

Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātē

Lauksaimniecības fakultātē

Augsnes un augu zinātņu institūts



Mg. biol. Alise Klūga ^{id}

Promocijas darbs

**GUMIŅBAKTĒRIJU DAUDZVEIDĪBA
LATVIJAS AUGSNĒS**

**DIVERSITY OF RHIZOBIA IN LATVIAN
SOILS**

zinātnes doktora grāda (Ph.D.) iegūšanai
lauksaimniecības, meža un veterinārās zinātnēs

Promocijas darba zinātniskā vadītāja Dr. biol. Ina Alsiņa
Promocijas darba zinātniskais vadītājs Dr. biol. Nils Rostoks
Promocijas darba autore Mg. biol. Alise Klūga

Jelgava, 2023

ANOTĀCIJA

Klūga A., 2023. *Gumiņbaktēriju daudzveidība Latvijas augsnēs*. Promocijas darbs. Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte, Jelgava, 133 lpp.

Pēdējos gados tauriņziežu audzēšanas platību palielināšanai pievērsta pastiprināta uzmanība, pateicoties ne tikai tauriņziežu pieaugošajam pielietojumam pārtikā, lopbarībā, būvmateriālos un eļļas ražošanā, bet arī šo augu spējai veidot simbiotiskas attiecības ar gumiņbaktērijām un saistīt atmosfēras slāpekli, šādā veidā samazinot ķīmiskā slāpekļa mēslojuma izmantošanas nepieciešamību. Palielinoties tauriņziežu-gumiņbaktēriju simbiozes nozīmei ilgtspējīgā lauksaimniecībā, pieaug pētījumu skaits, kas veic gumiņbaktēriju taksonomiskās daudzveidības novērtēšanu. Gumiņbaktērijas pētījumos lielākoties apraksta kā α -proteobaktēriju klasei piederošas (piem., *Rhizobium*). Šīs klases gumiņbaktērijas ir plaši pētītas vairāku desmitgažu laikā. Tomēr pēdējos gados aizvien vairāk pētījumu rezultāti paplašina gumiņbaktēriju ekoloģiskās grupas jēdzienu, un tiek apsvērta šajā mikroorganismu grupā iekļaut arī baktērijas no β - un γ -proteobaktēriju klasēm. Lai gan Latvijā veikti plaši pētījumi par gumiņbaktēriju celmu efektivitātes atšķirībām, līdz šim nav veikta gumiņbaktēriju ģenētiskā identifikācija, vai tauriņziežu rizosfēras baktēriju daudzveidības noteikšana. Ģenētiskā identifikācija un daudzveidības novērtējums ir ieguldījums ne tikai fundamentālajā lauksaimniecības zinātnē, bet arī sniegtu zinātniski pamatotas vadlīnijas preparāta izveidē tauriņziežu sēklu inokulācijai.

Šī darba mērķis ir raksturot Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes (LBTU) kolekcijā esošo gumiņbaktēriju celmu daudzveidību. Lai sasniegtu šo mērķi, izvirzīti šādi uzdevumi: veikt LBTU Augsnes un augu zinātņu institūta esošās vēsturiskās Gumiņbaktēriju kolekcijas inventarizāciju; papildināt esošo kolekciju ar jauniem gumiņbaktēriju celmiem; veikt visu kolekcijā esošo baktēriju celmu ģenētisko identifikāciju; izvērtēt identificēto baktēriju celmu daudzveidību un analizēt šo daudzveidību atkarībā no saimniekaugiem un augsnes agroķīmiskajiem rādītājiem.

Pētījums veikts laika posmā no 2015. līdz 2022. gadam. Gumiņbaktēriju daudzveidības noteikšanai izmantoti jau esošie LBTU Augsnes un augu zinātņu institūta kolekcijas baktēriju celmi (izdalīti no 1962. līdz 2015. gadam), kā arī izdalīti jauni baktēriju celmi laika posmā no 2016. līdz 2019. gadam, dažādu Augsnes un augu institūta izmēģinājumu ietvaros. Molekulārās bioloģijas analīzes veiktas LBTU Biotehnoloģiju zinātniskās laboratorijas Molekulārās bioloģijas un mikrobioloģija nodaļā. Pētījums izstrādāts projektu EUROLEGUME ("Tauriņziežu audzēšanas veicināšana Eiropā proteīna nodrošināšanai pārtikā un lopbarībā ilgtspējīgas lauksaimniecības apstākļos") un LegumeGap ("Augu olbaltumvielu ražošanas produktivitātes un ilgtspējības palielināšana Eiropā") ietvaros.

Šajā pētījumā identificēti baktēriju celmi, kas izdalīti no plaša spektra tauriņziežu dzimtas saimniekaugiem, izmantojot pilna garuma 16S rRNS gēna sekvencēšanu augstākai filoģenētiskās analīzes precizitātei, salīdzinājumā ar nepilna garuma 16S rRNS sekvenču salīdzināšanu, kas ir biežāk izmantotā identifikācijas metode. Gumiņbaktēriju daudzveidība, kas tika identificēta, bija plašāka, nekā sākotnēji domāts. Lai gan *Rhizobium* sp. bija visbiežāk sastopamā identificētā ģints, identificētie baktēriju celmi pieder ne tikai pie α -proteobaktēriju klases, bet arī pie β - un γ -proteobaktēriju klasēm, kurām ir potenciāls simbiotisko attiecību rezultātā ne tikai saistīt atmosfēras slāpekli, bet arī šķīdināt augsnē esošos, bet augiem nepieejamos, fosforu savienojumus. Rezultātā atklāti jauni potenciālie baktēriju celmi, kurus varētu izmantot komerciāla gumiņbaktēriju preparāta izveidošanai.

