

Latvijas Lauksaimniecības universitāte
Latvia University of Life Sciences and Technologies
Lauksaimniecības fakultāte
Faculty of Agriculture



Mg. biol., Mg. agr. Laila Dubova
**SIMBIOTISKO ASOCIĀCIJU IETEKME UZ PUPU
(VICIA FABIA L.) PRODUKTIVITĀTI**

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

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

SUMMARY
*of the Doctoral Thesis for the Scientific Degree (Ph.D.) in Field of
Agriculture and Fisheries Sciences, Forest science*

Jelgava
2020

Darba zinātniskā vadītāja / Scientific supervisor: Dr.biol. **Ina Alsīņa**

Darba recenzenti / Reviewers:

Dr. agr. **Sanita Zute**

Dr. agr. **Ilze Skrabule**

Dr. biol. **Biruta Bankina**

Promocijas darba aizstāvēšana paredzēta Latvijas Lauksaimniecības universitātes Lauksaimniecības un zivsaimniecības zinātnes, mežzinātnes ar specializāciju “Lauksaimniecība” atklātajā sēdē 2020. gada 29. decembrī plkst. 10.00, Latvijas Lauksaimniecības universitātē, 123. auditorijā, Lielā ielā 2, Jelgavā

The defence of Thesis will held in open session of the Promotion Board in Field of Agriculture and Fisheries Sciences, Forest science with specialization “Agriculture” on December 29th, at 10.00 in room 123, Latvia University of Life Sciences and Technologies, Liela Street 2, Jelgava.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Lauksaimniecības universitātes Fundamentālajā bibliotēkā, Lielā iela 2, Jelgava.

The thesis and summary are available at the Fundamental Library of Latvia University of Life sciences and Technologies, Liela Street 2, Jelgava.

Atsauksmes lūdzu sūtīt Lauksaimniecības un zivsaimniecības zinātnes, mežzinātnes ar specializāciju “Lauksaimniecība” promocijas padomes sekretārei Dr.sc.ing. Ingrīdai Augšpolei, Lielā iela 2, Jelgava, LV-3001.

References are welcome to be sent to Dr.sc.ing. Ingrīda Augšpole, the Secretary of the Promotion Board in Field of Agriculture and Fisheries Sciences, Forest science with specialization “Agriculture”, Latvia University of Life Sciences and Technologies, Liela Street 2, Jelgava, LV-3001.

Darbs izstrādāts projektā:



Enhancing of legumes growing in Europe through sustainable cropping for protein supply for food and feed

FP7 Research Project N° 61378

Ilgspējīgu pākšaugu audzēšanas tehnoloģiju izstrāde un to izmantošanas veicināšana proteīna nodrošināšanai Eiropā pārtikas un lopbarības ražošanā.

Saturs

Contents

Ievads	4
Materiāli un metodika	6
Pupu sēklu inokulācija simbiotisko sistēmu efektivitātes novērtēšanai	
veģetācijas trauku un lauka izmēģinājumos	6
Augu veģetatīvo, bioķīmisko un ražu veidojošo parametru noteikšana	8
Modeļeksperimenti simbiotiskās sistēmas efektivitātes novērtēšanai	11
Sakņu mikorizācijas pakāpes novērtēšana	12
Datu statistiskā apstrāde	13
Rezultāti	13
Gumiņbaktēriju tīrkultūru aktivitātes salīdzinājums	13
Mikorizas sēņu sastopamība pupu sakņu sistēmā	19
Augsnes mikrobiotas un inokulātu mijiedarbība	24
Simbiotisko asociāciju izveidošanās ietekme uz pupu (<i>Vicia faba</i> L.)	
augšanu un ražu	27
Inokulācijas efekta novērtējuma kopsavilkums	41
Secinājumi	45
Promocijas darba aprobācija	72
<i>Introduction</i>	46
<i>Materials and methods</i>	48
<i>Bean seed inoculation for evaluation of efficiency of symbiotic</i>	
<i>systems in vegetation pots and field trials</i>	48
<i>Determination of vegetative, biochemical and yield-forming</i>	
<i>parameters of plants</i>	51
<i>Model experiments</i>	51
<i>Evaluation of the degree of root mycorrhization</i>	52
<i>Statistical analysis of data</i>	53
<i>Results</i>	53
<i>Comparison of the activity of pure cultures of rhizobia</i>	53
<i>Incidence of mycorrhizal fungi in bean roots</i>	57
<i>Interaction of soil microbiota and inoculum</i>	59
<i>Influence of inoculation with rhizobia and mycorrhizal fungi on</i>	
<i>bean (V. faba L.) growth and yield formation</i>	61
<i>Summary of results of inoculation experiments</i>	69
<i>Conclusions</i>	71
<i>Approbation of the scientific work</i>	72

Ievads

Tauriņzieži ir pasaulē plaši audzēti kultūraugi, kuri simbiozē ar mikroorganismiem saista atmosfēras slāpekli. Dažādos pasaules reģionos tos audzē atšķirīgā apjomā. Arī Latvijā pākšaugu audzēšanas apjoms ir mainīgs. To ietekmē ES direktīvas, kas izvirza prasības laukaugu sējplatību dažādošanai, kā arī izmaiņas audzēšanas tehnoloģijās un produkcijas realizēšanas iespējas. 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 pupas, aizvien vairāk tiek novērtēti arī no vides kvalitātes skatupunkta, jo to iekļaušana augu maiņā ne tikai samazina nepieciešamo minerālā slāpekļa patēriņu un N₂O emisiju no augsnes, ko izraisa mikrobioloģiskie procesi, bet arī uzlabo augsnes struktūru, un tas ir labs priekšausgs citiem kultūraugiem.

Pākšaugu labvēlīgā ietekme uz dažādiem vides procesiem nebūtu iespējama bez simbiotisko mikroorganismu starpniecības, kuru aktivitāti ietekmē audzēšanas tehnoloģijas. Mainoties pupu audzēšanas platībām, kā arī audzēšanas tehnoloģijām un agroklimatiskajiem apstākļiem, aktualizējas nepieciešamība intensīvāk veikt pētījumus par pupu un mikroorganismu mijiedarbību. Lauksaimniecībā lieto aizvien modernākas un intensīvākas metodes, taču vienlaikus lauksaimnieciskajai ražošanai jākļūst videi draudzīgākai, samazinot minerālmēslojuma lietošanu, bet iekļaujot bioloģiskos komponentus. Jāņem vērā kompleksa vides un cilvēka saimnieciskās darbības ietekme, jo kultūraugu raža ir atkarīga ne tikai no ģenētiski noteiktajiem ierobežojumiem un iespējām un atbilstošas agrotehnikas, bet arī no virknes vides faktoru, kas ietekmē agrocenozē esošo organismu mijiedarbību.

Promocijas darba aktualitāte

Latvijā gumiņbaktērijas tiek pētītas ilgstošā laika periodā, tomēr pētījumi norit ar svārstīgu intensitāti. Turklāt 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 tos ietekmējošos faktorus, būtu 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 *V. 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 sēkļu dubultinokulāciju ar simbiotiskajiem mikroorganismiem.

Promocijas darba hipotēze

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

Aizstāvamās 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 augs 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.

Pētījuma rezultātu aprobācija.

Par šī pētījuma rezultātiem sagatavotas 8 publikācijas, kuras indeksētas *Scopus* vai *Web of Science* datubāzēs, 3 publikācijas konferenču rakstu krājumos. Sniegti 6 mutiskie un 8 stenda ziņojumi zinātniskās konferencēs.

Materiāli un metodika

Promocijas darbs izstrādāts laika periodā no 2014. līdz 2017. gadam. 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’;
- rupjsēklu pupu *Vicia faba var. major* šķirnes ‘Karmazyn’ un ‘Bartek’.

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

Pupu sēklu inokulācija simbiotisko sistēmu efektivitātes novērtēšanai veģetācijas trauku un lauka izmēģinājumos

Gumiņbaktēriju *Rhizobium leguminosarum* L. celmu un mikorizas efektivitāte novērtēta veģetācijas trauku un lauka izmēģinājumos.

Visi lietoto gumiņbaktēriju celmi – RP003, RP023, RP110, RV407, RV505 ņemti no LLU Augsnes un augu zinātņu institūta kolekcijas. Izmēģinājumi sākti ar atsevišķiem gumiņbaktēriju celmiem vai to kombināciju ar mikorizas sēnēm, bet 2016. un 2017. gadā turpināti ar gumiņbaktēriju celmu asociācijām:

R – RP023 un RV407 baktēriju celmu asociācija,

R1 – RP003, RP023 baktēriju celmu asociācijas,

R2 – RV407, RV505 baktēriju celmu asociācijas.

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 varētu 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 (*V. faba* L.) un gumiņbaktēriju simbiozes efektivitāti, kā arī ražas veidošanos un tās kvalitāti.

Mikorizas sēņu preparāts iestrādāts augsnē vienlaikus ar sēju gan veģetācijas trauku, gan lauka izmēģinājumos. Preparāta deva 45 g m^{-2} .

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

Veģetācijas traukos izmēģinājumi iekārtoti LLU Augsnes un augu zinātņu institūta teritorijā. 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 5 pupas. Augsne izmēģinājumam ņemta no lauka, kur iepriekš nav bijuši izmēģinājumi ar gumiņbaktērijām. Veģetācijas trauki novietoti lauka apstākļos uz koka paliktņiem. 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 m².

2014. gadā izmēģinājumi iekārtoti 2. maijā, 2015. gadā – 13. maijā, 2016. gadā – 3. maijā un 13. maijā, bet 2017. gadā – 2. maijā.

Ražas uzskaitē augi novākti septembrī.

Veģetācijas traukos pildītā substrāta granulometriskais sastāvs:

2014. un 2015. gadā – smilšmāls (*loam*);

2016. gadā – viegls māls (*clay loam*);

2017. gadā – māsmilts (*loamy sand*).

Lauka izmēģinājumi

2014. gadā

LI2014_A – izmēģinājums iekārtots Ķemerose, piemājas saimniecībā. Audzētas divas šķirnes: ‘Bartek’ un ‘Karmazyn’. 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 piemājas saimniecībā Olaines novadā. Audzētas divas šķirnes: ‘Bartek’ un ‘Karmazyn’. 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 1 m 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 1 m izolācijas zonā, kurā bija iesēti ziemas kvieši. Audzētas četras šķirnes: ‘Lielplatone’, ‘Fuego’, ‘Bartek’ un ‘Karmazyn’.

LI2015_B – izmēģinājums iekārtots Jaunjelgavas novada Seces pagastā. Pupas iesētas 24. aprīlī. 50 dīgtspējīgas sēklas uz m². Katra lauciņa lielums 1 m², izmēģinājums iekārtots četros atkārtojumos. Audzētas šķirnes ‘Boxer’ un ‘Fuego’.

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

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 m².

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 9×2 m. Pupas sētas ar sējmašīnu. Izsējas norma šķirnei ‘Lielplatone’ un šķirnei ‘Fuego’ 45 sēklas uz m². Kad pupām bija pirmā īstā lapa, izmēģinājuma variantos ar papildus slāpekļa mēslojumu (kontrolē (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.

Augu veģetatīvo, bioķīmisko un ražu veidojošo parametru noteikšana

Veģētācijas trauku un lauka izmēģinājumos augu veģetatīvie parametri pirmoreiz mērīti 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 (AS 85–88). Augu un augsnes analīzēm lietotās metodes apkopotas 1. tabulā.

1. tabula / Table 1

Darbā analizētie parametri un lietotās metodes / Parameters analyzed in the work and used methods

Analizētais materiāls / Materials	Analizētais parametrs / Parameters	Parametra vērtība / Value	Metode un/vai iekārta / Method's / equipment's
Augu materiāls / Plant materials	Auga garums / plant length	cm	-
	Auga masa / plant weight	g	-
	Sausne / Dry weight	mg g ⁻¹	60 °C
	Ūdens aiztures spēja / Water retention capacity	Zaudētais ūdens / losed water, %	Ārlanda metode/ Arland's method

1.tabulas turpinājums / continuation of the Table 1

Analizētais materiāls / <i>Materials</i>	Analizētais parametrs / <i>Parameters</i>	Parametra vērtība / <i>Value</i>	Metode un /vai Iekārta / <i>Method's / equipment's</i>
Augu materiāls / <i>Plant materials</i>	Pigmentu daudzums lapās / <i>content of pigments</i>	Hlorofila daudzums nosacītās vienības / <i>chlorophyll amount in units</i>	<i>At Leaf</i> hlorofilametr / <i>Chorophyll meter At Leaf</i>
		mg g ⁻¹	spektrofotometrs Schimadzu UV1800 / <i>spectrophotometer Schimadzu UV1800</i>
	Hlorofila fluorescence / <i>chlorophyll's fluorescence</i>	PI, Fv/Fm	Hlorofila fluorometrs OS5p+ (Opti-Science ^{LTD}) / <i>Chlorophyll fluorometer OS5p+ (Opti-Science^{LTD})</i>
	100 gumiņu masa / <i>weight of 100 nodules</i>	g	Tampakaki et al., 2014
	100 gumiņu sausna / <i>dry weight of 100 nodules</i>	mg g ⁻¹	
	Dehidrogenāžu aktivitāte gumiņos / <i>activity of dehydrogenases</i>	μg formazāna g ⁻¹ sausnes / <i>μg formazane g⁻¹ of dry matter</i>	Kaimi et al. 2007
Sēklu eksudātu šķīdums / <i>seeds exudate</i>	flavonoīdu kvalitatīvais saturs / <i>content of flavonoids</i>	-	HPLC
	flavonoīdu kvantitatīvais saturs / <i>composition of flavonoids</i>	μg kvercetína ekvivalentu (QE) mL šķīduma / <i>μg quercetine in mL solution</i>	Robaszkieiewicz et al. (2010)

1.tabulas turpinājums / continuation of the Table 1

Analizētais materiāls / Materials	Analizētais parametrs / Parameters	Parametra vērtība/ Value	Metode un/vai iekārta / Method's/ equipment's
Augu materiāls / Plant materials	mikorizas sēņu sastopamība sakņu sistēmā / <i>Frequency of mycorrhiza in the root system</i>	F%	Trouvelot et al. (1986)
	mikorizas kolonizācijas intensitāte sakņu sistēmā / <i>Intensity of mycorrhizal colonization in the root system</i>	M%	
	arbuskulu daudzums sakņu sistēmā / <i>Arbuscules abundance in the root system</i>	A%	
	kopproteīna saturs lakstos un sēklās / <i>content of protein in shoots and seeds</i>	%	Kjeldāla metode / Kjeldal, s method
	pākstu skaits / <i>number of pods</i>	gab	-
	pākstu masa / <i>weight of pods</i>	g	-
	100 sēklu masa / <i>100 seeds weight</i>	g	-
Augsne / soil	Elpošanas intensitāte / <i>intensity of respiration</i>	mg CO ₂ g ⁻¹ sausas augsnes h ⁻¹ / mg CO ₂ g ⁻¹ dry matter h ⁻¹	Microbiological Methods for Assessing Soil Quality, 2005
	Dehidrogenāžu aktivitāte / <i>activity of dehydrogenases</i>	µg formazāna 100g ⁻¹ sausas	Kaimi et al. 200
	Mikroorganismu biomasa / <i>biomass of microorganisms</i>	mg C _{mikroorg.} kg ⁻¹ sausas augsnes / mg C _{mikroorg.} kg ⁻¹ dry soil	LVS ISO 14240 1:1997
	Kopējais baktēriju skaits / <i>number of bacteria</i>	kvv g ⁻¹ sausas augsnes cfu g ⁻¹ dry soil	Peptona barotne / <i>Nutrient media (Scharlau LTD)</i>
	Mikroskopisko sēņu skaits / <i>number of fungi</i>		Čapeka barotne / <i>Czapek media (Scharlau LTD)</i>
Gumiņbaktēriju skaits / <i>number of Rhizobia</i>	Rauga-mannīta barotne / <i>Yeast-mannitol media</i>		

Modeļeksperimenti simbiotiskās sistēmas efektivitātes novērtēšanai

Modeļeksperimenti (ME) atkarībā no pētāmā parametra iekārtoti siltumnīcā vai fitokamerā kontrolētos apstākļos.

Temperatūras un mikrosimbiontu ietekme uz flavonoīdu sintēzi dīgstošās pupu sēklās (ME_A). Izmēģinājums iekārtots Petri platēs, dziedējot sēklas tumsā četros temperatūras režīmos: 4, 8, 12 un 20 °C. Sēklu inokulēšana veikta ar vairākām simbiontu kombinācijām: 1) gumiņbaktēriju celmu RP023 un RV407 maisījums (R), 2) mikorizas sēņu preparāts (M), 3) dubultinokulācija (RM). Kontroles variantā sēklas dziedētas ūdenī. Katrs variants četros atkārtojumos. Analizēts flavonoīdu kvalitatīvais un kvantitatīvais sastāvs sēklu eksudātu šķīdumā.

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 iekārtots fitokamerā ar gaisa temperatūru:

pirmās 28 dienas naktī +5 °C, dienā + 15 °C;

29.–36. dienā naktī +7 °C, dienā + 17 °C;

37.–40. dienā 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’.

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 platēm iestādīti 3 litru veģetācijas traukos sterilā vermikulītā. Augšanas laikā augi laistīti ar barības šķīdumu. Barības šķīdums gatavots no Kristalona-3 (N-P₂O₅-K₂O 6-24-36), to 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 sausne.

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. Pirmoreiz izmēģinājums iekārtots 2014. gada rudenī veģetācijas traukos (7 varianti piecos atkārtojumos), kur iepriekš augušas pupas, otro reizi – 2017. gada pavasarī veģetācijas traukos (septiņi varianti trīs atkārtojumos), kur 2016. gada veģetācijas periodā bija

augušas pupas. Izmēģinājumi siltumnīcā beigti augu ziedēšanas fāzē. Pirmajā gadā audzēta šķirne 'Bartek'. Otrajā gadā audzēta šķirne 'Lielplatone'.

Otrais izmēģinājums siltumnīcā (ME_D) iekārtots ar sīpoliem, audzējot tos pēc rupjsēklu pupām 'Bartek'. Izmēģinājums pēc vienādas shēmas veikts divus gadus. Pirmoreiz izmēģinājums ar sīpoliem iekārtots 2015. gada februārī, otro reizi – 2016. gada aprīlī, veģetācijas traukos bija augušas inokulētas pupas. 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.

Sakņu mikorizācijas pakāpes novērtēšana

Mikorizas sēņu sastopamības novērtēšanai saknes pēc augu izrakšanas noskalotas un turpmākajām analizēm savākti 1–3 cm gari paraugi no sakņu galiem. Savāktie sakņu paraugi attīrīti un sagatavoti krāsošanai, karsējot 10% KOH šķīdumā 90 °C temperatūrā 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. Nokrāsotās saknes skalotas 2% sālskābes šķīdumā 15–25 minūtes un sagatavotas mikroskopēšanai vai uzglabātas glicerīna, pienskābes un destilēta ūdens maisījumā (1:1:1). Mikroskopēti 1 cm gari sakņu fragmenti ar 10× palielinājuma objektīvu, katru saknes fragmentu apskatot sešos redzeslaukos. Katram izmēģinājuma variantam mikroskopēti 30 sakņu fragmenti (180 redzeslauki). Sakņu fragmentos novērtēta mikorizas sēņu struktūru sastopamība, un atbilstoši novērtējumam pēc datorprogrammas MYCOCALC formulām izrēķināta mikorizas frekvence jeb sēņu struktūru sastopamība sakņu sistēmā (F%), mikorizas kolonizācijas intensitāte sakņu fragmentos (m%), mikorizas intensitāte sakņu sistēmā (M%), arbuskulu sastopamība pētītajos paraugos (a%) un arbuskulu daudzums visā sakņu sistēmā (A%).

Augsnes mikroorganismu skaita un aktivitātes novērtēšanai augsne ievākta pupu ziedēšanas laikā un veģetācijas perioda beigās vienlaikus ar augu analizēm. Līdz analizēm augsne uzglabāta +4 °C temperatūrā.

