effects of soaking, seed moisture content, temperature, and seed leakage on germination of faba bean (*Vicia faba*) and peas (*Pisum sativum*). *Canadian Journal of Plant Science*, Vol. 57, No. 2, p. 401–406. DOI: 10.4141/cjps77-058
217. Safikhani S., Morad M., Reza, C.M. (2013). Effects of seed inoculation by Rhizobium strains on chlorophyll content and protein in common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). *Int. Jour. of Biosc*., Vol. 3, p. 1–8.
218. Schachtman D.P., Reid R.J., Ayling S.M. (1998). Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiology*, Vol. 116, No. 2, p. 447–53.
219. Scheublin T.R., Karyn P.R., Young J.P.W., van der Heijden M.G.A. (2004) Nonlegumes, legumes, and root nodules harbour different arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Appl Environ Microbiol*., Vol. 70, p. 6240–6246.
220. Schilling G., Adgo E., Schulze J. (2006).Carbon costs of nitrate reduction in broad bean (*Vicia faba* L.) and pea (*Pisum sativum* L.) plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci*., Vol. 169, p. 691–698. DOI: 10.1002/jpln.200620609 691.
221. Schmidt P.E., Broughton W.J., Werner D. (1994). Nod factors of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium* sp. NG234 induce flavonoid accumulation in soybean root exudates. *Mol. Plant-Microbe Interact*., Vol. 7, p. 384–390.
222. Schultze M., Kondorosi A. (1998) Regulation of Symbiotic Root Nodule Development. *Annual Review of Genetics*, Vol. 32, p. 33–57. doi.org/10.1146/annurev.genet.32.1.33\
223. Schulz S., Keatinge J.D.H., Wells G.J. (1999). Productivity and residual effects of legumes in rice-based cropping systems in a warm-temperate environment: I. Legume biomass production and N fixation. *Field Crops Research*, Vol. 61, No. 1, p. 23–35.
224. Schweitzer L., Harper J.E. (1980). Effect of Light, Dark, and Temperature on Root

Nodule Activity (Acetylene Reduction) of Soybeans. *Plant Physiol*. Vol. 65, 51–56.
225. Schwenke G.D., Peoples M.B., Turner G.L., Herridge D.F. (1998). Does nitrogen fixation of commercial, dryland chickpea and faba bean crops in north-west New South Wales maintain or enhance soil nitrogen? *Australian Journal of Experimental Agriculture*, Vol. 38, No. 1, p. 61–70. DOI: 10.1071/EA97078.
226. Selosse M., Franck R., He X, Simard S. (2006). Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends in Ecology and Evolution*, Vol. 21, p. 621–628.
227. Sharma A, Sehgal S. (1992). Effect of processing and cooking on the antinutritional factors of faba bean (*Vicia faba*). *Food Chem*., Vol. 43, No. 5, p. 383–385.
228. Shaw L.J., Morris P., Hooker J.E. (2006). Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental Microbiology*, Vol. 8, p. 1867–1880.
229. Shinde B.P., Singh N. (2017). Effect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Growth Parameters of Sweet Corn under NaCl Salinity. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, Vol. 6, No. 2, p. 1317–1325.
230. Shtark O., Borisov A., Zhukov V., Provorov N., Tikhonovich I. (2010). Intimate Associations of Beneficial Soil Microbes with Host Plants. ***In:*** *Soil Microbiology and Sustainable Crop Production*. Ed. by Dixon G.R., Tilston E.L. Springer cience+Business Media B.V.
231. Siczek A., Lipiec J. (2016). Impact of Faba Bean-Seed Rhizobial Inoculation on Microbial Activity in the Rhizosphere Soil during Growing Seacon. *Int. J. Mol. Sci*,. Vol. 17, No. 784; doi:10.3390/ijms17050784.
232. Siddiqui Z.A., Pichtel J. (2008) Mycorrhizae: An Overview. ***In:*** *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestery.* Ed. by Siddiqui Z.A., Akhtar M.S., Futai K. Springer Netherlands, p. 1–37.
233. Silsbury J.H., Catchpoole D.W., Wallace W. (1986). Effect of nitrate and ammonium on nitrogenase (CaI-I 2 reduction) activity of subterranean clover, *Trifolium subterraneum* L. *Plant Physiol*. Vol. 13, p. 257–273.
234. Silva C., Kan F.L., Martinez-Romero E. (2007). Population genetic structure of Sinorhizobium meliloti and *S. Medicae* isolated from nodules Medicago spp. in Mexico. *FEMS Microbiol Ecol*., Vol. 60, p. 477–489.
235. Sinclair T.R., DeWit C.T. (1976). Analysis of the Carbon and Nitrogen Limitations to Soybean Yield. *Agronomy Journal*, Vol. 68, No. 2, p. 319–324.
236. Slattery J.F., Pearce D.J. Slattery W.J. (2004). Effcts of resident rhizobial communities and soil type on the effective nodulation of pulse legumes. *Soil biology & Biochemistry*, Vol. 36, p. 1339–1346.
237. Smit G.l., Trudy J., Longman J., Berrigten M., Kijne J.W., Lungtenberg, B. (1989). Purification and Partial Characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* Ca^{2+}-Dependent Adhesin, Which Mediates the First Step in Attachment of Cells of the Family *Rhizobiaceae* to Plant Root Hair Tips. *J.of bacteriology*, Vol. 171, p. 4054–4062.
238. Smith F.A., Smith S.E. (1997). Structural diversity in (vesicular)–arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, Vol. 137, p. 373–388. doi:10.1046/j.1469-8137.1997.00848.x.
239. Smith S.E., Gianinazzi-Pearson V., Koide R., Cairney J.W.G. (1994). Nutrient Transport in Mycorrhizas: Structure, Physiology and Consequences for Efficiency of the Symbiosis. *Plant and Soil*, Vol. 159, p. 103–113.
240. Smith S.E., Jakobsen I., Grønlund M., Smith F.A. (2011). Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Phosphorus Nutrition: Interactions Between Pathways of Phosphorus Uptake in Arbuscular Mycorrhizal Roots have Important Implications for Understanding and Manipulating Plant Phosphorus Acquisition. *Plant Physiology*, Vol. 156, 1050–1057.