Promocijas darba apjoms 95 lpp. (neskaitot bibliogrāfijas sarakstu un pielikumus); darbā ir 14 tabulas, 26 attēli; 302 bibliogrāfiskie avoti, kā arī 3 pielikumi.

ANNOTATION

Klūga A., 2023. *Diversity of rhizobia in Latvian soils*. PhD Thesis. Latvia University of Life Sciences and Technologies: Jelgava, 133 pages.

In the recent years, attention has been paid to increase the areas or legume cultivation, not only due to the increasing use of legumes in food, fodder, building materials, oil production, but also due to the ability of these plants to form symbiotic relationships with rhizobia, binding atmospheric nitrogen, thus reducing the need for chemical nitrogen fertilizers. As the importance of the legume-rhizobia symbiosis in sustainable agriculture increases, the number of studies that identify rhizobia genetic diversity is growing. Rhizobia are mostly described in research articles as bacteria belonging to the α -proteobacteria class (e.g., *Rhizobium*). This class of rhizobia bacteria has been extensively studied over several decades. However, in the recent years, more and more studies are expanding the concept of rhizobia bacteria and considering including bacteria also from β - and γ -proteobacteria classes in this ecological group of microorganisms. In Latvia, despite the extensive research done on rhizobia effectiveness and efficiency differences between various strains, no genetic identification of rhizobia bacteria or determination of the diversity of the legume rhizosphere has been carried out. Genetic identification and diversity assessment contribute not only to the fundamental agricultural science but also provide science-based guidelines for developing a rhizobia strain containing legume seed inoculant.

The aim of this work is to characterize the diversity of rhizobia bacteria strains in the Rhizobia Collection of Latvia University of Life Sciences and Technologies (LBTU). In order to achieve this goal, the following tasks were set: to carry out an inventory of the existing historical Rhizobia Collection of the LBTU Institute of Soil and Plant Sciences; supplement the existing collection with new rhizobia strains; perform genetic identification of all bacteria strains in the collection; assess of the diversity of the identified bacteria strains; evaluate the identified diversity depending on the host plants and the agrochemical indicators of the soil.

This study was conducted in the time period from 2015 to 2022. To determine the diversity of rhizobia strains, existing bacteria strains from the collection of the Institute of Soil and Plant Sciences of LBTU (isolated from 1962 to 2015), as well as newly isolated bacterial strains, collected in the period 2016–2019, within the framework of various field and pot trials of the Institute of Soil and Plant Sciences, were used. Molecular biology analyses were carried out in the Department of Molecular Biology and Microbiology of the Research Laboratory of Biotechnology (LBTU). The study was carried out within the project EUROLEGUME (“Enhancing of legumes growing in Europe through sustainable cropping for protein supply for food and feed”) and LegumeGap (“Increasing the productivity and sustainability of plant protein production in Europe”).

This study identified bacterial strains isolated from a wide range of legumes, using full-length 16S rRNA gene sequencing for higher phylogenetic analysis accuracy, compared to shorter length 16S rRNA fragment sequences, that are more commonly used as an identification method. The taxonomic diversity identified was wider than initially suspected. Although *Rhizobium* sp. was the most common identified genus, bacterial strains identified in this study belong not only to the α -proteobacteria class, but also to the β - and γ -proteobacteria classes. The latter two have the potential, in the case of forming a symbiotic relationship with legumes, to fix atmospheric nitrogen, but also to dissolve the phosphate in the rhizosphere, that is otherwise unavailable to plants. As a result, new potential bacterial strains were discovered that could be used to create a commercial rhizobium inoculation preparation.

This PhD Thesis consists of 95 pages (excluding bibliography list and appendices); the work contains 14 tables, 26 figures, 302 bibliographic sources, as well as 3 appendices.