Mikroorganismu skaits rēķināts kā vidējā svērtā vērtība no diviem secīgiem atšķaidījumiem (katrs trīs atkātojumos).

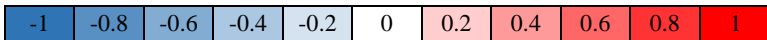
Visas augsnes mikrobioloģiskās analīzes un mikrobioloģiskās aktivitātes analīzē izteiktas uz sausas augsnes masas vienību. Augsne žāvēta 105 °C temperatūrā 24 stundas.

Datu statistiskā analīze

Inokulācijas variantu un veģetatīvo parametru sakarību būtiskuma novērtēšanai lietota datu matemātiskā apstrāde un 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).

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. Koeficientiem atbilstošās krāsas redzamas 1. attēlā.



1. att. **Krāsu kartes skala** / Fig. 1. *Colour chart scale*

Kontrolei krāsu kartē atbilst 0 /

Control in the colour map corresponds to 0

REZULTĀTI

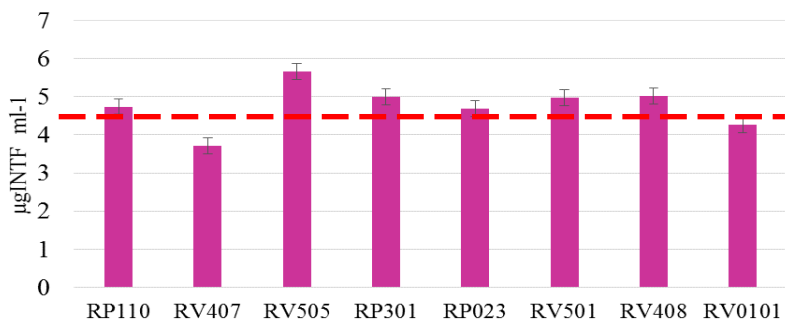
Gumiņbaktēriju tīrkultūru aktivitātes salīdzinājums

Gumiņbaktēriju celmi izmēģinājumu iekārtošanai no LLU Lauksaimniecības fakultātes gumiņbaktēriju kolekcijas izvēlēti, vadoties pēc 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. Tomēr, mainoties audzēto pupu šķirnēm, pielietotajiem agrotehniskajiem paņēmieniem un klimatiskajiem apstākļiem, pētījumi par gumiņbaktēriju un pākšaugu mijiedarbību un efektīvu simbiozi, joprojām nav zaudējuši savu aktualitāti ne tikai Latvijā, bet arī pasaulē. Vairāk uzmanības tiek veltīts bioķīmiskajiem faktoriem, kas nosaka simbiozes veidošanos, vērtējot gan mikroorganismu, gan saimniekaugu lomu mijiedarbības veidošanā

Gumiņbaktēriju efektivitāte, reducējot molekulāro slāpekli līdz amonija jonam, ir atkarīga no pilnvērtīgas enzimatiskās darbības šūnās. Simbiozes veidošanās ir energoietilpīgs process, tāpēc trikarbonskābju cikla aktivitāti saistīta ar simbiotisko efektivitāti. Dažādu bioķīmisko procesu norises intensitāte ir viens no veidiem, kā novērtēt gumiņbaktēriju aktivitāti un efektivitāti. Dehidrogenāzes piedalās virknē bioķīmisko reakciju, kas notiek

gumiņos, tāpēc tā ir viena no enzīmu grupām, kura raksturo procesu intensitāti gumiņā.

Atšķirīga dehidrogenāžu aktivitāte konstatēta arī LLU LF gumiņbaktēriju kolekcijā esošajām baktēriju celmu tīrkultūrām (2. att.). Dehidrogenāžu aktivitāte baktēriju suspensijā salīdzināta 48 h pēc pārsēšanas jaunā barotnē.



2. att. **Dehidrogenāžu aktivitāte baktēriju tīrkultūru suspensijā /**
Fig. 2. Dehydrogenase activity in pure bacterial culture suspension
(--- vidējā aktivitāte / average activity)

Gumiņbaktēriju celmiem RP101, RV407 dehidrogenāžu aktivitāte bija zemāka par vidējo vērtību. Aktīvu enzimatisko darbību gumiņos saista ar efektīvāku molekulārā slāpekļa reducēšanu un, reducētā slāpekļa savienojumu transportu no gumiņiem uz saimniekaugu.

Gumiņbaktēriju celmu aktivitāte pārbaudīta uz augiem, audzējot inokulētas sēklas sterilā smiltī. Salīdzinot izveidoto gumiņu lielumu, nevarēja konstatēt ciešu korelāciju ar tīrkultūru dehidrogenāžu aktivitāti. Visi pārbaudītie gumiņbaktēriju celmi uz pupu saknēm neveidoja vienlīdz lielus gumiņus. Mazākie bija ar RV501 un RP023, 100 gumiņu masa attiecīgi 3.02 un 3.44 g. Kaut arī RP023 V. Klāsenā (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 gumiņbaktēriju celmiem lielākajos gumiņos būs augstāka dehidrogenāžu aktivitāte. Gumiņbaktēriju celms RV505, kuram bija augstākā dehidrogenāžu aktivitāte, veidoja vidēji lielus gumiņus (100 gumiņi 4.97 g), bet lielākie gumiņi bija celmam RP110 (7.44 g).

Gumiņbaktēriju celmu salīdzināšana turpināta nesterilos apstākļos. Gumiņbaktēriju celmu RP023, RV301, RV407 un RV501 simbiozes veidošanās un gumiņu parametri salīdzināti arī veģetācijas trauku

izmēģinājumā siltumnīcā kontrolētos apstākļos pupām 'Bartek'. Pupas audzētas siltumnīcā veģetācijas traukos, līdz sāk veidoties ziedpumpuri. Nosakot 100 gumiņu masu, gumiņu sausi un dehidrogenāžu aktivitāti, konstatēts, ka lielākās atšķirības pastāv starp izveidoto 100 gumiņu masu. Lielākos gumiņus izveidoja celms RP023 (8.98 g), bet mazākie izveidotie gumiņi bija celmam RV407 (2.52 g). Sausnes saturs svārstījās no 20.1% līdz 21.4%. Augstākā dehidrogenāzes aktivitāte (DHA) bija celmam RV501 ($16.1 \mu\text{g INTF mL}^{-1}$). Vidēji cieša korelācija ($r=0.69 > r_{0.05,60} = 0.25$) starp gumiņu masu un dehidrogenāžu aktivitāti.

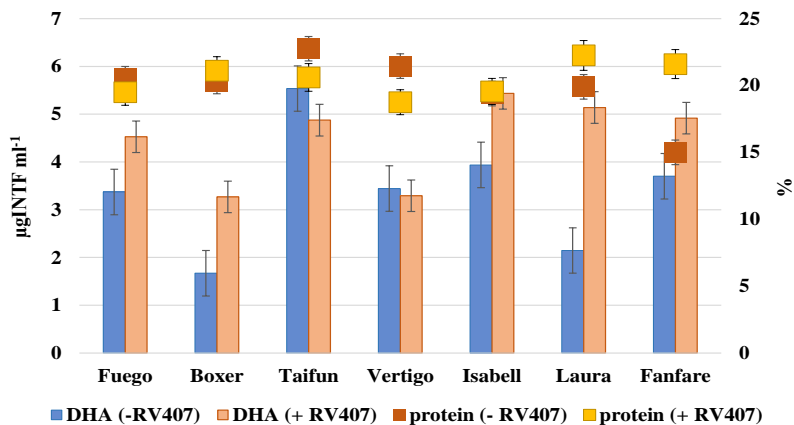
Gumiņbaktērijas RP407 visos izmēģinājumos neuzrādīja vislabākos rezultātus, bet bija starp labākajiem, kuri izdalīti no gumiņiem uz pupu saknēm, tāpēc vairumā gadījumu šis celms tika izmantots pupu sēklu inokulēšanā.

Salīdzinot gumiņu veidošanos veģetācijas trauku un lauka izmēģinājumos, 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 augsnē dabīgi esošā mikroorganismu populācija un gumiņbaktēriju konkurētspēja.

Gumiņu masa un dehidrogenāžu aktivitāte gumiņos novērtēta arī lauka izmēģinājumos vairākām pupu šķirnēm ('Laura', 'Fanfare', 'Boxer', 'Isabell', 'Taifun', 'Vertigo', 'Fuego'), kuras inokulētas ar gumiņbaktēriju RV407.

Vidēji cieša korelācija bija starp gumiņu masu un dehidrogenāžu aktivitāti. 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 $r=0.62 > r_{0.05,70} = 0.23$.

Efektīvas simbiozes gadījumā augā var sintezēties vairāk proteīna. Analizētajām lauka pupu šķirnēm atkarībā no inokulāta varianta bija atšķirīgs proteīna daudzums lakstos. Starp analizētajām pupu šķirnēm proteīna saturs būtiski neatšķīrās, bet tas atšķīrās starp inokulētajiem un neinokulētajiem variantiem (3. att.). Būtiski lielāks proteīna saturs bija inokulētajiem augiem no šķirnēm 'Laura' un 'Fanfare' ($RS0.05 = 1.72$). Inokulētajiem augiem no šīm abām šķirnēm gumiņos tika novērota augstāka dehidrogenāžu aktivitāte. Šķirnēm 'Boxer' un 'Isabell' inokulēto augu gumiņos dehidrogenāžu aktivitāte bija augstāka, tomēr proteīna daudzums lakstos neatšķīrās no neinokulētajiem augiem. Tikai šķirnēm 'Taifun' un 'Vertigo' inokulētajos augos gan bija zemāka dehidrogenāžu aktivitāte, gan uzkrājās mazāks proteīna daudzums. Abām šķirnēm bija izveidojušies mazāki gumiņi, kas ļauj secināt, ka šīm šķirnēm sēklu inokulēšanā nebija lietots piemērots gumiņbaktēriju celms.

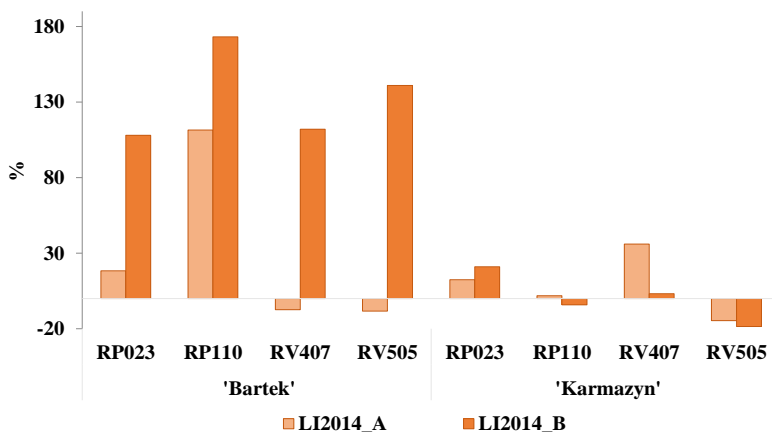


3. att. Inokulācijas ietekme uz dehidrogenāžu aktivitāti gumiņos un proteīna saturs (%) lakstos /

Fig. 3. The influence of inoculation on dehydrogenase activity in nodule and protein content (%) in shoots

Lielāka atšķirība starp izveidotajiem gumiņiem konstatēta lauka izmēģinājumos, kur inokulācijā lietotās baktērijas konkurē ar dabīgo augsnes mikrobiotu. Lokālā gumiņbaktēriju populācija var veidoties no celmiem ar atšķirīgu genoma struktūru, fizioloģiskajām īpašībām un slāpekļa saistīšanas efektivitāti.

Par audzēšanas vietas ietekmi uz gumiņbaktēriju aktivitāti varēja pārliecināties izmēģinājumā 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 rasties labvēlīgāki apstākļi simbiozes veidošanai, jo nepiemēroti augsnes apstākļi var izmainīt auga saknes izdalīto metabolītu sastāvu, kas var ierobežot gumiņbaktēriju aktivitāti. Podzolētā 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 (4. 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, savukārt šķirnei ‘Karmazyn’ – RP023 un RV407. Variantos ar baktēriju celmu RP023 gumiņu masa bija lielāka nekā izmēģinājumā, kurā inokulētie augi audzēti sterilā smiltī, kur 100 gumiņu masa celmam RP023 bija 3.44 g, bet celmam RV407 – 5.37 g.



4. att. 100 gumiņu masa izteikta % pret kontroles varianta gumiņu masu 2014. gada izmēģinājumos LI2014_A un LI2014_B /

Fig. 4. Weight of 100 nodules expressed as % of the weight of control in 2014 trials LI2014_A and LI2014_B

Mijiedarbību starp dažādiem simbiotiem ietekmē vides faktori. Viens no būtiskākajiem ir vides temperatūra simbiozes veidošanās laikā. Ne tikai inokulējot sēklas ar gumiņbaktērijām, bet arī, veicot dubultinokulāciju ar mikorizas sēnēm, konstatēta temperatūras ietekme uz dīglsaknes augšanu un veidotajiem eksudātiem. Šiem bioķīmiskajiem signāliem ir būtiska loma simbiozes veidošanās procesā. Diedzējot sēklas dažādās temperatūrās, konstatēta atšķirīga dīglsaknes augšana, kas varēja ietekmēt arī flavonoīdu kā vienu no galvenajām bioķīmisko signālu grupām sintēzi un eksudāciju. Diedzējot inokulētas sēklas, mainās flavonoīdu sastāvs. Mikrosimbiontu klātbūtne 77% gadījumu samazināja flavonoīdu koncentrāciju. Būtiskākā ietekme novērota 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.

Turpinot pupas audzēt veģetācijas traukos siltumnīcas apstākļos, līdz ziedēšanas sākumam (BCHH 50–53) rezultāti neuzrādīja statistiski būtisku atšķirību sakņu un dzinumumu svaigai masai un sausnei. Novērojama tikai tendence, ka inokulētie augi salīdzinājumā ar neinokulētajiem augiem veido lielāku virszemes daļas masu. Lielākā virszemes daļu un sakņu attiecība konstatēta ar mikorizas sēņu preparātu inokulētajiem augiem.

2. tabula / Table 2

**Vidējais flavonoīdu daudzums (mg CE mL⁻¹) dīgstošo sēklu eksudātā /
Average amount of flavonoides (mg CE mL⁻¹) in the exudate of germinated
seeds**

Diedzēšanas t / Temperature of germination, °C	Inokulācijas variants / Variant of inoculation	<i>Vicia faba</i> var. <i>major</i>		<i>Vicia faba</i> var. <i>minor</i>	
		‘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 ($p > 0.05$), $RS_{0.05} = 0.075$ /

Values in one column and at one germination temperature with different letters indicate a significant difference ($p > 0.05$), $RS_{0.05} = 0.075$

Šajos inokulācijas variantos vidējā sakņu un dzinumumu 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.

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.

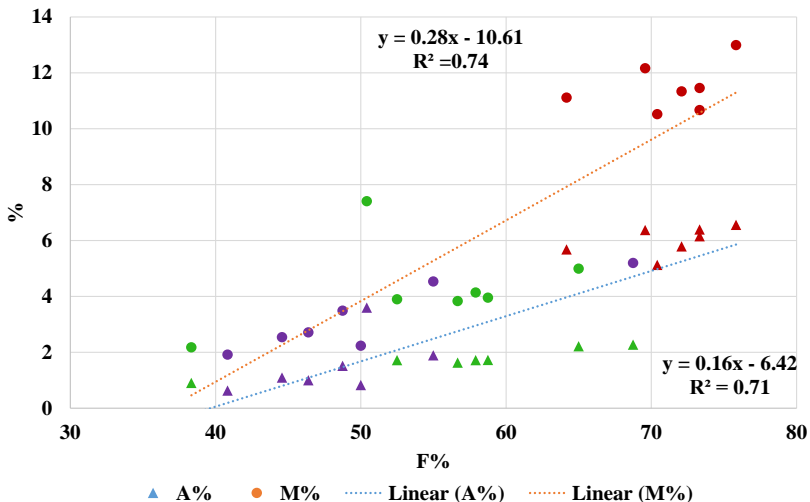
Inokulējot pupu sēklas ar gumiņbaktēriju celmiem RP023, RV301, RV407 un RV501, nevienu no baktēriju celmiem nevar atzīt par piemērotu visām izmantotajām šķirnēm jebkurā augsnes tipā. Tāpēc lietderīgi veidot vairāku baktēriju celmu asociācijas, arī lietojot tās dubultinokulācijā kopā ar mikorizas sēnēm.

Mikorizas sēņu sastopamība pupu sakņu sistēmā

Tauriņzieži, tai skaitā pupas, ir augi, kas veido simbiozi gan ar gumiņbaktērijām, gan mikorizas sēnēm. 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 dažādos izmēģinājumu laukos un inokulācijas variantos, var novērot atšķirīgu mikorizas sēņu sastopamību un mikorizācijas intensitāti. Pat viena varianta ietvaros ievāktajiem paraugiem varēja novērot gan sakņu paraugus, kuros nav konstatējamas sēņu hifas, gan intensīvi mikorizētus sakņu fragmentus. Augstāka sakņu mikorizācijas pakāpe bija augiem, kuru sēklas inokulētas ar mikorizas sēņu preparātu, bet nedaudz zemāka pakāpe novērota, inokulējot sēklas ar gumiņbaktērijām. Neinokulētos augus papildus mēslojot ar minerālo slāpekli, tikai atsevišķos gadījumos varēja novērot augstāku mikorizācijas pakāpi. Efektīvas mikorizas veidošanai nepieciešams, lai saknēs ne tikai būtu sastopamas sēņu hifas, bet arī veidotos arbuskuli. Novērtējot mikorizācijas raksturojošo parametru kopsakarību, var secināt, ka intensīvas mikorizācijas gadījumā ne vienmēr intensīvi veidojas arbuskuli. Kā norāda determinācijas koeficients ($R^2=0.49$), mikorizas sēnēm kolonizējot auga saknes, tikai 49% gadījumu intensīvi veidojas arī arbuskuli. Arbuskulu veidošanos var ietekmēt arī auga un mikorizas sēnes mijiedarbība.

Atšķirīgu mikorizācijas pakāpi varēja novērot, salīdzinot mikorizas sēņu sastopamību pupu saknēs šķirnēm 'Lielplatone', 'Fuego' un 'Bartek', kas audzētas vienādos apstākļos (5. att.).

Augstākā mikorizas sēņu sastopamība sakņu sistēmā bija šķirnei 'Lielplatone'. Atšķirība starp šķirnēm ir statistiski būtiska ($P=0.00014$, $RS_{0,05}=6.43$). Arī augstāka arbuskulu sastopamība sakņu fragmentos tika novērota 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. Rezultāti norāda, ka mikorizas sēņu ieviešanās sakņu sistēmā ir atkarīga no pupu šķirnes.



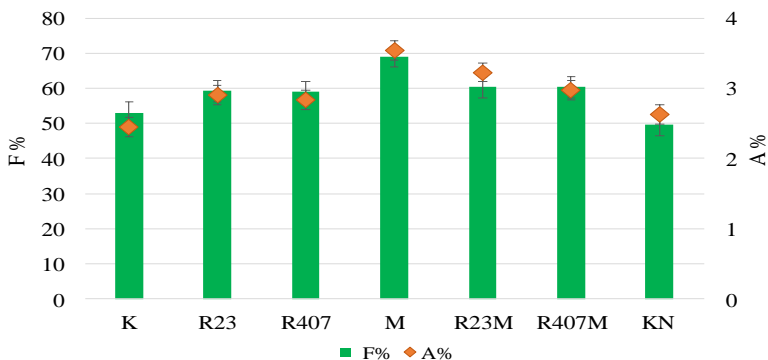
5. att. Mikorizas sēņu kolonizācijas intensitāte sakņu sistēmā (M %) un arbuskulu daudzums pupu sakņu sistēmā (A %) attiecībā pret mikorizu sastopamību sakņu sistēmā (F %) šķirnēm 'Lielplatone', 'Fuego' un 'Bartek' lauku izmēģinājumos 2015. gadā (n=1380 sakņu fragmenti) / Fig. 5. Colonization intensity of mycorrhizal fungi in the root system (M %) and number of arbuscules in the bean root system (A %) in relation to the incidence of mycorrhiza in the root system (F %) for cv. 'Lielplatone', 'Fuego' and 'Bartek' in field trials in 2015 (n=1380 root fragments).