241. Smith S.E., Read D.J. (2008). Mycorrhizal Symbiosis, 3rd Edn. Academic Press, London, 800 p.
242. Smith S.E., Smith F.A. (2011). Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth: New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales. *Annual Review Plant Biology*, Vol. 62, p. 227–250.
243. Smith S.E., Smith F.A., Jakobsen I. (2003). Mycorrhizal Fungi can Dominate Phosphate Supply to Plants Irrespective of Growth Responses. *Plant Physiology*, Vol. 133, No.1, p. 16–20. DOI: https://doi.org/10.1104/pp.103.024380.
244. Somasegaran P., Hoben H.J. (1994). Handbook for rhizobia: methods in Legume-rhizobium technology. Springer-Verlag, p.1 – 75.
245. Sprent J.I. (2007). Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phutologist*, Vol. 174, p. 11–25. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02015.x.
246. Sprent J.I., Thomas R.J. (1984) Nitrogen nutrition of seedling grain legumes: some taxonomic, morphological and physiological constraints. *Plant, Cell and Environment*, Vol.7, No. 9, p. 637–645.
247. Sprent T.I. (2008). Evolution and diversity of legume symbiosis. ***In:*** *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses.* Ed. by Dilworth H.M.J. et al., Springer Science+Business Media B.V., p. 1–23.
248. Starling M.E., Wood C.W., Weaver D.B. (1998). Starter nitrogen and growth habit effects on late-planted soybean. *Agron. J.*, Vol. 90, p. 658–662.
249. Sutton W.D. (1983). Nodule development and senescence. ***In:*** *Nitrogen Fixation.* Ed. by Broughtoon W.J. Oxford, UK.Clarendon Press, Vol. 3. p. 144–212.
250. Tampakaki A.P., Alsina I., Ntatsi G., Dubova L., Fotiadis C.T., Steinberga V., Savvas D., Marques G. (2014) Working with rhizobia: Handbook with protocols for nodule sampling, rhizobia isolation, poliphasic characterization, evaluation of BNF efficiency, competiveness and persistence, p.73. http://www.lf.llu.lv/sites/lf/files/2017-01/Eurolegume%20D3%201%20-%20Handbook%20of%20protocols.pdf.
251. Tanaka Y, Yano K. (2005). Nitrogen Delivery to Maize via Mycorrhizal Hyphae Depends on the form of N Supplied. *Plant, Cell and Environment*, Vol. 28, p. 1247–1254.
252. Tawaraya K., Hashimoto K., Wagatsuma T. (1998). Effect of root exudate fractions from P-deficient and P-sufficient onion plants on root colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus Gigaspora margarita. *Mycorrhiza*, Vol. 8, p. 67–70.
253. Terpolilli J.J., Hood G., Poole P.S. (2012). What determines the efficiency of N_2-fixing Rhizobium-legume symbioses? *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 60, p. 325–389.
254. Tian C, Kasiborski B, Koul R, Lammers PJ, Bücking H, Shachar-Hill Y. (2010). Regulation of the Nitrogen Transfer Pathway in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis: Gene Characterization and the Coordination of Expression with Nitrogen Flux. *Plant Physiology*, Vol. 153, p. 1175–1187.
255. Tobar R.M., Azcon R., Barea J.M. (1991). The improvement of plant N acquisition from an ammonium-treated, drought-stressed soil by the fungal symbiont in arbuscular mycorrhizae. *Mycorrhiza*, Vol. 4, p. 105–108.
256. Toker C. (2004). Estimates of broad-sense heritability for seed yield and yield criteria in faba bean (*Vicia faba* L.). *Hereditas*, Vol. 140, p. 222–225.
257. Toro N. (1996). Nodulation competitiveness in the Rhizobium legume symbiosis. *World J. Microbiol. Biotech.*, Vol. 12, p. 157–162.
258. Treseder K.K., Allen M.F. (2002). Direct nitrogen and phosphorus limitation of arbuscular mycorrhizal fungi: a model and field test. *New Phytologist*, Vol. 155, p. 507–515.
259. Trouvelot A., Kough J., Gianinazzi-Pearson V. (1986). Evaluation of VA infection levels in root systems. ***In:*** *Research for estimation methods having a functional*