SATURA RĀDĪTĀJS

TABULU UN ATTĒLU SARAKSTS	5
DARBĀ IZMANTOTO SAĪSINĀJUMU UN SVEŠVĀRDU SKAIDROJUMS	6
IEVADS	9
1. LITERATŪRAS APSKATS	14
1.1. Gumiņbaktēriju daudzveidības pētījumu nozīme	14
1.2. Gumiņbaktēriju bioloģija	16
1.2.1. Gumiņbaktēriju uzbūve	16
1.2.2. Atmosfēras slāpekļa saistīšanas mehānisms	19
1.2.3. Gumiņbaktēriju izplatība dažādos apkārtējās vides apstākļos	22
1.2.4. Gumiņbaktēriju klasifikācija	28
1.3. Gumiņbaktēriju daudzveidības noteikšana	32
1.3.1. Genotipēšanas metode gumiņbaktēriju daudzveidības noteikšanā	33
1.3.2. Ribosomālo gēnu izmantošana gumiņbaktēriju identifikācijā	34
1.3.3. Citu gēnu izmantošana gumiņbaktēriju identifikācijā	37
1.3.4. Multi-lokusu sekvenču analīze gumiņbaktēriju identifikācijā	39
1.4. Gumiņbaktēriju pētniecības attīstība Latvijā	40
KOPSAVILKUMS	42
2. MATERIĀLI UN METODIKA	44
2.1. Pētījuma struktūra	44
2.2. Gumiņbaktēriju celmi	44
2.3. Gumiņbaktēriju identifikācija	47
2.3.1. DNS izdalīšana	47
2.3.2. 16S rRNS gēna amplifikācija un sekvenčēšana	48
2.3.3. 16S rRNS sekvenčēšanas rezultātu analīze	51
2.3.4. 16S rRNS sekvenčēšanas datu statistiskā analīze	51
2.3.5. 16S rRNS gēna mainīgo reģionu aprēķināšana	52
2.4. Augsnis analīzes	52
2.4.1. Augsnis agroķīmisko rādītāju mērījumi	52
2.4.2. Augsnis agroķīmisko rādītāju rezultātu datu apstrāde	53
3. PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA	54
3.1. LBTU kolekcijā esošo gumiņbaktēriju celmu inventarizācija	54
3.2. Gumiņbaktēriju celmu ģenētiskā identifikācija	59
3.2.1. Gumiņbaktēriju celmu 16S rRNS gēna konservatīvie un mainīgie reģioni	62
3.2.2. Gumiņbaktēriju celmu daudzveidība	63
3.2.3. Izmaiņas gumiņbaktēriju daudzveidībā laika gaitā	74
3.2.4. Saimniekaugi un identificēto baktēriju specifiskums	74
3.3. Identificēto gumiņbaktēriju izplatība Latvijas augsnēs	79
3.3.1. No tauriņziežiem izdalīto baktēriju daudzveidība Latvijas novados	79
3.3.2. Augsnis agroķīmiskie apstākļi gumiņbaktēriju izdalīšanas vietās	81
3.3.3. Augsnis agroķīmisko rādītāju korelatīvās sakarības	88
3.4. Gumiņbaktēriju un endofītisko baktēriju daudzveidība, efektivitāte un potenciālais pielietojums tauriņziežu inokulācijā	89
3.4.1. Iepriekšējo gumiņbaktēriju pētījumu rezultāti ģenētisko analīžu kontekstā	89
3.4.2. Tauriņziežu sēklu inokulācijas preparāta izveide	91
SECINĀJUMI	94
PATEICĪBAS	95
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	96
PIELIKUMI	115

TABULU UN ATTĒLU SARAKSTS

Darbā ievietoto attēlu saraksts

Nr.	Nosaukums	Lpp.
1.1.	Gumiņbaktēriju dzīves cikla trīs sadaļas: simbiotiskā (A), saprofitiskā (B) un endofītiskā (C)	16.
1.2.	Gumiņbaktēriju hromosomālā genoma (a) un plazmīdu pRL9 un pRL10 genomu (b) shēmas	18.
1.3.	Tauriņziežu sakņu inficēšanās ar gumiņbaktēriju procesa shematiskais attēlojums	20.
1.4.	Atmosfēras slāpekļa saistīšanas un reducēšanas mehānisma shēma	21.
1.5.	Tauriņziežu ģintis un to simbiotiskās gumiņbaktēriju sugas (pēc Pongslip, 2012)	30.
1.6.	Baktēriju ribosomālās RNS operona struktūra (a) un reprezentatīvs baktēriju 16S rRNS gēna sekvenču shematiskais attēlojums (b)	35.
2.1.	Promocijas darba pētījuma struktūras shematiskais attēlojums	44.
2.2.	Teritorijas Latvijā, kur veikta baktēriju izdalīšana no tauriņziežu gumiņiem	45.
2.3.	Gumiņbaktēriju uzglabāšana	46.
2.4.	Gumiņbaktēriju tīrkultūru iegūšana ar atšķaidījumu metodi	47.
2.5.	16S rRNS gēna amplifikācijas shematiskais attēlojums	48.
3.1.	Identificēto baktēriju celmu 16S rRNS gēna konservatīvie un mainīgie reģioni	64.
3.2.	Pilna 16S rRNS gēna filoģenētiskais koks	65.
3.3.	Alfa-proteobaktēriju pilna 16S rRNS gēna filoģenētiskais koks	68.
3.4.	Beta-proteobaktēriju pilna 16S rRNS gēna filoģenētiskais koks	70.
3.5.	Gamma-proteobaktēriju pilna 16S rRNS gēna filoģenētiskais koks	71.
3.6.	Saimniekaugi un to atbilstošie α -proteobaktēriju celmi	76.
3.7.	Saimniekaugi un to atbilstošie β -, γ -proteobacteria un Bacilli celmi	77.
3.8.	No tauriņziežu gumiņiem izdalīto baktēriju daudzveidība Latvijas teritorijā	80.
3.9.	Kālija saturs augsnes paraugos (mg kg^{-1})	82.
3.10.	Kalcija saturs augsnes paraugos (mg kg^{-1})	83.
3.11.	Nitrātu saturs augsnes paraugos (mg kg^{-1})	84.
3.12.	Fosfātu saturs augsnes paraugos (mg kg^{-1})	85.
3.13.	Augsnes paraugu pH līmenis	87.
3.14.	Augsnes paraugu elektrovadītspēja ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	88.
3.15.	Augsnes agroķīmisko analīžu rādītāju slodze (<i>factor loading</i>) uz galvenajiem komponentiem, un rādītāju savstarpējās sakarības	90.