Marķieru krāsa atbilst šķirnēm / Colour of markers:

■ '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.

Apkopojot LI_2015 izmēģinājuma rezultātus, starp kontroles variantu un variantu, kur sēklas inokulētas ar mikorizas sēņu preparātu, būtiska ($p = 0.035$) atšķirība gan mikorizas struktūru sastopamībā sakņu sistēmā, gan arbuskulu veidošanās intensitātē (A%) netika novērota. Pupu sēklu inokulēšana ar gumiņbaktērijām un dubultinokulēšana bija palielinājusi mikorizācijas pakāpi un arbuskulu veidošanos, bet atšķirība no kontroles nebija statistiski būtiska. Dubultinokulēšanas variantos arbuskuli veidojās nedaudz vairāk nekā variantos tikai ar gumiņbaktērijām (6. att.).

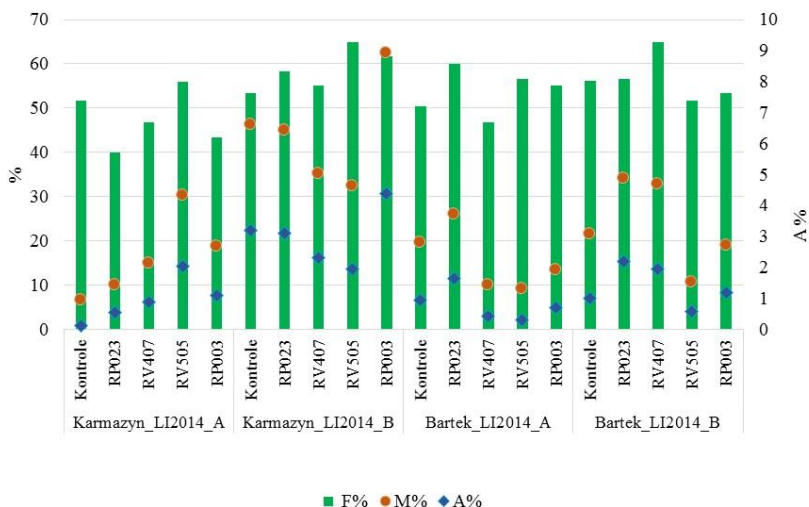


6. att. Mikorizas sēņu struktūru sastopamība (F%) un arbuskulu biežums (A%) pupu sakņu sistēmā dažādos sēkļu inokulācijas variantos lauku izmēģinājumos 2015. gadā /

Fig. 6. Frequency of mycorrhizal fungal structures (F%) and frequency of arbuscules (A%) in the bean root system in different seed inoculation variants in field trials in 2015

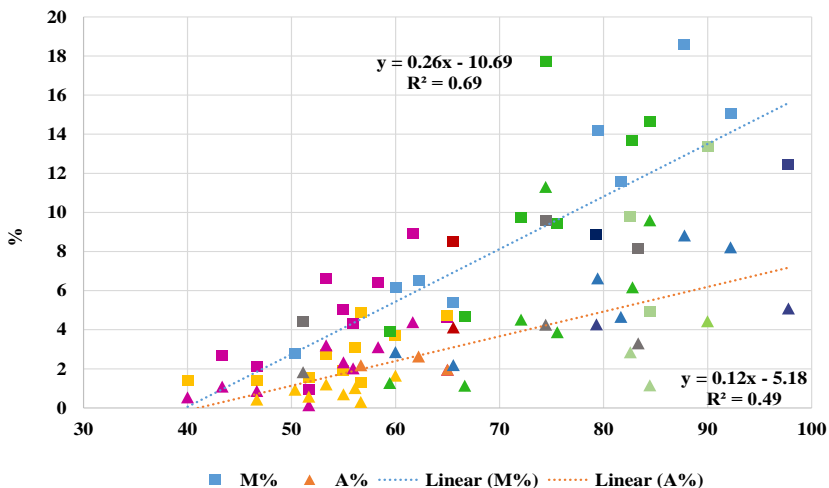
Salīdzinot mikorizas sēņu sastopamību šķirņu ‘Karmazyn’ un ‘Bartek’ saknēs, noteikts, ka šķirnei ‘Karmazyn’ pastāv būtiska atšķirība starp mikorizācijas pakāpi dažādās audzēšanas vietās (7. att.). Ķemeru trūdaini kūdrainā glejaugsnē augošajām pupām mikorizas sastopamība saknēs ir zemāka nekā tām, kas audzētas Vaivados velēnu podzolaugsnē. Statistiski būtiski atšķirās gan mikorizas sastopamības biežums sakņu sistēmā ($p=0.025$), gan arbuskulu sastopamības biežums ($p=0.031$). Novērtējot inokulācijas ar gumiņbaktērijiem 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. Augstāka arbuskulu sastopamības intensitāte saknēs bija 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.



7. att. Mikorizu struktūru sastopamība sakņu sistēmā (F%), sakņu kolonizācijas intensitāte sistēmā (M%) un arbuskulu daudzums pupu sakņu sistēmā (A%) ar dažādiem gumiņbaktēriju celmiem inokulētām pupām ‘Karmazyn’ un ‘Bartek’ izmēģinājumos LI2014A_A un LI2014_B / Fig. 7. Occurrence of mycorrhizal structures (F%), colonisation frequency (M%) and abundance of arbuscules (A%) in the roots of cv. ‘Karmazyn’ and ‘Bartek’ inoculated with different bacterial strains in experiment LI2014_A (muddy peat soil) and in experiment LI2014_B (loamy fine sand)

Atšķirīga sakņu mikorizācijas pakāpe konstatēta ne tikai augsnēs ar dažādām īpašībām, bet arī starp abām pupu grupām: rupjsēklu un sīksēklu pupām (8. att.). Mikoriza izteiktāk veidojās sīksēklu šķirnēm. Rupjsēklu šķirnēm ‘Bartek’ un ‘Karmazyn’ mikorizas sēņu struktūru sastopamība un arbuskulu veidošanās bija mazāk izteikta.



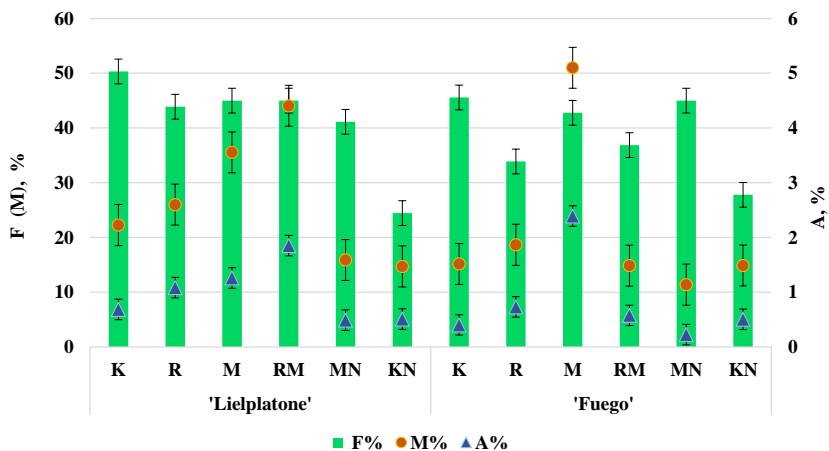
8. att. Mikorizas sēņu iedzīvošanās intensitātes (F%) un sēņu struktūrelementu (M%) un arbuskulu (A%) sastopamības korelācija pupu saknēs dažādās audzēšanas vietās 2015. gadā (n-2610 sakņu fragmenti) / Fig. 8. Correlation between mycorrhizal colonization intensity (F%) and the occurrence of fungal structural elements (M%) and arbuscules (A%) in bean roots at different growing sites in 2015 (n-2610 root fragments)

Marķiera krāsa / colour of marker

■ 'Karmazyn'	■ 'Boxer'
■ 'Bartek'	■ 'Albus'
■ 'Fuego'	■ 'Alexia'
	■ 'Laura'

Inokulējot pupu sēklas ar atsevišķiem (RP023 vai RV407) gumiņbaktēriju celmiem, tika novērota atšķirīga mikorizācijas intensitāte un arbuskulu veidošanās gan veģetācijas trauku, gan lauka izmēģinājumos. Tāpēc 2017. gadā lauka izmēģinājumos pupas bija inokulētas ar divu gumiņbaktēriju celmu kombināciju (RP023 un RV407). Pupu sēklu inokulēšanas ietekme vairāk izpaudās šķirnei 'Lielplatone' (9. 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.



9. att. Mikorizas sēņu sastopamība šķirnēm 'Lielplatone' un 'Fuego' izmēģinājumā LI2017 /

Fig. 9. Occurrence of mycorrhizal fungi in cultivars 'Lielplatone' and 'Fuego' in experiment LI2017

F% – mikorizu struktūru sastopamības intensitāte / intensity of mycorrhizal structures;
 M% – kolonizācijas intensitāte sakņu sistēmā / colonisation frequency;
 A% – arbuskulu sastopamība sakņu sistēmā / abundance of arbuscules

Mikorizas sēņu struktūru veidošanās ietekme uz pupu sēkļu ražu un kvalitāti bija atšķirīga dažādu grupu pupām. Intensīvāka arbuskulu veidošanās paaugstināja proteīna saturu sēklās šķirnei 'Lielplatone', bet rupjsēkļu šķirnēm arbuskulu daudzums proteīna saturu sēklās neietekmēja. Rupjsēkļu šķirnēm mikorizas sēņu struktūras pupu saknēs bija retāk sastopamas.

Augsnes mikrobiotas un inokulātu mijiedarbība

Auga un mikroorganismu simbiotisko attiecību veidošanos var ietekmēt rizoferas 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. Aktīvi inokulāta mikroorganismi, mijiedarbojoties ar saimniekaugu, var izmainīt vides piemērotību, kāda ir rizoferas mikrobiotas grupai, kā arī baktēriju un mikroskopisko sēņu attiecību.

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,

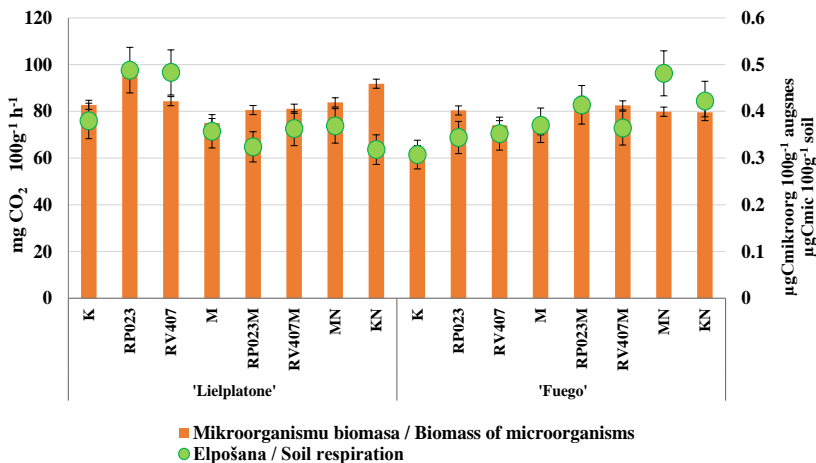
sakņu sistēma atrodas ierobežotā tilpumā. Tāpēc var novērot krasākas atšķirības kopējā aerobo baktēriju un mikroskopisko sēņu skaita izmaiņās dažādos inokulācijas variantos. Salīdzinot abu veģetācijas gadu rezultātus, varēja secināt, ka tikai gumiņbaktēriju variantā RP023 baktēriju skaits palielinājās. 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 izmaiņas varēja ietekmēt sakņu izdalījumi, kuru sastāvs var mainīties no auga fizioloģiskā stāvokļa.

Par atšķirīgu inokulācijā lietoto asociāciju mijiedarbību ar augsnes mikroorganismiem un augu saknēm varēja pārliecināties izmēģinājumā VT2017 ar pupām 'Bartek'. Baktēriju skaits variantā, kurā sēklas inokulētas ar mikorizas sēnēm ($5.30 \cdot 10^6$ kvv g sausas augsnes) un dubultinokulācijas variantā ($4.61 \cdot 10^6$ kvv) bija augstāks nekā tikai ar gumiņbaktērijām ($3.74 \cdot 10^6$ kvv g sausas augsnes). Arī augstākais mikroskopisko sēņu skaits bija variantā ar mikorizas sēnēm ($2.9 \cdot 10^4$ kvv g sausas augsnes), bet zemākais variantā ar gumiņbaktērijām ($1.41 \cdot 10^4$ kvv g sausas augsnes). Dubultinokulācijas variantā un inokulējot atsevišķi gumiņbaktērijas un mikorizas sēnes, mikrobioloģiskā aktivitāte bija līdzvērtīga.

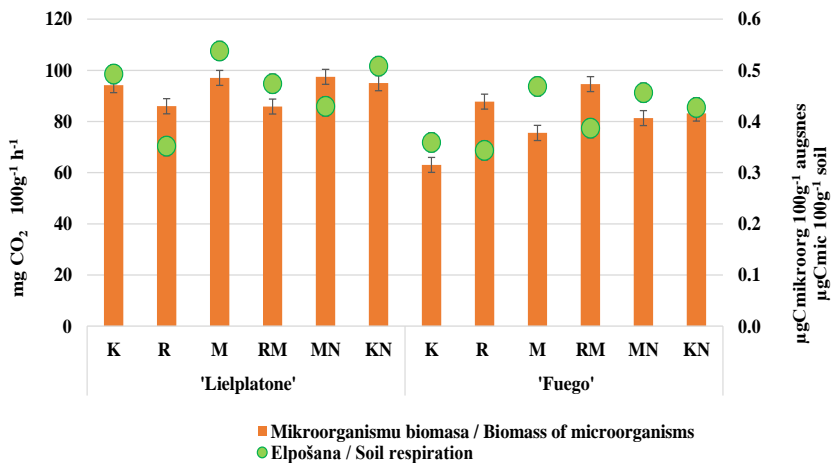
Salīdzinot baktēriju un mikroskopisko sēņu skaita izmaiņas pupu sakņu zonā ziedēšanas fāzē un pirms ražas novākšanas izmēģinājumā LI2017, konstatēts, ka mikroskopisko sēņu skaita izmaiņas bija lielākas šķirnei 'Lielplatone', kur veģetācijas beigās bija palielinājies mikroskopisko sēņu skaits sakņu zonā. Šķirnei 'Fuego' mikroskopisko sēņu skaita pieaugums bija vērojams tikai variantos ar gumiņbaktēriju inokulāciju (R) un mikorizas sēnēm, kur lietots papildu minerālais slāpekļis. Veģetācijas perioda beigās abām šķirnēm būtiski ($p < 0.05$) bija palielinājies gumiņbaktēriju skaits sakņu zonā. 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 ($r = 0.48$).

Lauka izmēģinājumos atšķirības starp inokulātu variantiem, salīdzinot mikroorganismu aktivitāti, ko raksturo augsnes elpošanas intensitātes svārstības, un skaitu, mazāk izteiktas (10. att.) nekā veģetācijas traukos.

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.



10. att. Mikroorganismu biomasa un augsnes elpošanas intensitāte LI2016_A izmēģinājumā pirms ražas novākšanas /
 Fig. 10. Biomass of microorganisms and soil respiration intensity before harvest, experiment LI2016_A



11. att. Mikroorganismu biomasa un augsnes elpošanas intensitāte LI2017 izmēģinājumā pirms ražas novākšanas /
 Fig. 11. Biomass of microorganisms and soil respiration intensity before harvest, experiment LI2017

Abām šķirnēm baktēriju skaits pupu sakņu zonā pirms ražas novākšanas bija mazāks nekā ziedēšanas laikā, bet mikroskopisko sēņu skaits palielinājās. Līdzīgi kā 2016. gadā, arī 2017. gadā mikroorganismu daudzuma un aktivitātes izmaiņas bija izteiktākas šķirnei 'Fuego' (11. att.). 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 ($r=0.48$).

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. Barības vielu uzkrāšanās un mikroorganismu daudzveidības palielināšanās nozīmīgi ir arī pākšaugi, kuri veido simbiozi gan gumiņbaktērijām, gan mikorizai. 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, kurā iepriekš audzēti inokulēti augi, mikorizas sastopamība kontroles variantu pārsniedz par 5.5 līdz 34.33%.

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

Veģetatīvie parametri analizēti atkarībā no audzēšanas gada, kad augi bija sasnieguši 63. līdz 72. attīstības stadiju. Tā kā pupām ziedi plaukst pakāpeniski, atsevišķos izmēģinājumos bija varianti, kuros pirmo ziedu vietā jau bija izveidojušies pākstu aizmetņi. Veģetācijas trauku izmēģinājumos nebija statistiski būtiskas atšķirības starp inokulācijas variantiem, bet lauka izmēģinājumos atsevišķos gadījumos tā tika konstatēta. Pupām ziedēšanas fāzē analizēti augu veģetatīvie parametri un salīdzināts hlorofila daudzums, sausnes un proteīna saturs lakstos.

Šķirnei 'Bartek' izmēģinājumā VT2014, variantos ar dažādiem gumiņbaktēriju celmiem, konstatēts atšķirīgs lakstos uzkrātās sausnes un proteīna saturs. Apkopojot trīs gadu veģetācijas trauku izmēģinājumu rezultātus, kuros audzētas ar diviem gumiņbaktēriju celmiem (atsevišķi vai kopā ar mikorizas sēnēm) inokulētas pupas, 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, savukārt dubultinokulācijas variantā ar RV407 sausnes saturs pārsniedza kontroles variantu. Dubultinokulācijā ar mikorizas sēnēm proteīna saturs bija zemāks, salīdzinājumā 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

nekā gumiņbaktēriju celms RV407, vērtējot augu veģetatīvos parametrus. Sausnes daudzums lakstos mazāks bija augiem, kuri inokulēti ar RV407. Šķirnei 'Karmazyn' rezultāti bija līdzīgi, tomēr varēja novērot atšķirīgu reakciju uz dubultinokulāciju. 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 rupjsēkļu pupu šķirnes 'Bartek' un 'Karmazyn' trīs gadus ilgos veģetācijas trauku izmēģinājumos, konstatēts, ka inokulācijā lietotajam baktērijas celmam un apstrādei ar mikorizas sēnēm nav statistiski būtiskas ietekmes uz sausnes uzkrāšanos auga virszemes daļās. Sausnes 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).

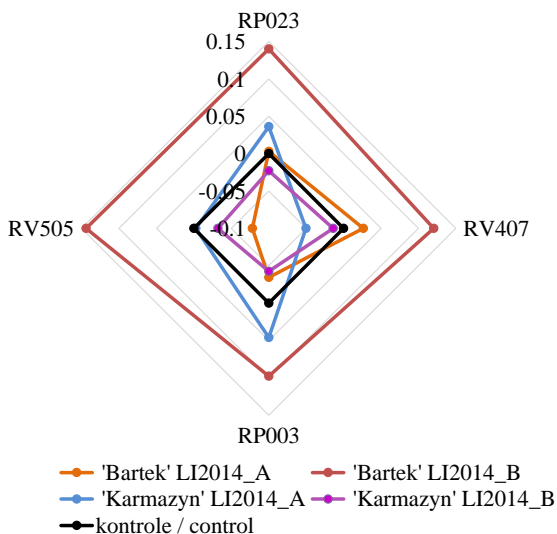
Inokulācija ar gumiņbaktērijām būtiski ietekmēja augu masu ziedēšanas laikā. Vidēji viena auga masa svārstījās no 15.21 līdz 26.9 g. Lielākā masa bija kontroles variantā un augiem, kuri inokulēti tikai ar mikorizas sēnēm, bet atšķirība no kontroles nebija statistiski būtiska ($p=0.47$, $RS_{0.05}=3.39$). 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%. Inokulēšanā lietotie mikroorganismsi patērē fotosintēzes produktus, tāpēc 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. Izmēģinājums LI2014_A iekārtots trūdaini glejotā augsnē ar augstāku barības vielu daudzumu, salīdzinot ar velēnu podzolaugšni izmēģinājumā LI2014_B. Atšķirīgajām augsnēm raksturīgs ne tikai ar dažāds pieejamo barības vielu sastāvs, bet arī mikrobiotas kvalitatīvais un kvantitatīvais sastāvs. 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' ar gumiņbaktēriju celmiem RP023 un RV505 pigmentu saturs bija augstāks nekā kontroles augiem. Kontrolē hlorofila saturs bija vidēji 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 izveidojās efektīvāka simbioze.