significance, Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae. Ed. by Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. INRA Press, Paris, France, p. 217–221.
260. Twary S.N., Heichei G.H. (1991). Carbon costs of dinitrogen fixation associated with dry matter accumulation in alfaalfa. *Crop science*, Vol. 31, p. 985–992.
261. Vance C.P, Heichel G.H, Barnes O.K, Bryan J.W, Johnson L.E. (1979). Nitrogen fixation, nodule development, and vegetative regrowth of alfalfa (*Medicago sativa* L.) following harvest. *Plant Physiology*, Vol. 64, p. 1–8.
262. Vance C.P. (2001). Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition. Plant Nutrition in World of Declining Renewable Resouces. *Plant Physiology*, Vol. 127, p. 390–397.
263. Velazquez E., Garcia- Fraile O., Ramirez-Bahena M.H., Rivas P., Martinez-Molina E. (2010). Bacteria Involved in Nitrogen - Fixing Legume Symbiosis: Current Taxonomic Perspective***. In:*** *Microbes for Legume Improvement*. Ed. by Khan M.S. et al. Springer-Verlag, p. 535. DOI 10.1007/978-3-211-99753–6.
264. Verbruggen E., Kiers T. (2010). Evolutionary ecology of mycorrhizal functional diversity in agricultural systems. *Evolutionary Applications*, Vol. 3, p. 547–56. doi:10.1111/j.1752-4571.2010.00145.x; ISSN 1752-4571.
265. Verma D.P.S., Hu C.A., Zhang M. (1992). Root nodule development – origin, function and regulation of nodulin genes. *Physiologia Plantarum*, Vol. 85, p. 253–265.
266. Viereck N., Hansen P.E., Jakobsen I. (2004). Phosphate Pool Dynamics in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* Studied by in vivo 31P NMR Spectroscopy. *New Phytologist*, Vol. 162, No. 3, p. 783–794.
267. Vierheilig H., Coughlan A.P., Wyss U., Piché Y. (1998). Ink and Vinegar, a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. *Appl Environ Microbiol*. Vol. 64, No.12, p. 5004–5007.
268. Violi H.A., Treseder K.K., Wright S.F., Lovatt C.J. (2007). Density dependence and interspecific interactions between arbuscular mycorrhizal fungi mediated plant growth, glomalin production, and sporulation. *Can. J. Bot*., Vol.85, p. 63–75.
269. Wahab A.M., Abd-Alla M.N. (1995). Effect of form and level of applied nitrogen on nitrogenase and nitrate reductase activities in faba beans. *Biologia plantarum*, Vol. 37, p. 57–64.
270. Wamberg C., Christensen S., Jakobsen I., Muller A.K., Sørensen S.J. (2003). The mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) affects microbial activity in the rhizosphere of pea plants (*Pisum sativum*). *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 35, p. 1349–1357.
271. Wang X., Pan Q., Chen F., Yan X., Liao H. (2011). Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. *Mycorrhiza*, Vol. 21, p. 173–181.
272. Weber H., Borisjuk L., Wobus U. (2005). Molecular physiology of legume seed development. *Annu. Rev. Plant Biol*. Vol. 56, p. 253–279.
273. White J., Prell J., James E.K., Poole P. (2007). Nutrient Sharing between Symbionts. *Plant Physiology*, Vol. 144, p. 604–614. doi/10.1104/pp.107.097741.
274. Wieblo J., Kuske J., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A. (2010). The competition between *Rhizobium leguminosarum* bv.*viciae* strains progresses until late stages of symbiosis. *Plant and Soil*, Vol. 337, p. 125–135.
275. Willis A., Rodrigues B.F., Harris P.J. (2013). The Ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Crit. Reviews in Plant Science*, Vol.32, p. 1–20.
276. Wilson A.J., Robards A.W. (1978). Some observations of the effects of mechanical impedance upon the ultrastructure of the roots caps of barley. *Protoplasma*, Vol. 101, p. 61–72.
277. Wright D.P., Read D.J., Scholes J.D. (1998a). Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant Cell & Environment*, Vol. 21, p. 881–891.