Darbā ievietoto tabulu saraksts

Nr.	Nosaukums	Lpp.
1.1.	Gumiņbaktēriju klasifikācija, pamatojoties uz to saimniekaugiem (pēc Coutinho, De Olivera, Moreira, 2000)	29.
1.2.	Gumiņbaktēriju klasifikācija, balstoties uz ģenētisko radniecību	31.–32.
1.3.	Dažādu gumiņbaktēriju 16S rRNS gēna kopiju skaits genomā	36.
1.4.	Dažādu ģenētisko marķieru pielietojums gumiņbaktēriju pētniecībā	38.
2.1.	LBTU Augsnes un augu zinātņu institūta Gumiņbaktēriju kolekcijas celmi	46.
2.2.	16S rRNS gēna fragmentu amplifikācijas eksperimenta shēma	49.
2.3.	Polimerāzes ķēdes reakcijas programma 16S rRNS gēna fragmentu amplifikācijai	49.
2.4.	16S rRNS gēna amplificētā fragmenta sekvencēšanas polimerāzes ķēdes reakcijas programma	50.
3.1.	LBTU Augsnes un augu zinātņu institūta gumiņbaktēriju kolekcijas inventarizācija	55.–59.
3.2.	No tauriņziežu gumiņiem izdalīto baktēriju ģenētiskā identifikācija, izmantojot pilna garuma 16S rRNS gēna sekvences	60.–62.
3.3.	Baktēriju daudzveidība biežāk sastopamo saimniekaugu gumiņos	75.
3.4.	Augsnes paraugu agroķīmisko analīžu rādītāju Pīrsona analīzes korelācijas matrica	89.
3.5.	Baktēriju celmi tauriņziežu sēklu inokulācijas preparātu izveidošanai	92.
3.6.	Baktēriju celmi tauriņziežu sēklu inokulācijai augsnēm ar pH <6.0 un pH >7.5	92.

DARBĀ IZMANTOTO SAĪSINĀJUMU UN SVEŠVĀRDU SKAIDROJUMS

Saīsinājums/svešvārds

Skaidrojums

AFLP

(*amplified fragment length polymorphism*) amplificēto fragmentu garuma polimorfisms – DNS genotipēšanas metodes paveids, ko izmanto ģenētikas pētījumos;

Baktēriju celms

taksonomiskais iedalījums, ko izmanto ģenētiski vienveidīgu baktēriju tīrkultūru apzīmējumam sugas ietvaros;

Bakteriofāgi

baktēriju vīrusi ar konkrētas baktēriju grupas specifiskumu;

Bāzu pāris; bp

divi nukleotīdi DNS dubultspirālē, kas savā starpā saistīti ar ūdeņraža saitēm, ko izmanto kā DNS molekulas garuma mērvienību;

DNS

dezoksiribonukleīnskābe – molekula, kas sastāv no nukleotīdiem un uzglabā ģenētisko informāciju;

DNS amplifikācija

noteikta DNS fragmenta kopiju pavairošana;

DNS-DNS hibridizācija

molekulārās bioloģijas metode, ar kuras palīdzību veic divu organismu ģenētiskās līdzības salīdzinājumu. Izmanto taksonomijā un filoģenētikas pētījumos;

Eksopolisaharīds	(EPS) lielmolekulārs, bioloģiski noārdāms polimērs (ogļhidrāts), kuru sintezē gumiņbaktērijās
Elektroforēze	metode, kas sadala molekulas elektriskajā laukā, atkarībā no to izmēra, struktūras, un lādiņa;
ETS	(<i>external transcriber spacer</i>) nefunkcionāls RNS, tuvradniecisks ITS reģionam;
Fenotips	genotipa fiziskā izpausme, morfoloģiskās un fizioloģiskās organisma īpašības;
Genotipēšanas metode	(<i>fingerprinting</i>) netieša metode DNS sekvenču polimorfisma izvērtēšanai. Izmanto baktēriju sugu un celmu identificēšanai;
Genoms	organisma visu DNS molekulu kopums;
Genotips	visu gēnu (gēnu alēļu) kopums, kas raksturīgs vienam indivīdam;
Gēns	RNS vai DNS sekvenču, kas kodē funkcionālu molekulu;
Gram-negatīvas baktērijas	baktērijas, kuras, izmantojot zinātnieka Grama baktēriju krāsošanas metodi, neiekrāsojas ar kristālvioleto krāsvielu. Šo baktēriju šūnas apvalks sastāv no plānas peptidoglikāna slāņa, kas ir saspiesta starp iekšējo citoplazmatisko membrānu un bakteriālo ārējo membrānu;
Infekcijas pavediens	cilindriskas formas struktūra, ar kuras palīdzību gumiņbaktērijas inficē saimniekauga sakņu šūnas.
ITS	(<i>internal transcriber spacer</i>) nekodējošs DNS reģions, kas atrodas starp mazās apakšvienības un lielās apakšvienības ribosomālo RNS gēniem;
Konservatīvie gēni	(<i>conserved genes</i>) gēni, kuri evolūcijas gaitā būtībā nav mainījušies, norādot uz šo gēnu unikālumu un būtiskumu;
Lipopolisaharīds	(LPS) lielmolekulārs savienojums, kas sastāv no lipīda un polisaharīda daļām un ir atrodams uz gram-negatīvo baktēriju ārējās membrānas;
LBTU	Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte;
“Ļeņingradas kolekcija”	Vēsturiska baktēriju kolekcija Ļeņingradā (tagadējā Sanktpēterburga) (<i>All-Union Scientific Research Institute of Agricultural Microbiology, Leningrad, USSR</i>)
Mezofilas baktērijas	baktērijas, kuru optimālā augšanas temperatūra ir mērena (20–45 °C);
MLSA	Multi-lokusu sekvenču analīze – molekulāras bioloģijas metode, izmantota vairāku lokusu sekvenču analīzei;
Nitragīns	komerciāls gumiņbaktēriju preparāts tauriņziežu sēklu inokulācijai;
PCR	(<i>polymerase chain reaction</i>) polimerāzes ķēdes reakcija – metode DNS amplifikācijai ārpus šūnas;
Plazmīda	baktēriju DNS molekula, kas ir mazāka par hromosomu, un parasti nesatur gēnus, kuri atbild par baktēriju augšanu un pamata funkcijām;
Pleisomorfija	pazīme, kas evolūcijas procesā ir saglabājusies homologa kādai noteiktai organismu grupai, bet nav unikāla plašākā