Veģetatīvo parametru attiecība inokulētajos variantos pret kontroli abās izmēģinājuma vietās šķirnei 'Bartek' apkopoti 12. attēlā.

Salīdzinot gumiņbaktēriju ietekmi uz augu parametriem, konstatēta būtiska šķirnes ietekme, kas atšķiras dažādās audzēšanas vietās. Augsnē ar zemāku barības vielu saturu novērota būtiskāka gumiņbaktēriju ietekme. Izmēģinājumā LI2014_A tikai atsevišķi parametri pārsniedza kontroles variantu. Summāri vienīgi ar gumiņbaktēriju celmu RV407 bija iegūts labāks rezultāts nekā kontrolei (12. att.). Atšķirīgs rezultāts iegūts šķirnei 'Karmazyn' (12. att.).



12. att. **Veģetatīvo parametru koeficientu attiecība inokulētajos variantos pret kontroles variantu izmēģinājumos LI2014_A un LI2014_B šķirnēm 'Bartek' un 'Karmazyn' /**

Fig.12. Ratio of vegetative parameters coefficients in inoculated variants to control variants in experiments LI2014_A and LI2014_B, cultivars 'Bartek' and 'Karmazyn'

Apkopojot inokulācijas efekta koeficientus, var konstatēt, ka inokulācija ar gumiņbaktērijām nevienā no izmēģinājumu vietām nav būtiski uzlabojusi augu augšanu. Nedaudz labāks rezultāts bija izmēģinājumā LI2014_A ar baktēriju celmiem RP023 un RP505.

Izmēģinājumā **LI2014_C** starp inokuluma variantiem attīstības stadijas būtiski neatšķiras. 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 novērota tikai ar baktēriju celmu RV407 ($p < 0.05$). Ar baktērijām RV407 inokulēto augu lakstos bija mazāk proteīna, salīdzinot gan ar baktēriju RP023 variantu, gan kontroli, tomēr tieši šajā variantā bija lielākā mikorizas sēņu ietekme.

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. Šķirnei 'Lielplatone' augu masa starp variantiem, kuri inokulēti tikai ar gumiņbaktērijām, būtiski neatšķirās, bet atšķirību varēja konstatēt dubultinokulācijas variantā ar baktēriju celmu RP023. 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 neatšķirās ($p > 0.05$), bet novērojama tendence, ka dubultinokulācija ar gumiņbaktēriju celmu RV407 un mikorizas sēnēm ir paaugstinājusi proteīna saturu abām šķirnēm. Rupjsēklu pupām atšķirība starp variantiem ar mikorizu un bez tās bija mazāk izteikta.

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 stadijas 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 atšķirās par 3 stadijām.

Šķirnei 'Lielplatone' vidējā augu masa kontroles variantos būtiski atšķirās no augiem, kuri inokulēti ar gumiņbaktērijām ($p = 0.003$, $RS_{0.05} = 12.84$). Starp variantiem ar vienu mikrosimbiontu un dubultinokulāciju nebija būtiska atšķirība ($p > 0.05$). Sausnes saturs augos būtiski neatšķirās starp inokulācijas variantiem, tikai inokulētajiem ar RP023 sausnes saturs bija mazāks nekā kontrolei ($RS_{0.05} = 0.62$), bet tika konstatēta pozitīva dubultinokulācijas ietekme, jo šajā variantā sausnes daudzums pārsniedza kontroli un inokulācijas variantu tikai ar gumiņbaktērijām ($p > 0.05$, $RS_{0.05} = 0.43$).

Šķirnei 'Fuego' augu garumu būtiski ietekmēja inokulācija ar mikorizas sēnēm. Inokulējot atsevišķi ar gumiņbaktērijām, tikai celms RV407 būtiski

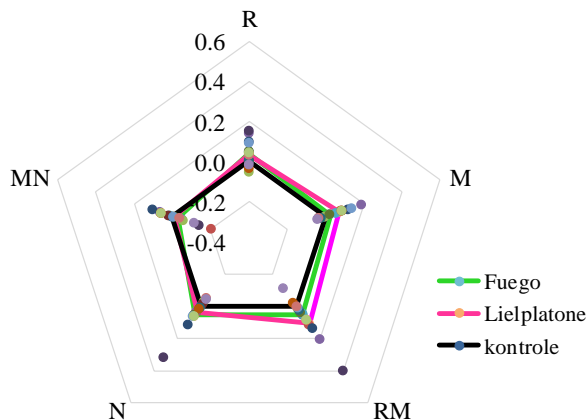
ietekmēja augu garumu ($RS_{0.05} = 1.88$). Ar gumiņbaktēriju celmu RP023 inokulēto augu garums neatšķīrās no kontroles. Visos variantos, kurus inokulēja ar mikorizas sēnēm atsevišķi vai kopā ar gumiņbaktērijiem, augu garums būtiski pārsniedza kontroles variantu ($p=0.009$, $RS_{0.05} = 1.54$). Attiecīgi 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 gan labvēlīgi ietekmē simbiotiskajā asociācijā iesaistītos mikroorganismus, gan nodrošina auga ražas veidošanos.

Savukārt izmēģinājumā LI2017 pupu veģetatīvie parametri analizēti 62 dienas pēc sējas (26.06.). Šajā laikā nebija būtiskas atšķirības augu attīstībā starp variantiem, bet tā tika novērota starp šķirnēm ($p<0.0002$). Šķirnes 'Lielplatone' augi bija sasnieguši 62. līdz 67. attīstības stadiju, bet šķirnes 'Fuego' – 62. līdz 74. attīstības stadiju. Šķirnei 'Fuego' tālāku attīstības stadiju bija sasnieguši ar gumiņbaktērijiem inokulētie augi gan kopā ar mikorizas sēnēm, gan bez tām. Sēklu inokulācija ar mikorizas sēnēm būtiski ietekmējusi augu augšanu ($p=0.0002$; $RS_{0.05} = 3.02$) variantos, kuros sēklas nebija inokulētas ar gumiņbaktērijiem. Arī augu masa bija lielāka variantos ar mikorizas sēnēm, bet būtiska atšķirība ($p=0.036$; $RS_{0.05} = 8.05$) konstatēta tikai variantā ar papildu slāpekļa mēslojumu. Tomēr sausnes saturs variantā ar mikorizas sēnēm un papildu slāpekļa mēslojumu bija būtiski zemāks.

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

Veģetatīvo parametru novērtējums ballēs pret kontroli izmēģinājumā LI2017 (13. att.) šķirnēm 'Lielplatone' un 'Fuego' parāda pozitīvu ietekmi mikorizas (M) un dubultinokulācijas (RM) variantiem. Mikorizas variants ar papildu 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 arī cita mijiedarbība.

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



13. att. Veģetatīvo parametru koeficientu novērtējums pret kontroli izmēģinājumā LI2017 /

Fig.13. Comparison of vegetative parameters coefficients with control in experiment LI2017

Auga un mikroorganismu mijiedarbība var uzlabot auga augšanu un fizioloģiskos procesus, bet pastāv arī iespēja, ka tā radīs 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. 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’ šī attiecība tikai jūnijā noslīdēja zem optimālā līmeņa (0.79–0.84). Zemākā vērtība bija kontrolēi (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 papildu 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 bija nedaudz paaugstinājies 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 novērotas arī fluorescences parametros. Pigmentu satura un fotosintēzes reakcijas centru stāvokļa svārstības var liecināt, ka abām šķirnēm nav bijuši vienlīdzīgi augšanas apstākļi.

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).

Pēc 2014. un 2015. gada izmēģinājumiem noskaidrots, ka atsevišķu gumiņbaktēriju celmu lietošana sēkļu inokulācijai negarantē efektīvas simbiozes izveidošanos. Tāpēc inokulācijai radītas 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 daudzums bija 37.71 vienība, bet variantos ar inokulētajiem augiem – robežās no 41.21 līdz 45.75 vienībām ($RS_{0.05} = 2.96$). 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.

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). Asociācijā iekļauti gumiņbaktēriju celmi, kuri jau iepriekš atradās kolekcijā un bija ietverti iepriekš pārbaudīto asociāciju sastāvā. Nebija būtisku atšķirību augu garumā un lapu skaitā, bet atšķīrās 10 lapu masa un sausnes saturs lapās (3. tab.). Viegļākas 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.

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

Kā noskaidrojās modeļizmēģinājumos, inokulāta ietekmi uz auga sakņu augšanu var konstatēt 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 ar mikorizu inokulētajiem augiem saknes masa būtiski neatšķirās no kontroles augu saknēm ($p > 0.05$), bet dubultinokulācijas variantos tā veidojās nedaudz lielāka nekā augiem bez gumiņbaktērijiem. 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 gumiņbaktērijiem, – 0.81.

3. tabula / Table 3

Augu parametri šķirnei ‘Bartek’ izmēģinājumā VT2017 ar inokulantu variantiem /

Plant parameters for cv. ‘Bartek’ in experiment VT2017 with different inoculants

Inokulants / <i>Inoculum</i>	10 lapu masa / <i>10 leaves’ weight, g</i>	Sausne / <i>dry weight, mg g⁻¹</i>	pigmentu saturs / <i>amount of pigments,</i> mg g ⁻¹		
			hlorofils a / <i>chlorophyll a</i>	hlorofils b / <i>chlorophyll b</i>	karotinoīdi / <i>carotenoides</i>
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, $p = 0.05$) /

**there is a statistically significant difference between the numbers in the columns marked with different letters (Duncan's criterion, $p = 0.05$)*

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 gumiņbaktērijiem. Salīdzinot abas šķirnes, redzams, ka ‘Lielplatonei’ bija lielāks ūdens zudums, kas liecina, ka augiem nav bijis optimālu apstākļu; to apstiprina arī hlorofila fluorescences fotosintēzes sistēmas novērtējums. Mazākie ūdens zudumi analizēšanas laikā bija kontrolei un tikai ar mikorizas

sēnēm inokulētajiem augiem. Augiem, kuri inokulēti ar gumiņbaktēriju asociācijām, ūdens zudums bija lielāks. Izpaudās arī abu asociāciju atšķirīgā mijiedarbība ar augu un mikorizas sēnēm. Ar pirmo asociāciju (R1) inokulētie augi zaudēja mazāk ūdens 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 labākus augšanas apstākļus – par to liecināja hlorofila saturs lapās, uzkrātā sause un ūdens aiztures spēja.

No veģetatīvo parametru novērtējuma var secināt, ka inokulātu ietekme uz augu atšķiras dažādos gados, kā arī ir konstatējama šķirnes ietekme.

Augu masas samazināšanos var skaidrot ar simbiotisko sistēmu formēšanos, kuras laikā mikrosimbionti patērē fotosintēzes procesā sintezētos organiskos savienojumus. Izveidojoties simbiotiskajai asociācijai, gumiņbaktērijas piesaista atmosfēras molekulāro slāpekli un ar papildu minerālvielām apgādā ne tikai augu, bet arī mikorizas sēnes. Veidojoties plašākai mikorizosfērai, gan augi, gan gumiņbaktērijas papildus tiek apgādāti ar fosforu, kas nepieciešams bioķīmiskajos procesos. Efektīvas simbiozes rezultātā augi ar fotosintēzes procesu var nodrošināt savas vajadzības un mikrosimbiontu prasības.

Ražu veidojošo parametru (stublāju, pākstu skaits) novērtēšanai augi ievākti pirms ražas novākšanas. Pupām noteikts proteīna saturs.

Vērtējot pupu ‘Bartek’ veģetatīvos parametrus, 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 uz ražas veidošanos un proteīna saturu bija augu inokulēšanai ar mikorizas sēnēm. 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 veģētācijas periodā veicināja augstāku proteīna saturu lakstos, salīdzinot ar kontroli. Lietotajiem inokulātiem bija būtiska ($p=0.007$) ietekme uz proteīna uzkrāšanos sēklās. Salīdzinot inokulācijas rezultātu ar atsevišķiem gumiņbaktēriju celmiem, proteīna daudzums sēklās augstāks bija ar gumiņbaktēriju RV407 (30.7%) inokulētajiem augiem, bet ar RP023 (29.5%) tas bija zemāks. Zemākais proteīna daudzums bija kontrolē (27.2%).

Ražas paaugstināšanu varēja veicināt labāki fotosintēzes apstākļi, jo vairumā gadījumu variantos ar mikorizas sēnēm augiem bija augstāks hlorofila daudzums. Šķirnei ‘Bartek’ 2014. gada izmēģinājumos lielākā atšķirība starp atsevišķu inokulāciju ar gumiņbaktērijām un dubultinokulāciju tika konstatēta baktērijām RP023. Ar mikorizas sēnēm neinokulētajos variantos korelācijas koeficients $r=0.66 > r_{0.05, 24} = 0.40$, bet inokulētajiem – $r=0.69 > r_{0.05, 24} = 0.40$. 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 $p=0.68$). Konstatējama atšķirīga gumiņbaktēriju celmu ietekme (4. tabula).

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 sauses daudzumu un auga masu gan variantos ar mikorizas sēnēm ($r=0.81 > r_{0.05, 36} = 0.33$), gan bez tām ($r=0.92 > r_{0.05, 27} = 0.38$). Vidēji cieša korelācija starp auga masu un proteīnu saturu lapās bija variantos kuri inokulēti tikai ar gumiņbaktērijiem ($r=0.51 > r_{0.05, 24} = 0.40$) un variantos, kur sēklas inokulētas ar abiem mikrosimbiontiem ($r=0.45 > r_{0.05, 24} = 0.40$).

4. tabula / Table 4

Vidējais proteīna daudzums lakstos un sēklās veģetācijas trauku izmēģinājumos šķirnei ‘Bartek’ /

Average protein content in plant shoots and seeds in vegetation pot trials for cv. ‘Bartek’

Inokulants / <i>Inokulum</i>	Proteīns dzinumos / <i>Protein content in stems, %</i>		Proteīns sēklās / <i>Protein content in seeds, %</i>	
	Bez mikorizas/ <i>Without mycorrhiza</i>	Ar mikorizu/ <i>With mycorrhiza</i>	Bez mikorizas/ <i>Without mycorrhiza</i>	Ar mikorizu/ <i>With mycorrhiza</i>
Kontrole / <i>control</i>	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

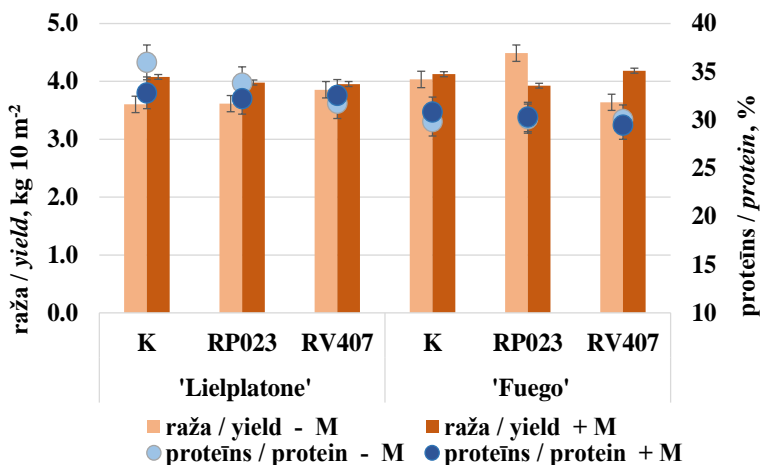
*starp skaitļiem kolonnās, kas apzīmēti ar dažādiem burtiem, ir statistiski pierādāma starpība (Dunkana kritērijs, $p=0.05$) /

**there is a statistically significant difference between the numbers in the columns marked with different letters (Duncan's criterion, $p = 0.05$)*

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.

Novērtējot inokulācijas varianta ietekmi uz ražu, vairāk izpaudās šķirnes faktors. ‘Lielplatonei’ lielāka raža bija ar mikorizas sēnēm inokulētajam variantam un dubultinokulācijas variantam ar baktērijiem RP023 (14. att.), bet abos variantos proteīna saturs sēklās bija nedaudz zemāks nekā variantā bez mikorizas. Šķirnei ‘Fuego’ labvēlīga ietekme bija dubultinokulācijai ar

baktēriju celmu RV407 un mikorizas sēnēm, bet ar baktēriju celmu RP023 efekts bija pretējs.



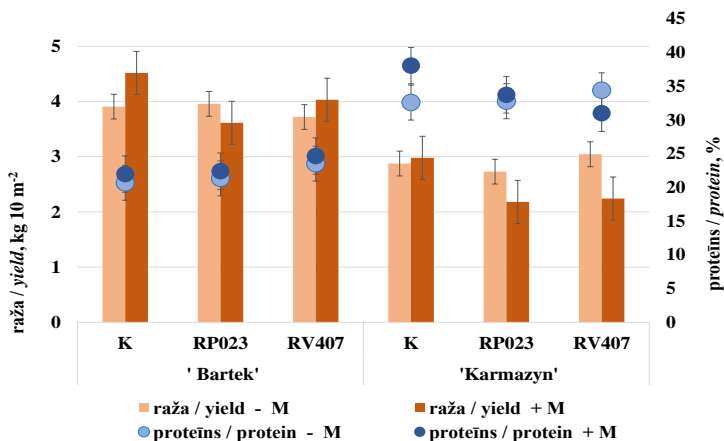
14. att. Pupu sēklu raža un proteīna saturs šķirnēm 'Lielplatone' un 'Fuego' izmēģinājumā LI2015_A /

Fig. 14. Bean seed yield and protein content in cv. 'Lielplatone' and cv. 'Fuego' in experiment LI2015_A

K – varianti bez inokulācijas ar gumiņbaktērijām / variants without inoculation
M – inokulēti ar mikorizas sēnēm / inoculated with mycorrhizal fungi

Rupjsēklu šķirnēm lielāka raža iegūta tikai variantos, kuri inokulēti ar mikorizas sēnēm bez gumiņbaktērijām (15. att.). Šķirnei 'Karmazyn' dubultinokulācija ar baktērijām RV407 un mikorizas sēnēm samazināja arī proteīna saturu sēklās.

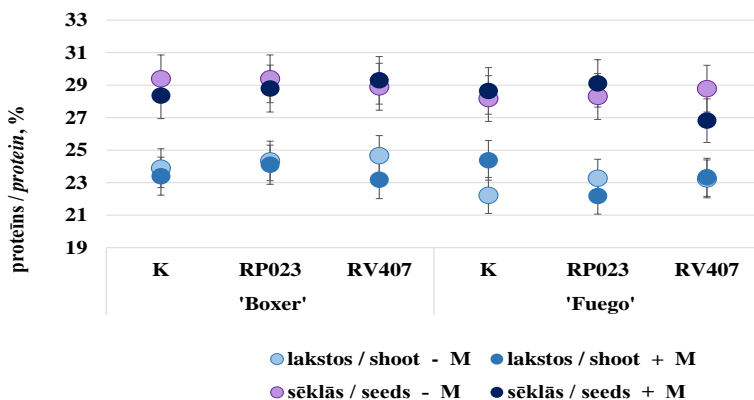
Izmēģinājumā LI2015_B proteīna saturs sēklās variantos ar mikorizas sēnēm bija nedaudz augstāks, bet nebūtisks. Dubultinokulācija ar gumiņbaktērijām RV407 un mikorizas sēnēm šķirnei 'Fuego' proteīna saturu samazināja ($p=0.02$, $RS_{0.05}=0.32$) (16. att.).