278. Wright D.P., Scholes J.D., Read D.J. (1998b). Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens* L. *Plant Cell & Environment*, Vol. 21, p. 209–216.
279. Wu Q.S., Xia R.X., Zou Y.N. (2008). Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. *Eur. J. Soil Biol.*, Vol. 44, p. 122–128.
280. Xie Z., Staehelin H., Vierheilig A., Wiemken S., Jabbouri W.J., Vögeli-Lange B.R., Boller T. (1995). Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybeans. *Plant Physiol.* Vol. 108, p. 1519–1525.
281. Yang H., Zhang Q., Liu Q., Bian X., Chen X. (2015). Effect of arbuscular mycorrbizal fungi on plant growth depend on root system: a meta-analysis. *Plant and Soil*, Vol. 389, p. 2370–2378.
282. Zahran H.H. (1999). Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* Vol. 63, p. 968–989.
283. Zuanazzi J.A., Clergeot P.H., Quirion J., Husson H.P., Kondorosi A., Ratet P. (1998). Production of *Sinorhizobium meliloti nod* Gene Activator and Repressor Flavonoids from *Medicago sativa* Roots. *MPMI*, Vol. 11, No. 8, p. 784–794.
284. Zute S., Treikale O. (2015). Lauka pupas – izaicinājumi un iespējas lopbarības ražotājiem. *LLKC Demonstrējumi augkopībā un lopkopībā*, lpp. 28–30.
285. Воробьев В.А. (1998). Симбиотическая азотфиксация и температура. Новосибирск: Наука. Сиб.РАН, 128 с.
286. Гукова М.М. (1970). Условия питания бобовых растений, опредиляющие эфективность симбиоза их с клубеньковыми бактериями. *Микробиология на службе сельского хозяйства,* с. 55–64.
287. Жизневская Г.Я. (1972). Медь, молибден и Железо в азотном обмене бобовых растений. Москва, Наука, с. 336.
288. Каладжян Н.Л. Образование физиологически активных веществ клубеньковыми бактериями и их влияние на высшие растение. Автореферат, Ереван, 1970.
289. Калниньш А.Д., Класенс В.П. (1971). Эффективность нитрагинизации кормовых бобов штаммами клубеньковых бактерий различного происхождения. *LLU Raksti*, XXIXsēj., lpp. 126–135.
290. Петренко Л.Д. (1972). Ферменты дыхательной цепи активного и малоактивного штаммов клубеньковых бактерий люцерны. Автореферат, Минск.