	organismu lokā, sarežģījot šīs pazīmes izmantošanu filoģenētikā;
Praimeri	(pazīstami arī kā oligonukleotīdi) īsas, vienpavediena DNS sekvences, ko izmanto darbam ar PCR kāda konkrēta DNS fragmenta amplifikācijā;
Rekombinantā DNS	DNS molekula, kura iegūta ar laboratorijas metodēm (piem., klonēšana), panākot ģenētiskā materiāla pārneši starp dažādiem organismiem, kas nebūtu panākama ar dabiskās rekombinācijas u.c. procesiem (piem., ģenētiskā modifikācija);
Ribosomālās RNS operons	(rRNS operons) rRNS gēna kodēšanas un regulēšanas mehānisms
ROS	(<i>reactive oxygen species</i>) reaktīvās skābekļa formas – brīvie radikāļi, nestabilas molekulas, kuras satur skābekli un viegli reaģē ar citām šūnas molekulām. ROS uzkrāšanās šūnā var bojāt DNS, RNS, proteīnus, un izraisīt šūnu nāvi;
RFLP	(<i>restriction fragment length polymorphism</i>) restrikcijas fragmentu garuma polimorfisms – DNS genotipēšanas metodes paveids, ko izmanto ģenētikas pētījumos;
Ribosomālās RNS, rRNS	RNS (ribonukleīnskābes) molekula, kas kopā ar proteīniem veido ribosomu;
Sekvencēšana	DNS fragmentu nukleotīdu secības noteikšana;
YMA	(<i>yeast mannitol agar</i>) rauga-mannīta agarizēta barotne, baktēriju kultivēšanai.

IEVADS

Tauriņzieži pēdējos gados visā pasaulē nokļuvuši zinātnieku, lauksaimnieku, kā arī patērētāju uzmanības centrā. Liela nozīme tauriņziežiem ir augsnes bagātināšanā ar slāpekli, uzlabojot augsnes auglību un pasargājot to no erozijas (Deshpande, Deshpande, 1991; Drinkwater, Wagoner, Sarrantonio, 1998; Giller, Herridge, Sprent, 2016; Voisin et al., 2014). Tauriņziežu izmantošana ir ļoti plaša un ietver pielietojumu arī būvmateriālu, lopbarības un eļļas ražošanā (Voisin et al., 2014). Salīdzinot visus tauriņziežu pārstrādes un izmantošanas veidus, lielāko daļu izmanto lopbarībai. Tauriņziežus lopbarībā izmanto, jo tie ir vērtīgs olbaltumvielu un enerģijas avots (Sharasia, Garg, Bhandari, 2017; Voisin et al., 2014). Tomēr aprēķināts, ka Eiropas Savienība (ES) nodrošina tikai 30% no nepieciešamās lopbarības, savukārt 87% no šī iztrūkuma kompensē ar sojas importu. Vietējo tauriņziežu audzēšanas apjoma palielināšanu iesaka, lai samazinātu Eiropas atkarību no importētā proteīna lopbarībai (Watson et al., 2017).