15. att. Pupu sēklu raža un proteīna saturs šķirnēm 'Bartek' un 'Karmazyn' izmēģinājumā LI2015_A /

Fig.15. Bean seed yield and protein content in cv 'Bartek' and 'Karmazyn' in experiment LI2015_A

K – varianti bez inokulācijas ar gumiņbaktērijām / variants without inoculation
 M – inokulēti ar mikorizas sēnēm / inoculated with mycorrhizal fungi

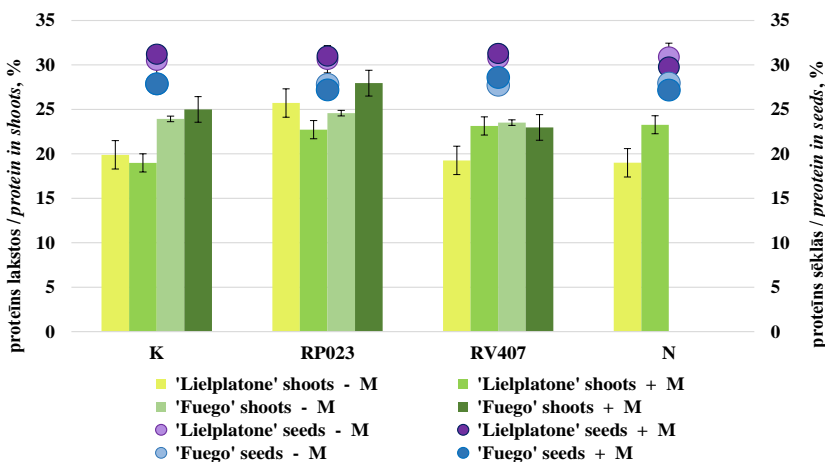


16. att. Proteīna saturs lakstos veģetācijas periodā un sēklās dažādi inokulētos variantos šķirnēm 'Boxer' un 'Fuego' izmēģinājumā LI_2015_B/

Fig. 16. Protein content in shoots in the growing season and in seeds in differently inoculated variants for cultivars 'Boxer' and 'Fuego' in field experiment LI_2015_B

K – varianti bez inokulācijas ar gumiņbaktērijām / variants without inoculation
 M – inokulēti ar mikorizas sēnēm / inoculated with mycorrhizal fungi

Izmēģinājumā (LI2016_A) šķirnei ‘Fuego’ līdzīgi kā ‘Lielplatonei’ augu veģetatīvajās daļās sausnes daudzums starp inokulācijas variantiem būtiski neatšķirās. Tomēr salīdzinot proteīna saturu dzinumos veģetācijas periodā un uzkrāto proteīna daudzumu sēklās (17.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.



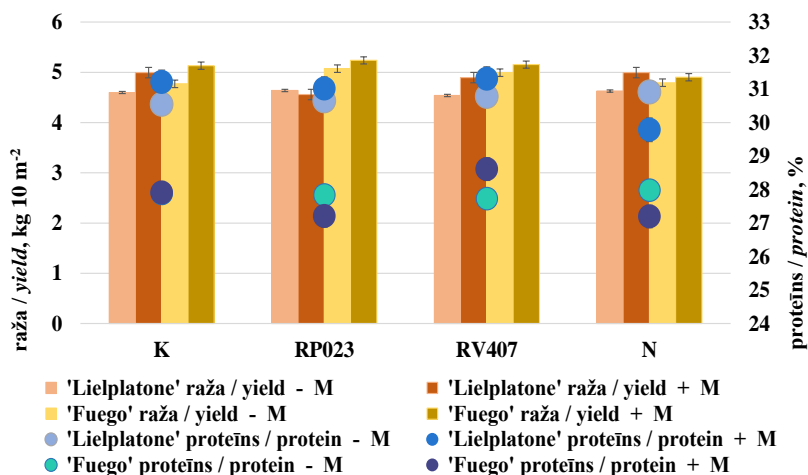
17. att. **Proteīna saturs pupu lakstos un sēklās šķirnēm ‘Fuego’ un ‘Lielplatone’ lauka izmēģinājumos 2016. gadā /**

Fig. 17. Protein content in bean leaves and seeds of cultivars ‘Fuego’ and ‘Lielplatone’ in field trials of 2016

K – varianti bez inokulācijas ar gumiņbaktērijām / variants without inoculation

N – varianti bez inokulācijas ar gumiņbaktērijām, bet ar papildu slāpekļa / variants without inoculation, but with additional nitrogen fertilizer

Novērtējot izveidotās simbiozes ietekmi uz pupu ražu, konstatēts, ka mikorizas sēņu iekļaušana inokuluma sastāvā vairumā gadījumu palielina ražu (18. att.). Atsevišķi lietotu mikorizas sēņu ietekme uz ražu ir statistiski būtiska ($p=0.00035$; $RS_{0.05}=0.14$). Nebūtiska ietekme bija tikai dubultinokulācijas variantā ar baktērijām RP023 un mikorizas sēnēm ar papildu slāpekļa mēslojumu.



18. att. Pupu sēklu raža un proteīna saturs šķirnēm 'Lielplatone' un 'Fuego' LI2016_A izmēģinājumā /

Fig. 18. Bean seed yield and protein content of cv. 'Lielplatone' and 'Fuego' in LI2016_A experiment

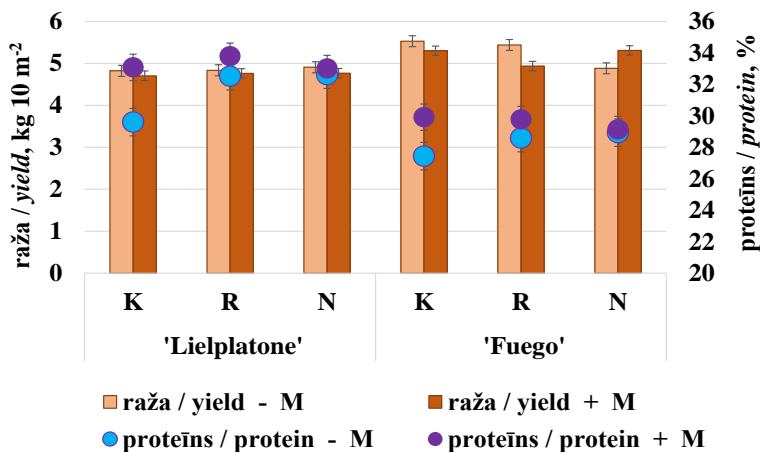
K – varianti bez inokulācijas ar gumiņbaktērijām / variants without inoculation

M – inokulēti ar mikorizas sēnēm / inoculated with mycorrhizal fungi

N – varianti bez inokulācijas ar gumiņbaktērijām, bet ar papildu slāpekļa / variants without inoculation, but with additional nitrogen fertilizer

Proteīna daudzums sēklās dubultinokulācijas variantos augstāks abām šķirnēm ar gumiņbaktērijām 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 bija mazāks. Papildu slāpekļa mēslojums mikorizēto augu sēklās proteīna daudzumu samazināja par 0.78 līdz 1.13%.

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



19. att. Raža un proteīna saturs sēklās šķirnēm 'Lielplatone' un 'Fuego' LI2017 izmēģinājumā /

Fig. 19. Yield and protein content in seeds of cultivars 'Lielplatone' and 'Fuego' in LI2017 experiment

K – varianti bez inokulācijas ar gumiņbaktērijām / variants without inoculation

R – varianti, kuros sēklas inokulētas ar gumiņbaktērijām / variants in which the seeds have been inoculated with bacteria

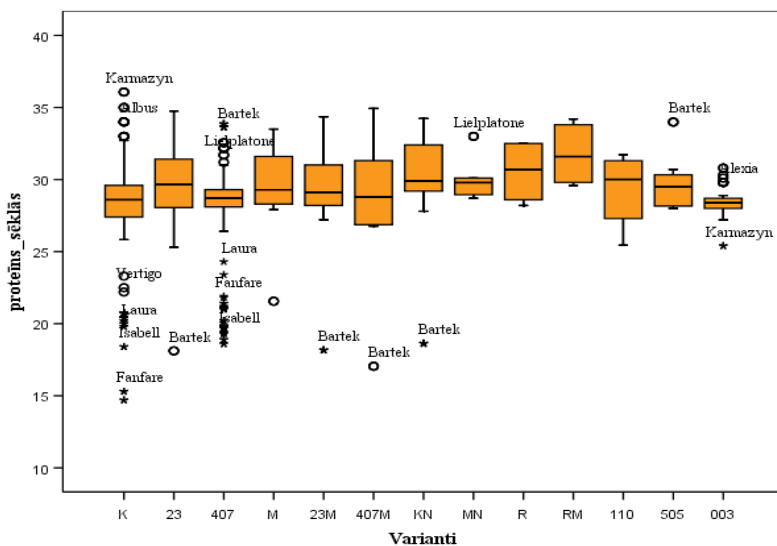
N – varianti bez inokulācijas ar gumiņbaktērijām, bet ar papildu slāpekļa / variants without inoculation, but with additional nitrogen fertilizer

Šķirnei 'Fuego' vidējā 100 sēklu masa bija 54.6 g, bet variantos, kur sēklas inokulētas ar mikorizas sēnēm, – 57.0 g. Atšķirība bija 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 ($p < 0.001$) (19. att.). Ziedēšanās fāzē lakstos proteīns vairāk veidojās variantos, kuros sēklas bija inokulētas.

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 sēklās, konstatēts, ka inokulētajos variantos proteīna saturs vidēji ir augstāks nekā kontrolē. Apkopojot visu analizēto šķirņu proteīna analīžu rezultātus (20. att.), redzams,

ka lielākas svārstības ap vidējo vērtību novērojamas inokulāciju variantos ar vienu atsevišķu mikrosimbiontu. Variantos, kur inokulātu veido atsevišķi gumiņbaktēriju celmi, vidējais proteīna saturs sēklās būtiski neatšķirās 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 bija lielāka variantā ar gumiņbaktēriju asociāciju (RM variants).



20. att. **Proteīna saturs (%) pupu sēklās dažādos inokulātu variantos /**
Fig. 20. Protein content (%) in bean seeds in different inoculum variants

Veģetatīvo parametru un ražas izmaiņu būtiskums dažādu inokulātu ietekmē novērtēts, salīdzinot inokulētos variantus ar kontroli. Ietekme izteikta ar koeficientu, kura vērtība svārstās no -1 (negatīvs efekts, salīdzinot ar kontroli) līdz 1 (pozitīvs efekts, salīdzinot ar kontroli), un tas atainots krāsu kartē. Kontroles varianta vērtības atbilst 0 punktam.

Veģetatīvo parametru un ražas izmaiņas, salīdzinot ar kontroli, šķirnei ‘Lielplatone’ atainotas krāsu kartē (21. att.). Trīs gadu rezultāti neparāda vienu neapstrīdami 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. Krāsu kartē šķirnei ‘Fuego’ (22. 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.

Šķirnei ‘Lielplatone’ simbiozes veidošanai labvēlīgāks bija 2017. gads, savukārt šķirnei ‘Fuego’ – 2016. gads, bet mazāk piemērots izrādījās 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. Nokrišņu mazāk par normu maijā bija 2017. gadā, jūnijā – 2015. gadā.

Rupjsēklu šķirnei ‘Bartek’ lauka izmēģinājumu rezultāti atšķiras pa gadiem (23. att.). 2014. gadā labāko rezultātu uzrādīja variants, kur augi bija inokulēti ar mikorizas sēnēm, turpretī 2015. gadā pozitīvais efekts bija vājāk izteikts, lai gan pozitīva ietekmes tendence uz ražas veidošanos saglabājās. Šķirnei ‘Karmazyn’ inokulācija ar mikorizas sēnēm uzrādīja pozitīvu ietekmi (23. att.), bet dubultinokulācija to ietekmēja negatīvi.

Parametrs / Parameters	2015					2016						2017					
	R23	R407	M	R23M	R407M	R23	R407	M	R23M	R407M	MN	KN	R	M	RM	N	MN
garums / length																	
masa / weight																	
sausne / dry weight																	
pākstu skaits / number of pods																	
100 sēklu masa / 100 seed weight																	
proteīns lakstos / protein in																	
proteīns sēklās / protein in seeds																	
raža / yield																	
Vidējais / Average																	

21. att. Krāsu karte lauka izmēģinājumu rezultātiem šķirnei ‘Lielplatone’/
Fig. 21. Colour map for field trial results for cultivar ‘Lielplatone’

Parameters / Parameters	2015					2016						2017					
	R23	R407	M	R23M	R407M	R23	R407	M	R23M	R407M	MN	KN	R	M	RM	N	MN
garums / length																	
masa / weight																	
sausne / dry weight																	
pākstu skaits / number of pods																	
100 sēklu masa / 100 seed weight																	
proteīns lakstos / protein in																	
proteīns sēklās / protein in seeds																	
ražā / yield																	
Vidējais / Average																	

22. att. Krāsu karte lauka izmēģinājumu rezultātiem šķirnei 'Fuego' /
Fig. 22. Colour map for field trial results for cultivar 'Fuego'

Parameters / Parameters	' Bartek'										' Karmazyn'				
	2014					2015					2015				
	R23	R407	M	R23M	R407M	R23	R407	M	R23M	R407M	R23	R407	M	R23M	R407M
garums / length															
masa / weight															
sausne / dry weight															
pākstu skaits / number of pods															
100 sēklu masa / 100 seed weight															
proteīns lakstos / protein in															
proteīns sēklās / protein in seeds															
ražā / yield															
Vidējais / Average															

23. att. Krāsu karte lauka izmēģinājumu rezultātiem šķirnei 'Bartek' un
'Karmazyn' /

Fig. 23. Colour map for field trial results for cultivars 'Bartek' and
'Karmazyn'

Vairumā gadījumu pupu veģetatīvie parametri (lapu skaits, dzinumu skaits) starp variantiem būtiski neatšķīrās. 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%) sīksēkļu un rupjsēkļu pupām. Šķirnēm 'Bartek' un 'Karmazyn' arbuskulu veidošanās intensitāte saknēs bija zemāka nekā sīksēkļu pupu šķirnēm. Rupjsēkļu pupām mikorizācijas pakāpe svārstījās no 40% līdz 51.1%, bet sīksēkļu no 65% līdz 97%. Attiecīgi arī arbuskulu sastopamība rupjsēkļu šķirnēm bija no 0.13% līdz 1.14%, bet sīksēkļu 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.

Introduction

Legumes are widely grown crops in the world that fix atmospheric nitrogen in symbiosis with microorganisms. Their growing area varies in different regions of the world. The legume cultivation area is not homogeneous in Latvia, either. It is influenced by EU directives, which impose requirements for the diversification of arable land, as well as changes in cultivation technologies and marketing opportunities. There is also a need to diversify the use of legumes. Historically, beans were grown as a source of protein in fodder and only small amounts of garden beans were intended for human consumption. At present, the use of legumes is expanding and their processing is also evolving in order to better integrate legumes into the human diet. Legumes, including beans, are increasingly valued from an environmental quality point of view, as their inclusion in crop rotation not only reduces the required mineral nitrogen consumption but also reduces N₂O emissions from soil caused by microbiological processes and improves soil structure, so they are an important precrop.

The beneficial effects of legumes on various environmental processes would not be possible without the mediation of symbiotic microorganisms, the activity of which is influenced by cultivation technologies. With the change of bean growing areas as well as growing technologies and agro-climatic conditions, there is a need to intensify research on the interaction between beans and microorganisms. More and more modern and intensive methods are being used in agriculture, but at the same time agricultural production must become more environmentally friendly by reducing the use of mineral fertilizers and incorporating organic components. The impact of complex environmental and human/economic activities must be taken into account, as crop yields depend not only on genetically determined limitations and capabilities or appropriate agro-techniques, but also on a number of environmental factors that affect the interaction of agrocenotic organisms.

Topicality of the PhD thesis

In Latvia, the *Rhizobium* bacteria have been studied for a long period of time, however, the research has been carried out with fluctuating intensity. On the other hand, there are few studies on the role of mycorrhizal fungi in agroecosystems, but the interaction between the rhizobia and mycorrhizal fungi has not been studied. Therefore, by intensifying the cultivation of legumes, including beans, the possibilities to increase their productivity with environmentally friendly methods – microbial associations – should be assessed. By studying the mechanisms of interactions and the factors affecting them, it would be possible to better provide the necessary conditions for the growth of crops in the agro-ecosystem in order to obtain not only high but also high-quality yields with environmentally friendly methods.

Aim of the thesis

To evaluate the effect of symbiotic associations on the yield of beans (*Vicia faba* L.) and its quality.

Tasks

1. To evaluate the suitability of *Rhizobium leguminosarum* strains from the collection the Rhizobium bacteria available at the Institute of Soil and Plant Sciences of the Latvia University of Life Sciences and Technologies to form an effective symbiosis in the *V. faba* L. beans.
2. To evaluate the degree of mycorrhization of *V. faba* L. bean roots in inoculated and non-inoculated fields.
3. To assess the influence of environmental factors on the formation and effectiveness of symbiotic associations.
4. To assess whether it is appropriate to use double seed inoculation with symbiotic microorganisms to increase the quality of bean yield.

Hypothesis of the thesis

By establishing an appropriate and effective symbiotic association between beans and microsymbionts, it is possible to increase bean yield and quality.

Theses to be defended

1. The efficacy of the rhizobia bacterial strains varies. It is affected not only by the soil conditions but also by the crop.
2. The distribution of mycorrhizal fungi in the soil is not homogeneous. The mycorrhization intensity in agricultural soils is influenced by tillage and the crops grown.
3. Environmental conditions determine the interaction between plant and microorganisms. The biochemical interaction between the plant, the rhizobia, and the mycorrhizal fungi determines the possibility and efficiency of the formation of the symbiotic system.
4. Effective symbiotic association between beans and microsymbionts has a positive effect on plant growth and as a result can increase bean yield and quality.

Approbation of research results

The results of this study have been summarized in 10 publications, six of which are published in scientific journals indexed in Scopus or Web of Science databases. 6 oral reports and 8 posters were presented at international scientific conferences.

Materials and methods

The dissertation was developed in the period from 2014 to 2018.

The experiments on the effectiveness of the rhizobia and the effects of double inoculation on yield formation include several cultivar of bean.

- Small-seeded bean *Vicia faba* var. *minor* cultivars ‘Lielplatone’, ‘Fuego’, ‘Boxer’, ‘Albus’, ‘Laura’, ‘Alexia’.
- Large-seeded bean *Vicia faba* var. *major* cultivars ‘Karmazyn’ and ‘Bartek’.

The trials were carried out in vegetation pots under controlled conditions and in field experiments. To evaluate the effects of temperature on the formation of symbiosis experiments were set up under controlled conditions in a phytochamber and a greenhouse.

Bean seed inoculation for evaluation of efficiency of symbiotic systems in vegetation pots and field trials

The effectiveness of *Rhizobium leguminosarum* L. strains and mycorrhizal fungi was evaluated in the vegetation pot and field experiments.

All the rhizobia strains – RP003, RP023, RP110, RV407, RV505 – used in the experiments came from the collection of the Institute of Soil and Plant Sciences of the Latvia University of Life Sciences and Technologies. The experiments started with assessing the effectiveness of individual rhizobia strains or their combination with mycorrhizal fungi, but in 2016 and 2017 continued with rhizobia bacterial strain associations:

R – association of RP023 and RV407 strains,

R1 – association of RP003, RP023 strains,

R2 – association of RV407, RV505 strains.