P I E L I K U M I

1. Pielikums

Hlorofila fluorescences parametri izmēģinājumā LI_2017

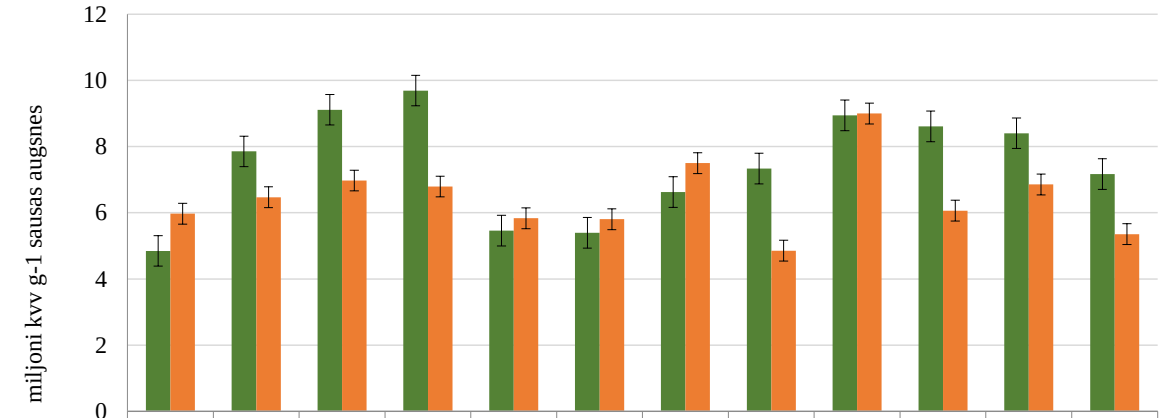
Šķirne	Variants	mēnesis	PI		Fv/Fm		Fv/Fo	
			bez M	ar M	bez M	ar M	bez M	ar M
'Lielplatone'	K	Jūnijs	2.29	2.92	0.73	0.76	2.81	3.19
		Jūlijs	1.39	1.52	0.73	0.75	2.82	3.00
	R	Jūnijs	3.09	2.74	0.75	0.75	3.07	3.04
		Jūlijs	1.34	1.47	0.73	0.73	2.80	2.81
	N	Jūnijs	1.91	2.17	0.71	0.72	2.50	2.80
		Jūlijs	1.58	1.27	0.75	0.73	2.99	2.77
'Fuego'	K	Jūnijs	0.86	0.95	0.67	0.69	2.23	2.34
		Jūlijs	5.51	4.97	0.81	0.80	4.45	4.18
	R	Jūnijs	3.08	2.52	0.75	0.72	3.16	2.75
		Jūlijs	4.43	5.58	0.77	0.81	3.86	4.38
	N	Jūnijs	1.14	1.16	0.70	0.69	2.51	2.36
		Jūlijs	4.27	5.26	0.80	0.81	4.07	4.40

Varianti:
K – kontrole bez mikroorganismu inokulāta;
R – inokulēti ar gumiņbaktēriju asociāciju;
N – kontrole ar papildu minerālā slāoekļa mēslojumu (N 10 kg ha^{-1}).
M– inokulēti ar mikorizas sēņu preparātu.

PI - Augu vitalitātes indekss
Fv/Fm - Maksimālais kvanu iznākums II fotosistēmā
Fv/Fo – II fotosistēmā efektivitāte