Mūsdienās cilvēki aizvien vairāk sāk apzināties savu personīgo ietekmi uz apkārtējo vidi. Zināms, ka vismaz daļēja gaļas aizvietošana ar augu valsts produktiem, tajā skaitā tauriņziežiem, ir daudz ilgtspējīgāka – gan attiecībā uz vides piesārņojuma samazināšanu, gan cilvēku veselības stāvokļa uzlabošanu (Carlsson-Kanyama, González, 2009; Jallinoja, Nivaa, Latvalab, 2016; Pimentel, Pimentel, 2003). Tauriņzieži ir ar olbaltumvielām bagāts produkts, kas spēj vismaz daļēji aizstāt gaļu, nodrošinot pilnvērtīgu uzturu (Aiking, 2011; Voisin et al., 2014). Šobrīd ES netiek audzēts pietiekoši liels tauriņziežu daudzums, lai spētu nodrošināt vietējo pārtikas pieprasījumu. Lielāko daļu tauriņziežus, ko ES patērē pārtikā, līdzīgi kā lopbarības tauriņziežus – importē no citām valstīm (FAOSTAT¹). Aramzeme, kas atvēlēta tauriņziežu audzēšanai, ES pēdējos piecdesmit gados ir sarukusi no 4.6% līdz 1.8% (Rochon et al., 2004; Zander et al., 2016). Sakarā ar pieaugošo pasaules populāciju, paredz, ka tauriņziežu ražošana pasaulē palielināsies par 30 miljoniem tonnu nākamo 35 gadu laikā (Knight, 2012). Lai rosinātu pētījumus, kas stimulētu tauriņziežu produktu pieprasījumu, un galu galā veicinātu tauriņziežu audzēšanu, ES pēdējos gados ir ieguldījusi apjomīgu finansējumu projektu tēmām, kas saistītas ar tauriņziežu pētniecību (CORDIS²). Tauriņziežu audzēšana Eiropā aktualizēta, piemēram, ar zaļināšanas programmām (*EU Common Agricultural Policy*³), kā arī Eiropas zaļo kursu (*European Green Deal*⁴), mudinot lauksaimniekus atbalstīt ilgtspējīgu lauksaimniecību, pretī saņemot finansiālu atbalstu.

Nozīmīgu lomu tauriņziežu audzēšanā ieņem gumiņbaktērijas. Gumiņbaktērijas ir augsnes baktērijas, kuras piesaistās pie tauriņziežu saknēm un, veiksmīgas simbiozes gadījumā, veido gumiņus un saista atmosfēras slāpekli, kuru augi izmanto olbaltumvielu ražošanā, pretī no augiem saņemot barības vielas (ogļhidrātus) (Deshpande, Deshpande, 1991; Giller, Herridge, Sprent, 2016; Lindström et al., 2010; Voisin et al., 2014; Wang et al., 2019a). Gumiņbaktēriju un tauriņziežu simbiozes augstā pievienotā vērtība no lauksaimnieku un visas sabiedrības skatu punkta ir šis saistītais atmosfēras slāpekļis, kas samazina nepieciešamību pēc ķīmiskā slāpekļa mēslojuma, ne tikai samazinot izmaksas, bet arī sniedzot būtisku ieguldījumu ilgtspējīgā lauksaimniecībā. Turklāt daļa saistītā slāpekļa, auga daļām sadaloties augsnē, bagātina augsni ar slāpekli un nodrošina labvēlīgus apstākļus nākamajiem kultūraugiem (Ahemad, Kibret, 2014; Dash, Gupta, 2011; Pawar et al., 2014; Voisin et al., 2014). Gumiņbaktērijas atšķiras savā atmosfēras slāpekļa saistīšanas efektivitātē, un šīs atšķirības novērojamas ne tikai starp atšķirīgām gumiņbaktēriju sugām, bet arī vienas sugas ietvaros starp

¹ FAOSTAT [Tiešsaiste] [skatīts 19.02.2023.]. Pieejams: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>

² Community Research and Development Information Service, The primary information source for EU-funded projects since 1990, [Tiešsaiste] [skatīts 09.11.2018.]. Pieejams: https://cordis.europa.eu/projects/home_en.html

³ EU Common Agricultural Policy [Tiešsaiste] [skatīts 19.02.2023.]. Pieejams: <https://bit.ly/2t0GM1E>.

⁴ European Green Deal [Tiešsaiste] [skatīts 19.02.2023.]. Pieejams: <https://bit.ly/3YYbpSU>.

dažādiem vienas sugas celmiem (Ahmed et al., 2007; Bourion et al., 2007; Saleh, Zaman, Kabir, 2013). Lai izveidotu veiksmīgu tauriņziežu-gumiņbaktēriju simbiozi, ir nepieciešama saderīga tauriņzieža un gumiņbaktēriju celma kombinācija (Giller, Herridge, Sprent, 2016). Būtiski ir veikt pētījumus ar vietējiem gumiņbaktēriju celmiem, kas ir atbilstoši konkrētās teritorijas vides apstākļiem. Turklāt šie, no vietējās augsnes izdalītie gumiņbaktēriju celmi, būs atbilstošāki simbiozes izveidošanai ar vietējām tauriņziežu šķirnēm. Balstoties uz zinātniskajiem pētījumiem, var veiksmīgāk izvēlēties atbilstošākos gumiņbaktēriju celmus komerciālai tauriņziežu audzēšanai. Lai gan par gumiņbaktēriju efektivitāti ir veikti daudz pētījumi gan Latvijā, gan citur pasaulē, tomēr ir novēroti pretrunīgi rezultāti. Viens no iemesliem ir tas, ka trūkst informācija par gumiņbaktēriju daudzveidību. Gumiņbaktēriju filoģenētiskie pētījumi ir nepieciešami, lai papildinātu zināšanas par gumiņbaktēriju daudzveidību, tajā pašā laikā, sniegtu uz pētījumiem balstītas zināšanas, kas palīdzētu izvēlēties atbilstošus gumiņbaktēriju celmus komerciālu preparātu ražošanai.