The seeds were inoculated with the rhizobia before sowing. Unsterilized seeds were soaked for 30 min in a suspension of bacteria with a concentration of microorganisms of 10^6 cells per 1 mL. For field trials (LI2016_A, LI2017) the seeds were dried before sowing so that they could be sown with a sowing machine.

The mycorrhizal fungi preparation was obtained from the Czech company Symbiom® and contains three species of mycorrhizal fungi – *Glomus claroideum*, *G. intraradices*, and *G. mosseae*. The mycorrhizal fungi preparation was used directly before sowing in both vegetation pots and field trials. The dose of the preparation was 45 g m^{-2} . The effect of mycorrhizal fungi on the efficiency of the symbiosis of the beans (*Vicia faba* L.) and the rhizobia, as well as the formation and quality of bean yield was evaluated. The experiments included variants in which the seeds were treated exclusively with the mycorrhiza preparation as well as variants with double inoculation.

The experiments were arranged in vegetation pots in the territory of the Institute of Soil and Plant Sciences. Each year the experiments were arranged in 8 (eight) replicates, four of which were analysed at the flowering phase of the plants, while four replicates were grown until harvest. 6 seeds were sown in each 5 liter vegetation pot. After germination, no more than 5 beans were left in each vegetation pot. The soil for the experiment was taken from a field where there had been no previous experiments with the rhizobia. The vegetation pots were placed in open air conditions on wooden pallets. The plants were automatically watered with tap water 1–3 times a day, changing the watering regime depending on the plant development phase and meteorological conditions. 200–450 mL of water per m² were given at one time.

In 2014 experiments were started on May 2, in 2015 – on May 13, in 2016 – on May 3 13, but in 2017– May 2.

The yield was harvested in September.

The granulometric structure of the substratum for the vegetation pot experiments was as follows:

- years 2014 and 2015 – loam,
- year 2016 – clay loam,
- year 2017 – loamy sand.

Field experiments

Year 2014

LI2014_A – the experiment was set up in Ķemeri (56°56'48.7"N 23°28'18.5"E). Two cultivars 'Bartek' and 'Karmzyn' were grown. The beans were sown in double rows, in four replicates. The variants were arranged randomly. 10 seeds were sown in each row. An isolation area of 50 cm was left between the plots. No additional fertilizer was given.

LI2014_B – the experiment was set up in Olaine district (56°43'02.2"N 24°04'24.8"E). Two cultivars 'Bartek' and 'Karmzyn' were grown. The beans were sown in double rows, in four replicates. The variants were arranged randomly. 10 seeds were sown in each row. An isolation area of 50 cm was left between the plots. No additional fertilizer was given.

LI2014_C – the experiment was set up in Jelgava, in the territory of the Institute of Soil and Plant Sciences. The beans were sown in double rows, in four replicates. The variants were arranged randomly. 10 seeds were sown in each row. Between the variants 1 m isolation zone remained. Winter wheat was sown in the isolation zone. Cv. 'Bartek' was grown.

Year 2015

LI2015_A – the experiment was set up in Jelgava, in the territory of the Institute of Soil and Plant Sciences of the Latvia University of Life Sciences and Technologies on April 30. It was three-row sowing, 20 cm between rows. The length of each plot was 1 m. The experiment was arranged in four replicates. Between the variants and replicates was 1 m isolation zone where

winter wheat was sown. Four cultivar 'Lielplatone', 'Fuego', 'Bartek', and 'Karmazyn' were grown.

LI2015_B – the trial was set up in Jaunjelgava district, Sece parish (56°33'36.2"N 25°23'47.4"E). The beans were sown on April 24. The seeding rate was 50 germinating seeds per m². The size of each field was 1 m², and the experiment was arranged in four replicates. Cultivars 'Boxer' and 'Fuego' were grown.

LI2015_C – the experiment was set up in Vaidava parish. Each variant in four repetitions, one repetition plot size 4 × 48 m. Cultivated cultivar: 'Alexia', 'Albus', 'Laura', 'Boxer', 'Fuego'. Sown on April 11.

Year 2016

LI2016_A – the experiment was set up at the Latvia University of Life Sciences and Technologies Training and Research Farm "Pēterlauki" on May 2. The size of the plots was 7 × 1.5 m. The experiment was conducted in four replicates. The beans were sown with a sowing machine. The sowing rate for 'Lielplatone' and 'Fuego' was 45 seeds per m².

LI2016_B – the effect of mycorrhization was analysed in an experiment with two garden bean genotypes in Pūre DI. The experiment was arranged in four replicates.

Year 2017

LI2017 – the experiment consisted of four replicates. The size of each plot was 9 × 2 m. The beans were sown with a sowing machine. The sowing rate for 'Lielplatone' and 'Fuego' was 45 seeds per m². When the beans had their first true leaf, ammonium nitrate at a dose of 10 kg ha⁻¹ was given in the experimental variants with additional nitrogen fertilizer (control (KN) and mycorrhizal (MN) variant).

The experiments were set up in several places to test the effectiveness of the *Rhizobium* bacterial strains in different soils. In the experimental site inoculated legumes have not been grown on the test sites for at least 10 years.

Determination of vegetative, biochemical and yield-forming parameters of plants

In vegetation pots and field trials, plant vegetation parameters were measured first during the flowering phase and repeatedly before harvest. According to the BBCH decimal code scale, the first plant analysis was performed when the plants had reached stage 60–72 of development, and the second – in the ripening phase (BBCH 85–88). The methods used for plant and soil analyses are summarized in Table 1.

Model experiments

Model experiments (ME) were set up, depending on the study parameter, in a greenhouse or phytochamber under controlled conditions.

ME_A. The effects of temperature and microsymbionts on flavonoid synthesis in germinating bean seeds was studied. The experiment was set up in Petri dishes, the seeds were germinated in the dark, in 4 different temperature conditions: 4, 8, 12 and 20 °C. The seeds were inoculated with several combinations of symbionts: 1) a mixture of rhizobia strains RP023 and RV407 (R), 2) a mycorrhizal fungi preparation (M), 3) double inoculation (RM). No additional microorganisms were used in the control variant. Each variant was set up in four replications. The qualitative and quantitative composition of flavonoids in the seed exudate solution was analysed.

A part of the sprouted seeds was used in a subsequent greenhouse experiment.

ME_B. The effects of temperature and microsymbionts on bean seed germination and growth was analysed. The experiment was arranged in two parts.

The first experiment in vegetation pots was arranged in a phytochamber. The air temperature regime was the following:

day 1 –28: + 5 °C at night + 15 °C, during the day,

day 29 –36: + 7 °C at night, + 17 °C during the day,

day 37 –40: + 10 °C at night, + 20 °C during the day,

from day 41 until the end of the experiment: + 12 °C at night, + 20 °C during the day.

The beans (cultivar ‘Fuego’ and ‘Karmazyn’) were grown in 1 litre vegetation pots filled with sterile vermiculite, sowing 2 seeds in each pot in six replicates. Plant growth and the biochemical parameters in the roots and the vegetative part of the plants were analysed.

The second experiment was set up in a greenhouse, continuing to assess the effect of temperature during germination. Seedlings from Petri dishes were planted in sterile vermiculite in 3 litre vegetation pots. As the plants grew, they were watered with a nutrient solution. The nutrient solution was prepared from Crystalone-3 (N-P₂O₅-K₂O 6-24-36) by dissolving 1.5 g in distilled water. The plants were grown for 7 weeks until flower buds appear (BBCH 50 - 55). Upon harvest, shoot length and weight, number of leaves, root weight, number and weight of nodule, and shoot root and nodule dry matter were measured.

To evaluate the effects of inoculation on the crop, two (ME_C and ME_D) vegetation pots were set up in the greenhouse.

The first greenhouse experiment (ME_C) was set up for two years, with beans in vegetation pots according to the same scheme. The experiment was set up for the first time in autumn 2014 in vegetation pots (7 variants in five replicates) where beans had been previously grown, and for the second time in spring 2017

in vegetation pots (7 variants, three replicates) where beans had been grown in the vegetation period of 2016. The greenhouse experiments were completed during the flowering phase of the plants. In the first year, the variety 'Bartek' was grown. In the second year, the variety 'Lielplatone' was grown.

The second greenhouse experiment (ME_D) was set up with onions, grown after the beans 'Bartek'. The test, according to the same scheme, was performed for two years. The first experiment with onions was set up in February 2015, the second – in April 2016 in the vegetation pots where inoculated beans had been grown. The obtained results are summarized in the publication (Dubova, L., Senberga, A., Alsina, I. Inoculated broad beans (*V.faba*) as a precrop for spring onions (*Allium cepa*). (2017). *Research for Rural Development*, Vol. 2, pp. 33–39) and are not analyzed in detail in this work.

Evaluation of the degree of root mycorrhization

To assess the occurrence of mycorrhizal fungi, the roots were rinsed after digging and 1–3 cm long samples were collected from the root tips for further analysis. The root samples were purified and prepared for staining by heating in 10 % KOH solution at 90 °C for 10 minutes. The roots were rinsed and stained with a solution of 5% black ink (Parker Pen Company, Newhaven, UK) in 8 % acetic acid (Brundrett et al., 1996; Vierheilig et al. 1998) for 15 min at 90 °C. Stained roots were rinsed in 2% hydrochloric acid solution for 15–25 minutes and prepared for microscopy or stored in a solution containing glycerol, lactic acid, and distilled water (1:1:1). After staining, 1 cm long root fragments were examined with a 10 × magnification objective, each root fragment being viewed in six different fields of view. For each experimental variant, 30 root fragments (180 fields of view) were examined. The occurrence of mycorrhizal fungal structures in the root fragments was evaluated and the results were calculated according to the equations of the program MYCOCALC. The mycorrhizal frequency or incidence of fungal structures in the root system (F %), the intensity of mycorrhizal colonisation in root fragments (m %), the mycorrhizal intensity in the root system (M %) in the studied samples (a %), and the amount of arbuscules throughout the root system (A %) were calculated.

To assess the number and activity of soil microorganisms, the soil was collected during the flowering of beans and at the end of the vegetation period simultaneously with plant analyses. The soil was stored at +4 °C until analysis. The number of microorganisms was calculated as the weighted average of two consecutive dilutions (each in triplicate).

All soil microbiological analyses as well as the microbiological activity analysis are expressed per unit mass of dry soil. The soil was dried at 105 °C for 24 hours.

Statistical analysis of data

Two-way and three-way analysis of variance (ANOVA) was used to assess the significance of the inoculation variants and the significance of vegetative parameters. The results are considered significantly different if $p < 0.05$. In the graphs, the error bars show the smallest significant difference (RS).

Correlation analysis and factor analysis were performed in the SPSS program to evaluate the relationships between the intensity of symbiosis formation, mycorrhizal frequency, arbuscular formation intensity in the bean root system, and plant vegetation parameters.

The effect of the inoculation variant on the vegetation parameters and yield of the beans in comparison with control is characterized by a coefficient in the range from -1 to 1.

The colours corresponding to the coefficients are shown in Fig. 1.

RESULTS

Comparison of the activity of pure cultures of rhizobia

The rhizobia strains for the experiments were selected based on the data of the previous rhizobia research period in the second half of the 20th century. During this time the most significant amount of data on the occurrence and effectiveness of the *Rhizobium* bacteria in beans in Latvian soils was obtained by prof. V. Klāšens. However, with the change of cultivated bean cultivar, agronomic techniques, and climatic conditions, studies of the interaction and effective symbiosis of the rhizobia and legumes have still not lost their relevance not only in Latvia, but also in the world. More attention is being paid to the biochemical factors determining the formation of symbiosis, evaluating the role of both microorganisms and host plants in the formation of interactions.

The efficiency of the *Rhizobium* bacteria in reducing molecular nitrogen to ammonium ions depends on the enzymatic activity in the cells. The intensity of various biochemical processes is one of the ways to evaluate the activity and efficiency of the rhizobia. Dehydrogenases are involved in a number of biochemical reactions in the nodule, so it is one of the groups of enzymes that characterize the intensity of processes in the nodules.

Different dehydrogenase activity was also found for the *Rhizobium* strains selected for the experiments (Fig. 2). Dehydrogenase activity in the bacterial suspension was compared 48 h after inoculation in the new medium.

Only the bacterial strains RP101, RV407 had a lower value than the average dehydrogenase activity of the tested bacteria. The enzymatic activity in the

nodule is associated with a more efficient reduction of molecular nitrogen and the transport of reduced nitrogen compounds from nodule to the host plant.

The activity of rhizobia strains was tested on plants by growing inoculated seeds in sterile sand. Comparing the size of the formed nodules, no strong correlation could be found with the activity of pure culture dehydrogenases. Not all strains of rhizobia formed equally large nodules on the bean roots. The smallest were those with RV501 and RP023, the weight of 100 nodules was 3.02 and 3.44 g respectively. The difference in weight of 100 nodules between bacterial strains was more pronounced than the dehydrogenase activity. When determining the correlation between dehydrogenase activity and nodule weight, a moderately close to close correlation was found. The correlation coefficient ranged from 0.50 to 0.99. It cannot be unequivocally stated that all rhizobia strains will have a higher dehydrogenase activity in larger nodules. The rhizobia strain RV505, which had the highest dehydrogenase activity, formed medium-sized nodules (100 nodules weighed 4.97 g), while the strain RP110 (7.44 g) formed the largest nodules.

The comparison of rhizobia strains was continued in non-sterile conditions. The formation of symbiosis and the nodule parameters of the rhizobia strains RP023, RV301, RV407, and RV501 were also compared for the beans 'Bartek' in the vegetation pot experiment in the greenhouse under controlled conditions. The beans were grown in a greenhouse in vegetation pots until flowering. Upon evaluating the mass of 100 nodules, dry matter of the nodule, and dehydrogenase activity, the biggest differences were found between the weight of 100 nodules. The largest nodules were formed by the strain RP023 (8.98 g), but the smallest nodules were formed by the strain RV407 (2.52 g). The content of dry matter ranged from 20.1 % to 21.4 %. The highest dehydrogenase activity (DHA) was determined for the strain RV501 (16.1 INT g INTF mL⁻¹). A moderately close correlation was detected between nodule mass and dehydrogenase activity ($r = 0.69 > r_{0.05, 60} = 0.253$).

The rhizobia strain RP407 did not show top results in any of the experiments but was chosen for the inoculation of the bean seeds due to it being among the best performers when examining rhizobia strains that could be isolated from the nodules on bean roots.

Comparing the formation of nodules in vegetation pots and field experiments, it was discovered that the formation and optimal rate of symbiosis depend on the complex effect created by the selected bacterial strain, bean variety, and soil. It might be explained not only with the properties of the soil, but also the naturally occurring population of microorganisms in the soil and the competitiveness of the *Rhizobium* bacteria.

For several bean cultivars ('Laura', 'Fanfare', 'Boxer', 'Isabell', 'Taifun', 'Vertigo', 'Fuego') inoculated with the *Rhizobium* strain RV407, nodule weight and dehydrogenase activity in the nodule were also evaluated in field trials. A moderately strong correlation was found between nodule weight and

dehydrogenase activity. The critical value of the correlation coefficient in 2015 was $r = 0.85 > r_{0.05, 160} = 0.16$ for inoculated plants, but $r = 0.68 > r_{0.05, 160} = 0.16$ for non-inoculated plants. In turn, in 2016 the inoculated plants had a correlation coefficient of $r = 0.75 > r_{0.05, 70} = 0.23$, but the non-inoculated plants had $r = 0.62 > r_{0.05, 70} = 0.23$.

An effective symbiosis promotes protein synthesis in the plant. Depending on the variant of the inoculum, the analysed field bean cultivars had a different amount of protein in the bean shoots. The protein content did not differ significantly between the cultivar, but it differed between the inoculated and non-inoculated variants (Fig. 3). The inoculated plants had a significantly higher protein content in the cultivars 'Laura' and 'Fanfare' ($RS_{0.05} = 1.72$). The inoculated plants of both these cultivars exhibited a higher dehydrogenase activity in the nodules. The inoculated plants of the cultivars 'Boxer' and 'Isabell' had a higher dehydrogenase activity in the nodule, however, the amount of protein in the stems did not differ from that of the non-inoculated plants. Only the inoculated plants of the cultivars 'Taifun' and 'Vertigo' had a lower dehydrogenase activity and protein accumulation. Both cultivars had formed smaller nodules, which leads to the conclusion that an unsuitable strain of the rhizobia had been chosen for inoculation.

A larger difference between the new nodules was found in field experiments, where the bacteria used for inoculation had to compete with the natural soil microbiota. The local population of the rhizobia can form from strains with a different genome structure, physiological properties, and nitrogen fixation efficiency.

The effect of the cultivation site on the activity of the *Rhizobium* bacteria could be verified in an experiment with four bacterial strains in two experimental sites with different soil types – peaty loam (LI2014_A) and sod podzolic soil (LI2014_B). Soil type affects the nutrients available not only to plants but also to microorganisms. More suitable soil for plant growth may lead to more favourable conditions for symbiosis, while unsuitable soil conditions may alter the composition of metabolites released by the plant root, which may limit the activity of the rhizobia. The nodules found on bean roots in podzolic soil were smaller than those in peat soil, but for the cultivar 'Bartek' all the tested bacterial strains formed significantly larger nodules than for control plants (Fig. 4). For beans growing in peat soil, the nodules were larger, but out of all the bacterial strains used for inoculation only RP023 and RP110 formed larger nodules on 'Bartek' roots than on the control variant; for 'Karmazyn' this was observed with the strains RP023 and RV407. In the variants with the bacterial strain RP023, nodule weight was higher than in the experiment in which the inoculated plants were grown in sterile sand, where the mass of 100 nodules was 3.44 g for the strain RP023, but 5.37 g for the strain RV407.

The interactions between different symbionts are influenced by environmental factors. One of the most important is the ambient temperature during the formation of the symbiosis. By not only inoculating the seeds with the rhizobia, but also performing double inoculation with mycorrhizal fungi, the effect of temperature on the germination process and exudates was determined.

When germinating seeds at different temperatures, different primary root growth was observed, which could also affect the synthesis and exudation of flavonoids as one of the main groups of biochemical signals. When inoculated seeds germinate, the composition of flavonoids changes (Table 2). In 77% of the cases the presence of microsymbionts reduced the flavonoid concentration. The most significant effect was observed in the variants where the seeds were inoculated with mycorrhizal fungi and in the double inoculation variants. In the variants where the seeds were inoculated only with the rhizobia, a significant difference was observed in only 9.4% of the samples. Comparing the effect of the analysed temperatures, a greater reduction in the amount of flavonoids was observed at 12 °C.

Continuing to grow beans in vegetation pots under greenhouse conditions until the beginning of flowering (BCHH 50–53), the results did not show a statistically significant difference in fresh root and shoot mass and dry matter. Only a tendency was discovered for inoculated plants to form a higher weight of the aboveground part in comparison to non-inoculated plants. The highest ratio of the aboveground parts to roots was found in the plants inoculated with mycorrhizal fungi. In these inoculation variants, the average root-to-shoot ratio was 0.60, ranging from 0.49 to 0.71. The lowest ratio was in the variants where the seeds were inoculated only with the *Rhizobium* bacteria. In these variants, the average ratio was 0.48, ranging from 0.42 for the variety ‘Bartek’ to 0.53 for the variety ‘Lielplatone’. In most cases, inoculation with the rhizobia reduced root growth.

From the results it can be concluded that the ability of some *Rhizobium* bacteria to form symbiosis with beans depends not only on the properties of the soil, but also on the variety of the bean and the microbial activity in the soil. Several parameters should be used to select the most suitable rhizobia strains and characterize their efficacy. The activity of the *Rhizobium* bacteria in the nodule cannot be characterized only by the weight and dry matter of the nodule; their biochemical activity must also be evaluated. According to the results none of compared strains (RP023, RV301, RV407, RV501) can be considered suitable for all the cultivar and types of soil. Therefore, it is useful to form associations of several bacterial strains and also perform double inoculation with mycorrhizal fungi.