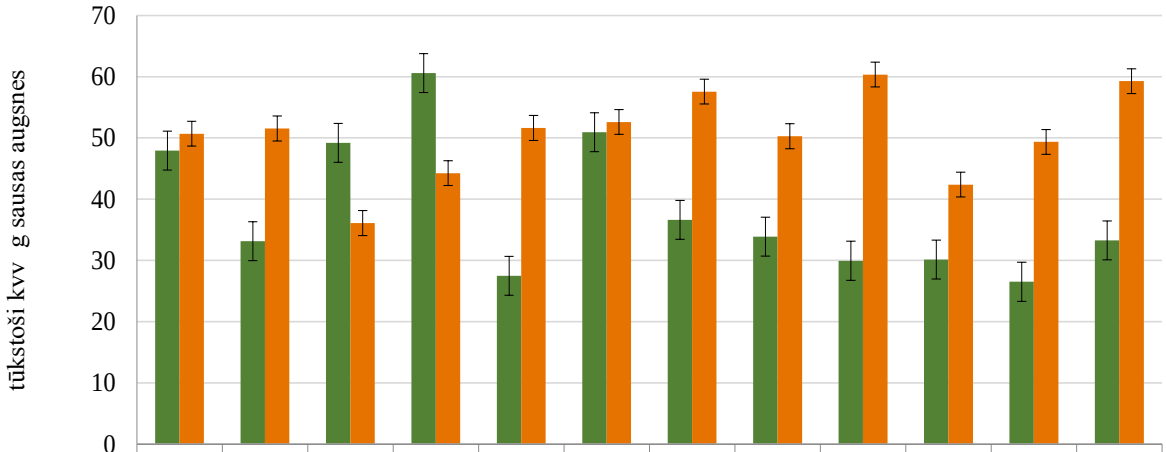
2. Pielikums

Baktēriju un mikroskopisko sēņu skaits augsnē izēģinājumā LI_2017



	K	R	M	RM	MN	KN	K	R	M	RM	MN	KN
	Fuego						Lielplatone					
ziedēšana	4.8	7.9	9.1	9.7	5.5	5.4	6.6	7.3	8.9	8.6	8.4	7.2
raža	6.0	6.5	7.0	6.8	5.8	5.8	7.5	4.9	9.0	6.1	6.9	5.4

1.att. **Baktēriju skaits augsnē izmēģinājumā LI_2017**



	K	R	M	RM	MN	KN	K	R	M	RM	MN	KN
	Fuego						Lielplatone					
ziedēšana	47.9	33.2	49.2	60.6	27.5	50.9	36.6	33.9	29.9	30.1	26.5	33.3
raža	50.7	51.5	36.1	44.2	51.6	52.6	57.6	50.3	60.3	42.4	49.3	59.3

2.att. **Mikroskopisko sēņu skaits augsnē izmēģinājumā LI_2017.**

Mikrobioloģiskā aktivitāte rizosfēras augsnē izmēģinājumā LI2016_A

	LI2016_A							
	Augsnes elpošanas intensitāte (mg CO_2 $100g^{-1}h^{-1}$)							
	K	23	407	M	23M	407M	MN	KN
'Lielplatone'	0.38	0.52	0.44	0.32	0.35	0.40	0.40	0.39
	0.23	0.54	0.51	0.34	0.32	0.28	0.44	0.27
	0.53	0.40	0.50	0.42	0.31	0.42	0.27	0.36
	0.38	0.49	0.48	0.36	0.32	0.36	0.37	0.34
'Fuego'	0.42	0.39	0.27	0.35	0.39	0.39	0.50	0.42
	0.46	0.26	0.45	0.42	0.44	0.38	0.44	0.50
	0.44	0.28	0.33	0.34	0.41	0.33	0.51	0.34
	0.44	0.31	0.35	0.37	0.41	0.36	0.48	0.42

ANOVA

Mijiearbības veids	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*p-vērtība*	*F krit*
Šķirnes	0.001	1	0.00051	0.17	0.69	4.04
Varianti	0.035	7	0.00497	1.60	0.16	2.21
Mijiedarbība	0.161	7	0.023	7.41	0.00	2.21
RS0,05	0.03	šķirnes				
RS0,05	0.06	varianti				

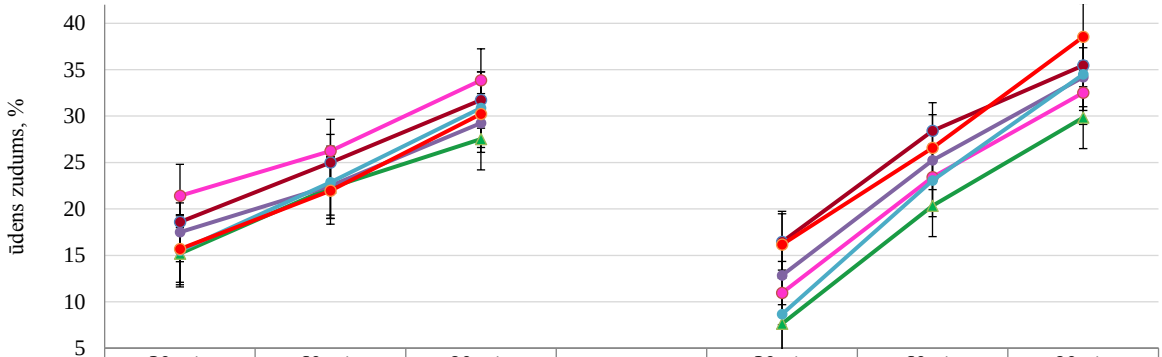
Šķirne	Mikroorganismu biomasa (µgCmikroorg $100g^{-1}$ augsnes)							
	K	23	407	M	23M	407M	MN	KN
Lielplatone	88.69	105.0	73.3	75.7	88.0	78.2	86.4	95.9
	77.02	97.2	92.4	80.1	86.1	85.5	86.7	89.3
	82.69	91.8	87.4	69.1	67.5	79.5	78.2	90.2
	82.80	98.0	84.3	75.0	80.5	81.2	83.8	91.8
Fuego	84.27	63.1	80.8	76.7	92.4	86.1	57.7	79.8
	90.89	59.0	58.0	66.2	76.3	87.4	96.8	65.3
	105.09	68.1	83.3	72.9	84.5	74.1	84.9	93.7
	93.42	63.4	74.0	71.9	84.4	82.5	79.8	79.6