Promocijas darba aktualitāte

Gumiņbaktērijas ieņem nozīmīgu lomu lauksaimniecībā kā dabīgais slāpekļa saistītājs tauriņziežu (*Leguminosae*) kultūraugos, tādējādi samazinot ķīmiskā slāpekļa mēslojuma izmantošanu, kā arī bagātinot augsni nākamajiem kultūraugiem. Līdz šim nav veikta no Latvijas augsnēm izdalītu gumiņbaktēriju celmu identifikācija, izmantojot molekulārās bioloģijas metodes, kā arī nav veikts Latvijas gumiņbaktēriju celmu daudzveidības novērtējums. Šī pētījuma rezultāti ļaus veikt LBTU kolekcijā esošo gumiņbaktēriju taksonomiskās piederības identifikāciju, paverot jaunas iespējas gumiņbaktēriju pielietošanai lauksaimniecībā – gan jau esošo gumiņbaktēriju efektivitātes pētījumu rezultātu skaidrošanā, gan jaunu efektīvu tauriņziežu sēklu inokulācijas preparātu sagatavošanā. Lai gan pasaulē pētījumi par gumiņbaktēriju un tauriņziežu simbiozi ir daudz, tomēr iegūtie rezultāti ir pretrunīgi. Viens no iemesliem ir nepietiekošā informācija par gumiņbaktēriju daudzveidību.

Promocijas darba mērķis

Novērtēt LBTU kolekcijā esošo un jauniegūto gumiņbaktēriju celmu taksonomisko piederību un daudzveidību.

Darba uzdevumi

1. Veikt LBTU Gumiņbaktēriju kolekcijā esošo gumiņbaktēriju celmu inventarizāciju.
2. Papildināt LBTU Gumiņbaktēriju kolekciju ar jauniem, no Latvijas augsnēs augošajiem tauriņziežiem izdalītiem gumiņbaktēriju celmiem.
3. Identificēt LBTU Gumiņbaktēriju kolekcijā esošo un jaunizdalīto gumiņbaktēriju celmu taksonomisko piederību.
4. Noteikt identificēto gumiņbaktēriju celmu daudzveidību.
5. Analizēt identificēto gumiņbaktēriju celmu daudzveidību atkarībā no saimniekaugiem un augsnes agroķīmiskajiem rādītājiem.

Promocijas darba hipotēze

Latvijas augsnēs augošo tauriņziežu gumiņos sastopamas dažādas gumiņbaktēriju ģintis, kuru daudzveidību ietekmē ne tikai saimniekaugi, bet arī augsnes agroķīmiskie rādītāji.

Aizstāvamās tēzes

1. 16S rRNS pilna garuma gēns ir atbilstošs marķieris tauriņziežu simbiotu daudzveidības identifikācijai.
2. Tauriņziežu gumiņos sastopamas baktērijas no dažādām proteobaktēriju klasēm.
3. Pastāv daudzveidības atšķirības starp vēsturiskās kolekcijas gumiņbaktērijām un jaunizdalītajiem baktēriju celmiem.
4. Būtiska ietekme gumiņbaktēriju daudzveidībai ir saimniekaugiem, no kuru sakņu gumiņiem baktērijas izdalītas.
5. Augsnes agroķīmiskie apstākļi (pH, augšnes elektrovadītspēja, minerālelementu pieejamība) ietekmē gumiņbaktēriju daudzveidību.
6. Veidojot tauriņziežu sēklu inokulācijas preparātu, ieteicams izmantot dažādu ģinšu baktēriju asociāciju.

Projekti promocijas darba izstrādes atbalstam

1. EUROLEGUME (“Tauriņziežu audzēšanas veicināšana Eiropā proteīna nodrošināšanai pārtikā un lopbarībā ilgtspējīgas lauksaimniecības apstākļos”).
2. LegumeGap (“Augu olbaltumvielu ražošanas produktivitātes un ilgtspējības palielināšana Eiropā”).
3. ESF projekts ES29 (“LLU akadēmiskā personāla pilnveidošana”; Nr. 8.2.2.0/18/A/014).

Pētījumu datu aprobācija

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

1. Klūga A., Dubova L., Alsina I., Rostoks N. (2023). Alpha-, gamma- and beta-proteobacteria detected in legume nodules in Latvia, using full length 16S rRNA gene sequencing. *Acta Agriculturae Scandinavica – Section B Soil and Plant Science*, Vol. X, No. Y, p. XX–YY. (*apstiprināts*)
2. Bērtiņš M., Klūga A., Dubova L., Petrēvics P., Alsina I., Vīksna A. (2021). Study of *Rhizobia* impact on nutritional element concentration in legumes. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B. Natural, Exact and Applied Sciences*, Vol. 75, No. 6, p. 457–462.
3. Dubova L., Senberga⁵ 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.
4. Dubova L., Alsina I., Ruža A., Šenberga⁵ A. (2018). Impact of faba bean (*Vicia faba* L.) cultivation on soil microbiological activity. *Agronomy Research*, Vol. 16, No. 5, p. 2016–2025.
5. Senberga⁵ 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.
6. Šenberga⁵ A., Dubova L., Alsina 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.

⁵ mainīts uzvārds no Šenberga uz Klūga

Publikācijas semināru rakstu krājumos

1. Šenberga⁶ A., Dubova L., Alsina 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. Dubova L., Šenberga⁶ A., Alsina 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.