Incidence of mycorrhizal fungi in bean roots

Legumes, including beans, are plants that form symbiosis with both the *Rhizobium* bacteria and mycorrhizal fungi. The occurrence of mycorrhizal fungi and the intensity of mycorrhizal structures in the bean root system were evaluated in field and vegetation pot experiments. The formation of symbiosis is influenced by a number of biotic and abiotic factors, so, when comparing the incidence of mycorrhizal fungi in bean roots harvested in different experimental fields and inoculation variants, different incidence and intensity of mycorrhization can be observed. Even in some of the root samples collected of a single variant no fungal hyphae could be detected, while others were intensively mycorrhized. The degree of mycorrhizal colonisation of the roots was higher in the plants whose seeds were inoculated with the preparation of mycorrhizal fungi, but the degree of nodulation caused by the rhizobia was slightly lower. When non-inoculated plants were additionally fertilized with mineral nitrogen, only in some cases a higher degree of mycorrhization could be observed. To form an effective mycorrhiza, it is necessary to have not only fungal hyphae in the roots, but also arbuscules. Assessing the correlation of the parameters characterizing mycorrhization, it can be concluded that intensive mycorrhization does not always coincide with an intensive formation of arbuscules. According to the coefficient of determination ($R^2 = 0.49$), arbuscules were formed only in 49% of the cases where mycorrhizal fungi colonised plant roots. The formation of arbuscules can also be affected by the interaction between the plant and mycorrhizal fungi.

Different degrees of mycorrhization could be observed by comparing the occurrence of mycorrhizal fungi in the roots of the cultivars 'Lielplatone', 'Fuego', and 'Bartek' grown in the same conditions (Fig. 5).

The highest incidence of mycorrhizal fungi in the root system was found in the cultivar 'Lielplatone'. The difference between cultivar was statistically significant ($p = 0.00014$). The incidence of arbuscules in root fragments was also higher for 'Lielplatone', ranging from 5.12 to 6.55%, but for 'Fuego' and 'Bartek' it remained between 0.90 and 3.60%. Arbuscules ensure metabolism between the plant and mycorrhizal fungi. The results indicate that the degree of root colonisation with mycorrhizal fungi depends on the bean variety.

Legumes can also develop symbiosis with indigenous mycorrhizal fungi in the soil, considering that certain structures of mycorrhizal fungi were also observed in the control variant. However, results obtained in both vegetation pot and field experiments showed that seed inoculation has a positive effect on the intensity of mycorrhizal colonisation and abundance of arbuscules.

Summarizing the results of the experiment LI_2015, there was a significant ($p = 0.035$) difference between control and the variant where seeds were inoculated with the mycorrhizal fungus preparation. Differences were observed in both parameters – the frequency of mycorrhizal structures in the root system

(F%) and the intensity of arbuscules formation (A%). The inoculation of bean seeds with the rhizobia and the double inoculation caused an increased abundance of mycorrhizal fungi and arbuscules, but the difference from control was not statistically significant. The abundance of arbuscules was more intensive in the double inoculation variants (Fig. 6).

Comparing the occurrence of mycorrhizal fungi in the roots of the cultivars 'Karmazyn' and 'Bartek', it was found that for the cultivar 'Karmazyn' there is a significant difference in the degree of root colonisation with mycorrhizal fungi in different growing sites (Fig. 7). In the experiment LI2014_A, the frequency of mycorrhiza in the roots was lower for the beans grown in peat soil than those grown in podzolic soil (LI2014_B). The difference was statistically significant both for the frequency of mycorrhiza in the root system ($p = 0.025$) and the abundance of arbuscules ($p = 0.031$).

No statistically significant difference was found when assessing the effect of inoculation with the rhizobia on the incidence of mycorrhiza in the roots. Only 'Karmazyn', when inoculated with the strain RV505, exhibited a propensity for a higher frequency of mycorrhiza in roots in both soils. The intensity of the abundance of arbuscules in the roots was higher with the bacterial strain RP003 in sod-podzolic soil, as well as with the bacterial strain RV505 in peaty soil. For the cv. 'Bartek', the difference between the two sites was less pronounced, however, the effects of the *Rhizobium* strains used for inoculation could be observed.

In podzolic soil, the incidence of mycorrhiza in the roots is higher with the strain RV407, but the intensity of mycorrhiza (M %) and the abundance of arbuscules (A %) was lower. The intensity of the mycorrhizal colonisation of the bean roots in peat soil was similar in the variants inoculated with the *Rhizobium* strains RP023, RV505, RP003, but the abundance of arbuscules was higher with the bacterial strain RV505.

A different degree of root mycorrhization was found not only in soils with different properties, but also for both groups of beans – large-seed and small-seed beans (Fig. 8). The formation of mycorrhizal symbiosis was more pronounced in small-seed cultivar. For large-seed cultivars 'Bartek' and 'Karmazyn', the frequency of mycorrhizal structures and arbuscules was less pronounced.

For bean seeds inoculated with different *Rhizobium* strains, various intensities of the frequency of the mycorrhiza and arbuscular abundance were observed in both types of trials: vegetation pots and field. Therefore, in the field trials of 2017 the beans were inoculated with a combination of two *Rhizobium* strains (RP023 and RV407). The effect of inoculation was more pronounced for cv. 'Lielplatone'.

The incidence of mycorrhizal structures in bean roots was slightly higher (statistically insignificant) in the control variant, however, the mycorrhizal intensity (M %) and abundance of arbuscules (A %) were higher in the

inoculated variants. For the cv. 'Fuego', significantly ($p < 0.05$) more arbuscules were formed only in the variant with the mycorrhiza fungus preparation. The application of mineral nitrogen fertilizer after seed germination did not promote the abundance of mycorrhizal fungi in the bean roots.

A more intense formation of arbuscules promoted the protein accumulation in the seeds of cv. 'Lielplatone', but for large-seed cultivars the amount of arbuscules did not correlate with the protein content in seeds. The mycorrhizal fungi colonisation in bean roots was less common for large-seed cultivar.

Interaction of soil microbiota and inoculum

The formation of symbiotic relationships between plants and microorganisms can be influenced by the microorganisms in the rhizosphere, because the natural microbiota of the soil and the strains introduced with the inoculum can change the conditions in the rhizosphere. The natural microbiota can actively compete with the introduced bacteria and mycorrhizal fungi for the possibility to form symbiosis with plants. An active inoculum's microorganisms may, in interaction with the host plant, alter the environmental suitability for the different rhizosphere microbiota groups and the ratio of bacteria and microscopic fungi.

In the vegetation pot experiments of 2016 and 2017 the number of bacteria and microscopic fungi in the bean root zone at the beginning of flowering (BBCH 60–65) in the inoculum variants was compared, revealing certain differences. Although the vegetation pots provided the plants of all variants with equal growing conditions, at the same time the root system was limited in volume. Therefore, differences in the changes in the number of aerobic bacteria and microscopic fungi in different inoculation variants manifested more sharply. Comparing the results of both years of vegetation, it could be concluded that the number of bacteria increased only in the rhizobia strain RP023. In other variants, the number of bacteria and microscopic fungi decreased on average by 11 to 27 %. In the variants where the plants were inoculated only with mycorrhizal fungi, the total number of bacteria decreased, but the number of fungi increased insignificantly on average by 3.2%. In the variants with double inoculation, the number of microorganisms decreased only in some variants (RV407M), but in others it increased on average by 0.7 to 8.4%. Changes in the number of microorganisms may have been influenced by root secretions, the composition of which may vary from the physiological state of the plant.

The interaction of different microorganisms associations used in inoculation with soil microorganisms and plant roots could be verified in the experiment VT_2017 with beans cv. 'Bartek'. The number of bacteria in the variant with mycorrhizal fungi ($5.30 \cdot 10^6$ cfu per g of dry soil) and in the double inoculation

variant ($4.61 \cdot 10^6$ cfu per g of dry soil) was higher than with the rhizobia alone ($3.74 \cdot 10^6$ cfu per g of dry soil). The number of microscopic fungi was also the highest in the variant with mycorrhizal fungi ($2.9 \cdot 10^4$ cfu per g of dry soil), but the lowest with the rhizobia ($1.41 \cdot 10^4$ cfu per g of dry soil). The microbiological activity was equivalent in the double inoculation variant as well as those inoculated separately with the rhizobia and mycorrhizal fungi.

Comparing the changes in the number of bacteria and microscopic fungi in the rhizosphere of bean root during flowering and before harvesting in experiment LI_2017, it was found that the changes in the number of microscopic fungi were larger for the cultivar 'Lielplatone', where the number of microscopic fungi in the root zone increased. For the cv. 'Fuego', an increase in the number of microscopic fungi was observed only in the variants with the rhizobia (R) and mycorrhizal fungi with additional mineral nitrogen (MN). At the end of the vegetation period, there was a significant ($p < 0.05$) increase in the number of rhizobia in the root zone for both cultivars.

In field experiments, when comparing the activity and number of microorganisms the differences between the inoculum variants were less pronounced than in the vegetation pots. Higher activity of microorganisms in the variants with mineral nitrogen fertilizer indicates the importance of nitrogen in the activity of microorganisms (Fig. 10).

For both cultivars, the number of bacteria in the bean root zone was lower before harvest than during flowering, but the number of microscopic fungi increased. Similarly to 2016 in 2017 the changes in the amount and activity of microorganisms were more pronounced for the cv. 'Fuego' (Fig. 11). The effect of the microorganisms used in inoculation on the activity of microbiological processes in the plant rhizosphere is also evidenced by the moderate correlation between the changes in the number of bacteria in the rhizosphere and the intensity of mycorrhiza in bean roots ($r = 0.48$).

The survival of mycorrhizal fungus propagules in the soil was also confirmed by experiments in vegetation pots, in which the beans were sown again after one year. Analysing the degree of mycorrhization of cv. 'Lielplatone' and cv. 'Bartek', it was observed that the occurrence of mycorrhiza in the plant roots grown in the soil, where the previously inoculated plants were cultivated, exceeds the control variant by 5.5 to 34.3%.

Influence of inoculation with rhizobia and mycorrhizal fungi on bean (*V. faba* L.) growth and yield formation

Vegetative parameters were analysed when beans reached flowering stage. Because bean flowers bloom gradually, in some experiments there were variants in which pods had already formed instead of the first flowers. There was no statistically significant difference between the inoculation variants in

the vegetation pot experiments, but in some cases a difference was found in the field trials. The vegetation parameters of plants were analysed during flowering. The amount of chlorophyll, dry matter, and protein content in leaves was compared.

In the experiment VT2014 it was found that dry matter and protein content varied in the shoots of beans inoculated with different rhizobia strains. Summarizing the results of three-year-long vegetation pot experiments, in which beans were inoculated with two strains of the rhizobia alone or together with mycorrhizal fungi, varied results were obtained. Plants treated with the strain RP023 had the lowest chlorophyll content in the leaves as well as the lowest dry matter and protein content. For plants inoculated with the rhizobia strain RV407, the pigment content was also lower than that of the control but higher than that of the RP023 strain. Double inoculation with RV407 and mycorrhizal fungi promoted higher accumulation of dry matter than in the control variant. The highest protein content in the leaves was in the variant inoculated only with mycorrhizal fungi. In contrast, when evaluating the vegetative parameters of the plants, in 2016 the rhizobia strain RP023 showed better results compared to the rhizobia strain RV407. The amount of dry matter in the shoots was lower in the plants inoculated with RV407. The results were similar for the cv. 'Karmazyn', but a different response to double inoculation was observed. Although the difference was not statistically significant, the plants exhibited a tendency for the aboveground weight, number of leaves, protein content in the shoots to be higher in the variants with the rhizobia strain RP407 and double inoculation with mycorrhizal fungi.

A three-year vegetation pot trial of with two bean seed cultivars 'Bartek' and 'Karmazyn' showed that the rhizobia strain used for inoculation and treatment with mycorrhizal fungi had no statistically significant effect on the accumulation of dry matter in the plant shoots. The dry matter content ranged from 104.2 to 110.5 mg g⁻¹ ($p = 0.99$, $RS_{0.05} = 44.82$ for the effect of the strain and $RS_{0.05} = 36.60$ for the mycorrhiza).

Inoculation with *Rhizobium* proved to have a significant effect on plant weight during flowering. The average weight of one plant ranged from 15.2 to 26.9 g. The heaviest plants were those of the control variant and the variants inoculated only with mycorrhizal fungi, but the differences between them were not statistically significant ($p = 0.47$, $RS_{0.05} = 3.39$). The plants inoculated with the rhizobia were significantly lighter than control ($p = 0.0001$, $RS_{0.05} = 4.15$). The effects of both bacterial strains, RP023 and RV407, were not the same. On average, the weight of the plants inoculated with strain RV407 was 29% lower, but in the double inoculation variant it had dropped by 34% in comparison with RP023. Data analyses show that in 61.8% of the cases changes in plant weight are explained by inoculation with bacteria, but only 1.1 % of them can be associated with mycorrhizal fungi. The microorganisms used for inoculation consume photosynthetic products and therefore may inhibit plant growth. The

diversion of photosynthetic products to microorganisms may be the reason why the plants in the double inoculation variants had lower weight.

Different interactions of *Rhizobium* strains with beans were found by comparing the vegetative parameters of the cultivars 'Bartek' and 'Karmazyn' in the experiments LI2014_A and LI2014_B. The experiment LI2014_A was arranged in peat soil with a higher amount of nutrients compared to the sod-podzolic soil in the experiment LI2014_B. The influence of different rhizobia strains on the physiological processes of the plant was variety-specific. For the cv. 'Bartek', inoculated plants showed a negligible reduction in pigment content compared to control, while for the cv. 'Karmazyn' the strains RP023 and RV505 enhanced it. The chlorophyll content in control plants was 33.7 units on average, while for RP023 and RV505 it was 36.6 and 36.5 units, respectively. The cv. 'Karmazyn' inoculated with the strain RP023 developed larger nodules than the control plants, so it can be concluded that a more efficient symbiosis was formed.

The ratio of vegetative parameters in the inoculated variants to control in both experimental sites for the cultivar 'Bartek' is summarized in Figure 12.

Comparing the influence of the rhizobia on plant parameters, a significant effect of the variety was found, which differs in various growing sites. Soil with a lower nutrient content had a significant effect of the rhizobia. In the experiment LI2014_A, only some parameters exceeded the control variant. In general, only the rhizobia strain RV407 allowed to obtain a better result than in control (Fig. 12).

A different result was obtained for the cv. 'Karmazyn' (Fig. 12). Summarizing the inoculation effects, it can be stated that inoculation with the *Rhizobium* bacteria did not significantly improve plant growth at any of the test sites. A slightly better result was obtained in the experiment LI2014_A with the bacterial strains RP023 and RP505.

In the experiment LI2014_C the largest difference between plants inoculated only with the rhizobia and the double inoculation variants was observed with the bacterial strain RP023. The protein content in bean leaves was higher in the variants with mycorrhizal fungi, but the difference was significant only with the bacterial strain RV407 ($p < 0.05$). The shoots of the plants inoculated with RV407 had less protein in both the bacterial RP023 variant and control, however, this variant had the largest effect of mycorrhizal fungi.

In the experiment LI2015_A two small-seed bean cultivar, 'Lielplatone' and 'Fuego', and two large-seed bean cultivar, 'Bartek' and 'Karmazyn', were grown. For the cultivar 'Lielplatone', the plant weight did not differ significantly between the variants inoculated only with the rhizobia, but a difference could be detected in the double inoculation variant with the bacterial strain RP023. The plant weight was lower in the double inoculation variant. Inoculation with mycorrhizal fungi without the rhizobia also reduced plant

weight. A similar result was obtained with the variety 'Fuego', but in this case the plant weight was significantly lower for the double inoculation variant with the bacterial strain RV407.

The amount of accumulated dry matter in the bean shoots did not differ significantly between the variants ($p > 0.05$), but it could be observed that double inoculation with the rhizobia strain RV407 and mycorrhizal fungi led to an increased protein content in both cultivars. For large-seed beans, the difference between the variants with and without mycorrhiza was less pronounced.

In the experiment LI2016_A the vegetative parameters were analysed when the beans had reached the 50th to 59th stage ('Fuego') and 65th to 68th development stages ('Lielplatone') according to the BBCH classification. The cultivar inoculated with *Rhizobium* were significantly lagged in development ($p = 0.003$), while the inoculation of seeds with mycorrhizal fungi had a significant effect on 'Lielplatone' ($p = 0.007$). Plants inoculated with mycorrhizal fungi had reached developmental stages 66 to 68 and those not inoculated – 63 to 66. The biggest difference was in the double inoculation variant with the bacterial strain RP023. In this variant, on average, plant development differed by 3 stages. For the cultivar 'Lielplatone', the average plant weight in the control variants differed significantly from the plants inoculated with bacteria ($p = 0.003$, $RS_{0.05} = 12.84$). There was no significant difference between the single microsymbiont and double inoculation variants. The dry matter content in the plants did not differ significantly between the inoculants, except for those inoculated with RP023, in which the dry matter content was lower than the control ($RS_{0.05} = 0.62$), but a positive double inoculation effect was observed.

For the cv. 'Fuego', plant length was significantly affected by inoculation with mycorrhizal fungi. When inoculated separately with the rhizobia, only the strain RV407 significantly affected plant length ($RS_{0.05} = 1.88$). The length of the plants inoculated with the strain RP023 did not differ from control. In all the variants inoculated with mycorrhizal fungi alone or together with the rhizobia, plant length significantly exceeded the control variant ($p = 0.009$). Accordingly, the plants had more leaves in these variants ($p = 0.002$). Plants with better foliage create better conditions for the process of photosynthesis. The formation of optimal photosynthetic conditions has a beneficial effect on the microorganisms involved in the symbiotic association and ensures the formation of plant yield.

In the experiment LI2017, the vegetative parameters of beans were analysed 62 days after sowing (26.06). At this time, there was no significant difference in plant development between the variants, but it differed between cultivar ($p < 0.0002$). The cv. 'Lielplatone' had reached stage 62 to 67, but the cv. 'Fuego' had reached stage 62 to 74. Seed inoculation with mycorrhizal fungi significantly affected plant growth ($p = 0.0002$) the in variants in which the

seeds were not inoculated with the rhizobia. Plant weight was also higher in the variants with mycorrhizal fungi, but a significant difference ($p = 0.036$) was observed only in the variant with additional nitrogen fertilizer. However, the dry matter content of the variant with mycorrhizal fungi and additional nitrogen fertilizer was significantly lower.

For the cv. 'Fuego', the plant length was higher only in the variant with mycorrhizal fungi and additional nitrogen, but the difference was not statistically significant. Significantly higher plant weight ($p = 0.0063$) was in the variant where the seeds were inoculated with mycorrhizal fungi and the rhizobia, as well as mycorrhizal fungi and additional nitrogen fertilizer.

Evaluation of vegetative parameters against control in the experiment LI2017 (Fig. 13) for cv. 'Lielplatone' and cv. 'Fuego' showed a positive effect of mycorrhizal (M) and double inoculation (RM) variants. The mycorrhizal variant with additional nitrogen fertilizer wasn't better than the double inoculation variant. These results suggest that the two microsymbionts are able to compensate each other's nutrient needs and other interactions between them take place.

The inoculation of seeds with individual strains of *Rhizobium* did not show significantly better results in all experiments. Therefore, it is useful to use associations of rhizobia strains. In the case of double inoculation, the use of a rhizobia association may reduce the negative effects of an inappropriate combination. As observed in the experiments, the *Rhizobium* strains RP023 and RV407 may show different effects for different bean cultivar.

Interactions between plants and microorganisms can improve plant growth and physiological processes, but can also lead to stress. Changes in the parameters of the photosynthesis process are a sensitive indicator in response to a stressful situation. The most significant change was shown by the plant vitality index (PI), which decreased for 'Lielplatone' and increased for 'Fuego'. The decrease in the vitality index characterizes a period of unfavourable conditions for the plant. The efficiency of the reaction centres of the photosynthesis process is characterized by the ratio of variable fluorescence to maximum fluorescence (Fv/Fm), which depends on the quantum efficiency of the second photosystem. For the cv. 'Fuego', the ratio was below optimal (0.79–0.84) only in June. The lowest value was for control (0.67) and the plants inoculated with mycorrhizal fungi (0.69). For the 'Lielplatone' variety, the Fv/Fm ratio was below optimal in all variants and ranged from 0.70 to 0.75. Between measurements, the ratio value increased slightly only for the variant with additional nitrogen fertilizer. The photochemical activity (Fv/F0) of the active centers of photosynthesis also decreased for cv. 'Lielplatone'.