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Šķirnes	579.68	1	579.676	9.49932	0.00	4.04
Varianti	1060.20	7	151.457	2.48197	0.03	2.21
Mijiedar bība	2633.73	7	376.247	6.16567	0.00	2.21
RS0,05	3.93	šķirnes				
RS0,05	7.85	varianti				

4. pielikums

Pupu lapu ūdens zaudēšanas intensitāte atkarībā no lietotās inokulātu kombinācijas

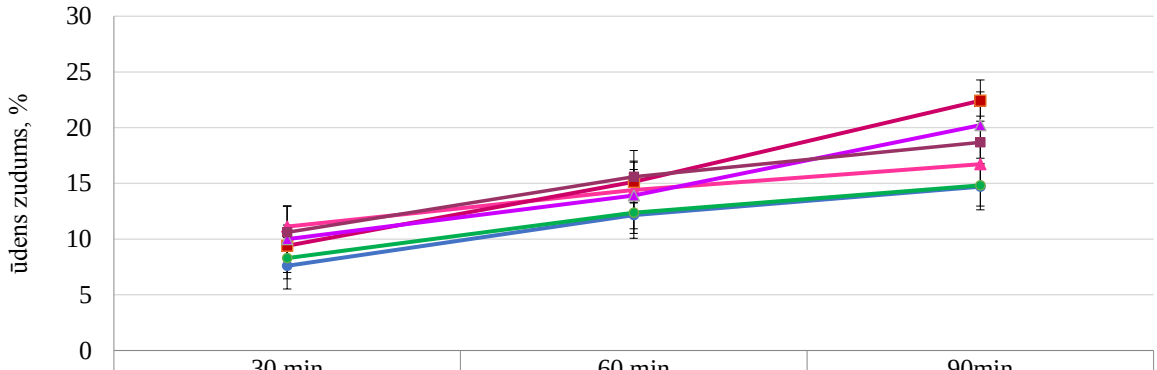


	30 min	60 min	90 min		30min	60min	90min
	Fuego				Lielplatone		
K	18.60	25.00	31.73		16.44	28.42	35.46
R	21.40	26.24	33.85		10.95	23.43	32.51
M	15.17	22.31	27.53		7.63	20.35	29.84
RM	17.50	22.49	29.25		12.85	25.24	34.19
MN	15.48	22.86	30.86		8.66	23.07	34.50
KN	15.69	21.96	30.22		16.16	26.57	38.54

p= 0.01
$RS_{0.05}$=2.29 starp inokulātu variantiem

p= 0.00002
$RS_{0.05}$=2.36 starp inokulātu variantiem

1.att. **Pupu lapu ūdens zaudēšanas intensitāte variantos ar dažādām inokulātu kombinācijām šķirnēm 'Lielplatone' un 'Fuego'.**



	30 min	60 min	90min
R1	11.1	14.4	16.7
R2	9.4	15.1	22.4
R1M	10.0	13.9	20.2
R2M	10.6	15.6	18.7
M	7.6	12.2	14.7
K	8.3	12.4	14.8

p= 0.00001, $RS_{0.05}$=1.85 starp inokulātu variantiem

2.att. **Pupu lapu ūdens zaudēšanas intensitāte variantos ar dažādām inokulātu kombinācijām.**