The results of chlorophyll fluorescence are consistent with changes in the chlorophyll content in bean leaves during June and July. The change in the chlorophyll content was not significant for the cv. 'Lielplatone'. There was a slight increase in the chlorophyll content in the double inoculation variant in

July, but the difference was not significant. There were similar fluctuations in the chlorophyll fluorescence parameters. The chlorophyll content of bean leaves increased significantly ($p < 0.001$) in July compared to June. There were similar changes in the fluorescence parameters. Fluctuations in the pigment content and the state of the photosynthetic reaction centres may indicate that the two cultivar did not have similar growth conditions.

The chlorophyll content and fluorescence parameters, as well as the ratio of different pigment groups in the leaves are an indicator for the evaluation of plant growth conditions. The sum of chlorophyll and the ratio of chlorophyll a to b are more commonly used. Changes in pigment content and the operation of the photosynthesis system are also recognized parameters to characterize the efficiency of symbiotic fixing of molecular nitrogen from the atmosphere. Sometimes the results of field and vegetation experiments are contradictory. For example, with the rhizobia strain RP023 alone and in combination with plants inoculated with mycorrhizal fungi, VT2014 showed a lower pigment content (40.3 and 40.1 units, respectively) compared to plants in the field experiment (LI2014_C), 41.1 and 41.8 units, respectively.

After the experiments in 2014 and 2015, it was found that the use of certain *Rhizobium* strains for seed inoculation does not guarantee the development of an effective symbiosis. Therefore, associations of *Rhizobium* strains have been established for inoculation. Two associations were formed, where R1 (RP023, RP003) combined rhizobia strains isolated from pea roots and R2 (RV407, RV505) – rhizobia isolated from the bean root nodule. In 2016, a trial in vegetation pots was arranged (VT2016_B). In the flowering stage, analysing the amount of chlorophyll in the leaves, a significant difference ($p = 0.0001$) was found between the variants in which the plants were inoculated with rhizobia associations, mycorrhizal fungi, double inoculation, and control. The amount of chlorophyll in the leaves of the control plants was 37.7 units, but in the inoculated plants it ranged from 41.2 to 45.8 units ($RS_{0.05} = 2.96$). The highest chlorophyll content was in plants inoculated only with mycorrhizal fungi (45.8 units). The two rhizobia associations had a similar effect on dry matter accumulation in plant shoots. The dry matter content was not significantly differed between the inoculum variants, although both double inoculation variants had lower chlorophyll contents than the variants where the microsymbionts were used alone.

Experiments VT2017 and LI2017 were set up with a rhizobia association consisting of two bacterial strains – RP023 (isolated from the pea root nodule) and RV407 (from the bean root nodule). There were no significant differences in plant length and number of leaves, but the weight of 10 leaves and the dry matter content in them differed (Table 3). Lighter leaves and lower dry matter content were in the variants with mycorrhizal fungi and in the double inoculation variant. However, higher pigment content was in the variant where the plants were inoculated with mycorrhizal fungi.

The content of pigments in the leaves and the ratio of the weight of the aboveground parts to the weight of the roots indicate favourable conditions for plant growth.

As it turned out in the model experiments, the effect of the inoculum on plant root growth could already be detected during germination and in the early stages of plant growth, therefore the weight of bean leaves and roots was compared in vegetation experiments. However, it is not known whether significant effects persist throughout the growing season. For the cv. 'Bartek', no significant differences were detected. In the experiment VT2016_A, the cv. 'Karmazyn' had higher root weight in the control and double inoculation variants with the bacterial strain RP023. In the experiment VT2017, it was found that the root weight did not differ significantly between the plants inoculated with the mycorrhiza, however, in the double inoculation variants it was slightly higher than in the plants without the *Rhizobium* inoculum. The shoot to root ratio in the control variant was 0.86, but for the plants inoculated with mycorrhizal fungi – 1.05, for double inoculation – 0.93, for inoculation only with the rhizobia – 0.81.

The lowest water loss, meaning the best water retention capacity for both cultivar, was observed in the variant where the plants were inoculated with mycorrhizal fungi. The largest water losses were in the control variants for the cv. 'Lielplatone' and the cv. 'Fuego' in the control and rhizobia variants. Comparing the two cultivars, it can be seen that 'Lielplatone' had lost more water, indicating that the plants did not have optimal growth conditions, which is also confirmed by the evaluation of the chlorophyll fluorescence photosynthesis system. The smallest water losses during the analysis were observed control and the plants inoculated with mycorrhizal fungi. Plants inoculated with rhizobia associations lost more water. The different interactions of the two associations with plant and mycorrhizal fungi were also manifested. Plants inoculated with the first association (R1) lost less water than those inoculated with the second association (R2). The addition of mycorrhizal fungi changed the effect and the water loss was lower for R2M compared to R1M. The inoculation with mycorrhizal fungi provided the plants with better growth conditions, as evidenced by the chlorophyll content in the leaves, the accumulated dry matter, and the water retention capacity.

It can be concluded from the evaluation of vegetative parameters that the effect of the inoculum on the plant varies from year to year, and the effect of the cultivar can be observed as well.

The decrease in plant weight can be explained by the formation of symbiotic systems, during which microsymbionts consume organic compounds synthesized by plant photosynthesis. When a symbiotic association is created, the rhizobia supply not only the plant but also mycorrhizal fungi with additional mineral elements by fixing molecular nitrogen from atmosphere. With the formation of a wider mycorrhizosphere, both the plants and rhizobia

are additionally supplied with phosphorus, which is needed in biochemical processes. As a result of efficient symbiosis, plants can meet their needs and microsymbiont requirements through photosynthesis.

To assess the yield-forming parameters (number of stems, pods), the plants were collected directly before harvest. Protein content was determined in the seeds.

The effect of the inoculum on the yield was different. The inoculation of plants with mycorrhizal fungi had a positive effect on the yield formation and protein content. The general trend was the following: in the variants with double inoculation (the rhizobia with mycorrhizal fungi), the yield was higher than in control. The strain RP023 and mycorrhizal fungi elevated the yield by 6%, but RV407 by 11% compared to control. The inoculation with mycorrhizal fungi alone increased the yield by 13% compared to control. The inoculation with mycorrhizal fungi also contributed to a higher protein content in the stems during the growing season compared to control. The inoculum had a significant ($p = 0.007$) effect on protein accumulation in the seeds. Comparing the inoculation with individual *Rhizobium* strains, the amount of protein in the seeds was higher in the plants inoculated with the strain RV407 (30.7%), but with RP023 (29.5%) it was lower. The lowest amount of protein was in the control (27.2%).

Better photosynthetic conditions may have contributed to the increased yield, as in most cases mycorrhizal fungi had higher levels of chlorophyll in the plants. For the 'Bartek' variety in the 2014 trials, the largest difference between the inoculation exclusively with bacteria and double inoculation was found for RP023. In the non-inoculated variants with mycorrhizal fungi the correlation coefficient was $r = 0.66 > r_{0.05, 24} = 0.40$, but $r = 0.69 > r_{0.05, 24} = 0.40$ in the inoculated. Summarizing the results of three years, it was found that inoculation with the rhizobia has a significant effect on protein accumulation both in the leaves at the beginning of flowering ($p = 0.04$) and in the seeds ($p = 0.001$). The inoculation with mycorrhizal fungi only had a negligible effect ($p = 0.91$ and $p = 0.68$). Different effects of the *Rhizobium* strains could be observed (Table 4).

Under favourable growing conditions and with an efficient symbiotic system, an optimal plant weight should be established in order to obtain a seed yield with a high protein content. Comparing the vegetative parameters and protein accumulation in shoots and seeds, a correlation between dry matter and plant weight was found both in the variants inoculated with mycorrhizal fungi ($r = 0.81 > r_{0.05, 36} = 0.33$) and without inoculation ($r = 0.92 > r_{0.05, 27} = 0.38$). There was a moderate correlation between plant weight and protein content in leaves in the variants only with the rhizobia ($r = 0.51 > r_{0.05, 24} = 0.40$) and in the variants with double inoculation ($r = 0.45 > r_{0.05, 24} = 0.40$).

In contrast to the results obtained in vegetation pots (VT2014), the yield in the LI2015 experiment was significantly higher compared to control, but only

in the variant with mycorrhizal fungi. However, all the inoculation variants with mycorrhizal fungi had a higher protein content in the seeds.

Assessing the effect of the inoculation on the yield, the variety factor was more pronounced. The cv. 'Lielplatone' had a higher yield in the variant inoculated with mycorrhizal fungi and the double inoculation variant with bacteria RP023 (Fig. 14), but in both variants the protein content in the seeds was slightly lower than in the non-mycorrhizal variant. The cv. 'Fuego' had exhibited beneficial effect of double inoculation with the bacterial strain RV407 and mycorrhizal fungi, but with the bacterial strain RP023 the opposite effect was obtained.

For large-seed cultivar, higher yields were obtained only in the variants inoculated with mycorrhizal fungi without the rhizobia (Fig. 15). For the cv. 'Karmazyn', double inoculation with RV407 and mycorrhizal fungi also reduced the protein content in the seeds.

In the experiment LI2015_B the protein content in the seeds was slightly higher for the variants with mycorrhizal fungi. Double inoculation with the bacteria RV407 and mycorrhizal fungi he reduced the protein content in the cultivar 'Fuego' ($p = 0.02$, $RS_{0.05} = 0.32$) (Fig. 16).

In the experiment (LI2016_A) for the cv. 'Fuego', similarly to 'Lielplatone', the amount of dry matter in the vegetative parts of the plants did not differ significantly between the inoculation variants. However, comparing the protein content in the shoots during the vegetation period and the amount of protein accumulated in the seeds (Fig. 17), it can be seen that in most variants the protein accumulated more in the seeds with mycorrhizal fungi.

The biggest difference for the cv. 'Fuego' was between the variant inoculated only with the bacterial strain RV407 and the double inoculation variant. The opposite relationship was obtained in the variants where the plants were additionally fertilized with mineral nitrogen. In this case, in the variant with mycorrhizal fungi, the protein content in the seeds decreased.

Assessing the effect of the established symbiosis on bean yield, it was found that the addition of mycorrhizal fungi in the inoculum increases the yield in most cases (Fig. 18). The effect of mycorrhizal fungi on yield was statistically significant ($p = 0.00035$; $RS_{0.05} = 0.14$). However, the difference was not statistically significant in all of the variants. Only the double inoculation variant with the bacterial strain RP023 and mycorrhizal fungi with additional nitrogen fertilizer had a negligible effect.

Protein content in seeds in double inoculation variants was higher in both cultivars with the bacterial strain RV407. Protein increased by 0.78 percent for 'Lielplatone' and by 0.88 percent for 'Fuego'. In the variants with mycorrhizal fungi and additional nitrogen fertilizer, the amount of protein in the seeds was lower. The addition of nitrogen fertilizer reduced the amount of protein in the mycorrhizal plant seeds by 0.78 to 1.13%.

In the experiment LI2017, an association of the rhizobia was used to inoculate the seeds. When evaluating the components forming the yield, it was found that the number of pods created did not differ significantly between the variety and the inoculum variants. On average, 12–16 pods were formed per plant. The weight of 100 seeds differed between the variants inoculated with mycorrhizal fungi and those not inoculated at all. The average weight of 100 seeds for the cv. ‘Lielplatone’ was 41.3 g, but in the variants where mycorrhizal fungi were used it reached 42.9 g. The difference was statistically significant ($p = 0.02$, $RS_{0.05} = 1.32$).

The average weight of 100 seeds for the ‘Fuego’ was 54.6 g, but for the variants where mycorrhizal fungi were used it went up to 57.0 g. The difference was statistically significant ($p < 0.001$, $RS_{0.05} = 0.79$). The protein content was determined in the bean shoots during the flowering phase and in the seeds. There was a statistically significant difference between the variants where the seeds had been inoculated with mycorrhizal fungi and the control variant ($p < 0.001$) (Fig. 19). During the flowering phase, more protein was formed in the shoots of the inoculated variants.

Summary of results of inoculation experiments

The effects of soil conditions and cultivars have been identified by setting up trials at different growing sites to assess the activity and yield of the rhizobia used for inoculation. By collecting data from several growing seasons, it can be observed that inoculation has a variable effect on bean yield and quality. Protein content is an important indicator of the quality of the harvested crop. Comparing the effect of different inoculation variants on protein accumulation in the seeds, it was found that the inoculated variants have a higher average protein content than the control. Summarizing the results of protein analyses of all the analysed cultivars (Fig. 20), it can be observed that the inoculation variants with a single microsymbiont exhibited larger fluctuations around the mean values. In the variants where the inoculum was formed by separate bacterial strains, the average protein content in the seeds did not differ significantly from the double inoculation variant with mycorrhizal fungi. The protein content in the seeds is affected not only by the microorganisms used for inoculation, but also by the growing conditions. For the bacterial strains RP003, RV505, and RP110, growth site provided a significant effect. An inoculum containing several rhizobia strains (variants R and RM) had a positive effect. This reduces the impact of the particular growing site and environmental conditions on the activity of the rhizobia and their ability to form symbiosis with the beans. The positive effect of tripartite symbiosis on protein

accumulation in the seeds was also larger in the variant with the *Rhizobium* association (variant RM).

The significance of the vegetative parameters and yield changes under the influence of different inoculum variants was assessed by comparing the inoculated variants against control. The effect is expressed as a factor ranging from -1 (maximal negative effect compared to control) to 1 (maximal positive effect compared to control) and displayed on the colour chart. The values of the control variant correspond to point 0.

The changes in the vegetative parameters and yield compared to control of the cultivar 'Lielplatone' are shown on the colour map (Fig. 21). The results obtained over three years do not allow to declare one of the inoculation options as undoubtedly better than the rest. As the trials were conducted in a different field each year, it can be concluded that the conditions of the specific production site have a significant impact on the efficiency of symbiosis. In most cases, double inoculation variants have a positive effect on the plant vegetation parameters. The use of certain rhizobia strains alone is more likely to result in the introduced bacteria not being competitive with the *Rhizobium* population already in the soil or the conditions being unsuitable for an effective symbiosis. The colour map for the variety 'Fuego' (Fig. 22) also does not mark one of the inoculation variants as the best. Unlike the cv. 'Lielplatone', the cv. 'Fuego' has less variants that have proved to be better (marked with red on the map) than the control variant.

For the cv. 'Lielplatone', year 2017 was more favourable for the manifestation of symbiosis, but for the cv. 'Fuego' it was year 2016, while 2015 was less suitable for all cultivars.

For the large-seed cv. 'Bartek', the results of field trials differ from year to year (Fig. 23). If in 2014 the best result was obtained in the variant where the plants were inoculated with mycorrhizal fungi, then in 2015 the positive effect was less pronounced, although the positive trend towards yield formation remained. In 2014, the positive effect of mycorrhizal fungi on several parameters (leaf weight, 100 seed weight, and yield) was observed, but the positive effect was not fully maintained in the double inoculation variants.

The inoculation with mycorrhizal fungi showed a positive effect for the cv. 'Karmazyn' (Fig. 23). The rhizobia strain RV407 was more suitable, but double inoculation with mycorrhizal fungi was inappropriate for both of the rhizobia strains. This confirms the effect of the plant on the activity of the microsymbionts, and when choosing the right inoculum the interaction of the microsymbionts with the particular plant cultivar should also be taken into account. The cv. 'Karmazyn' and the used microorganisms in double inoculation had a negative effect on both yield and protein content in the seeds. Unsuitable growing conditions were most often found for the cv. 'Karmazyn', which also affects the performance of microsymbionts.

In most cases, the vegetative parameters of the beans (number of leaves, number of shoots, weight) did not differ significantly between the variants. Shorter and lighter stems could be found on the plants inoculated during the flowering phase. This can be explained by the insufficient intensity of photosynthesis to optimally provide microsymbionts with the photosynthesis products as well. There was also a significant difference between the parameters that could more strongly characterize the effect of microsymbionts (leaf mass and dry matter, protein content in the leaves and seeds) in some experiments.

Conclusions

1. The *Rhizobium* strains of the collection of the Institute of Soil and Plant Sciences of the Latvia University of Life Sciences and Technologies show different activity and ability to form symbiosis with *Vicia faba*. Out of all the bacterial strains that were tested it is not possible to select one that would work equally effectively in different environmental conditions. Comparing dehydrogenase activity in pure culture, the most active strain was RV505, however, its activities varied in different soil types.
2. Positive results have been obtained using associations of rhizobia strains, which allow to prevent changes in the competitiveness and efficiency of a single bacterial strain, which may be influenced by environmental factors and the natural activity of the soil microbiota.
3. The presence of mycorrhizal fungi could be detected in all the analysed soil types. The frequency of mycorrhiza in the root system (F%) and the abundance of arbuscules (A%) in small and large seed beans differed. The abundance of arbuscules in the roots of cv. 'Bartek' and cv. 'Karmazyn' was lower than that of the small-seeded bean cultivars. The frequency of mycorrhization of large-seed beans ranged from 40% to 51.1%, while in small-seed beans it extended from 65% to 97%. Accordingly, the abundance of arbuscules in large-seed cultivar ranged from 0.13% to 1.14%, but in small-seed beans – from 4.39% to 11.30%.
4. The use of mycorrhizal fungi together with the rhizobia promoted the formation of mycorrhizal structures in the roots. This was particularly pronounced when bacterial associations were used. In the double inoculation variants, higher levels of chlorophyll were detected in the plants compared to the control plants or those inoculated only with the rhizobia.
5. Supplemental mineral nitrogen fertilizer did not promote the colonisation of bean roots with mycorrhizal fungus. The average frequency of mycorrhization was lower compared to the double inoculation variants. In these variants, a decrease in the amount of protein in the seeds by 0.70–1.15% was observed.

6. Positive effects on crop yield and quality could be observed in the double inoculation variants, however, these effects were not present in every growing season. In most cases, there was only a positive trend. RV407 was more suitable for double inoculation when using separate rhizobia strains. It is useful to use an association instead of individual rhizobia strains.

Promocijas darba aprobācija / *Approbation of the Scientific work*

Zinātniskie raksti, kas indeksēti SCOPUS un /vai Web of Science datu bāzēs /
Articles with indexes in SCOPUS and/or Web of Science data bases

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. 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.
3. Dubova L., Alsina 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.
4. Karkanis A., Ntatsi G., Lepse L., Fernández J.A., Vågen I.M., Rewald B., Alsina 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., Alsina 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., Alsina 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 konferenču rakstu krājumos /
Publications in the conference proceedings

1. Šenberga A., Dubova L., Alsiņa I. (2018). Dīgstošu pupu sēklu simbiotiskā gatavība. Ražas svētki "Vecauce – 2018": Latvijai – 100, Lauksaimniecības izglītībai – 155. Zinātniskā semināra rakstu krājums. 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

Referāti zinātniskajās konferencēs / *Presentations in Scientific conferences*

1. Dubova L., Ruža A., Alsiņa I. Augsnes mikrobioloģiskā aktivitāte dažādos augsnes apstrādes un augu maiņas variantos. *Līdzsvarotā 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., Alsiņa I. The effect of double inoculation on the broad beans (*Vicia faba* L.) yield quality. International Scientific Conference *Research for Rural Development*. Jelgava, LLU2015. 13.–15. maijs. Ziņojums sekcijā.

Stenda ziņojumi zinātniskajās konferencēs un semināros /
Poster presentations in Scientific conferences and seminars

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., Alsina, 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., Alsina 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., Alsina 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., Alsina 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.