Citas zinātniskās publikācijas

1. Dubova L., Šenberga⁶ A., Alsina I. (2017). Inoculated broad beans (*Vicia faba*) as a precrop for spring onions (*Allium cepa*). *Research for rural development*, Vol. 2, p. 33–39.
2. Dubova L., Šenberga⁶ A., Alsina I. (2015). The effect of double inoculation on the broad beans (*Vicia faba* L.) yield quality. *Research for Rural Development*, Vol. 1, p. 34–39.

Mutiskie referāti konferencēs

1. Klūga A., Alsina I., Dubova L., Lepse L., Zeipiņa S. Lauka pupu un sojas šķirņu izvērtējums, gumiņbaktēriju efektivitāte un galvenie faktori augstākas pākšaugu ražas iegūšanai. *Līdzsvarota lauksaimniecība: zinātniski praktiskā konference* – Jelgava. 2021. gada 25. februāris. Ziņojums Laukkopības sekcijā.
2. Šenberga⁶ A., Dubova L., Alsina I. Gumiņbaktēriju celmu efektivitātes pētījumi. *LU – 76. konference*. – 2018. gada 2. februāris. Ziņojums sekcijā.
3. Šenberga⁶ A., Dubova L., Alsina I. Sēklu inokulācijas ietekme uz pupu augšanu agrīnajās ontogēnēzes stadijās. *Līdzsvarota lauksaimniecība: zinātniski praktiskā konference* – Jelgava. 2017. gada 23. februārī. Ziņojums sekcijā.
4. Dubova L., Šenberga⁶ A., Alsina 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.
5. Dubova L., Alsina I., Ruža A., Šenberga⁶ A. Impact of faba bean (*Vicia faba* L.) cultivation on soil microbiological activity. *NJF seminar Legumes from field to fork – a Nordic-Baltic perspective on production, development and marketing of legumes*, Tartu, Igaunijā no 28.11. līdz 30.11.2017. Ziņojums sekcijā.

Stenda referāti konferencēs

1. Bērtiņš M., Klūga A., Dubova L., Petrēvics P., Alsina I., Vīksna A. (2020). Study of rhizobia impact on nutritional element content in legumes. *3rd International Conference "Nutrition and Health"*, December 9–11, 2020, University of Latvia, Riga, Latvia.
2. Rimoviča K., Bērtiņš M., Dubova L., Klūga A., Petrēvics P., Alsina I., Vīksna A. (2020). Determination of the effectiveness of legume-rhizobia symbiotic system. *Latvijas Universitātes 78. starptautiskā konference, Ķīmijas sekcija*, 6. marts, 2020, Rīga, Latvija.
3. Strauta L., Bērtiņš M., Alsina I., Dubova L., Klūga A., Petrēvics P., Vīksna A. (2020). Study of macro and trace element flows in the legume-rhizobia symbiotic system. *Latvijas Universitātes 78. starptautiskā konference*, 6. marts, 2020, Rīga, Latvija.
4. Dubova L., Senberga⁶ 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.

⁶ mainīts uzvārds no Šenberga uz Klūga

5. Senberga⁷ 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.
6. Dubova L., Alsina I., Ruža A., Šenberga⁷ A. (2018). Soil microbiological activity in differently cultivated bean (*Vicia faba* L.) fields. *Ecology of soil microorganisms 2018*. 17.–21. jūnijs, 2018. gads. Helsinki, Somija.
7. Šenberga⁷ A., Dubova L., Alsina I. (2018). Dīgstošu pupu sēklu simbiotiskā gatavība. *Ražas svētki "Vecauce – 2018": Latvijai 100, Lauksaimniecības izglītībai – 155*. 1. novembris, 2018. Jelgava, Latvija.
8. Alsina I., Dubova L., Šenberga⁷ A. (2017). Is the inoculation of field beans in Latvian agroclimatic conditions sufficiently effective? *NJF seminar Legumes from field to fork – a Nordic-Baltic perspective on production, development and marketing of legumes*. November 28–30, 2017. Tartu, Estonia.
9. Šenberga⁷ A., Dubova L., Alsina I. (2017). Germination and growth of primary roots of inoculated faba bean (*Vicia faba*) seeds under different temperatures. *NJF seminar Legumes from field to fork – a Nordic-Baltic perspective on production, development and marketing of legumes*. November 28–30, 2017. Tartu, Estonia.
10. Dubova L., Šenberga⁷ A., Alsina I., Liepiņa M., Strauta L. (2017). Interaction of rhizobia, arbuscular mycorrhizal fungi and beans (*Vicia faba* L.) in different soils of Latvia. *International conference "Advances in grain legume breeding, cultivation and uses for a more competitive value-chain"*. September 27–28, 2017. Novi Sad, Serbia.
11. Senberga⁷ A., Dubova L., Alsina I., Elferts D. (2017). Rhizobia and mycorrhiza fungi inoculum evaluation for the pea and bean growth promotion. *International conference "Advances in grain legume breeding, cultivation and uses for a more competitive value-chain"*. September 27–28, 2017. Novi Sad, Serbia.
12. Šenberga⁷ A., Dubova L., Alsina I., Strauta L. (2016). The influence of *Rhizobia* strains on the yield formation of broad beans (*Vicia faba*) in the different soil types. *12th European Nitrogen Fixation conference*. August 25–28, 2016. Budapest, Hungary.
13. Šenberga⁷ A., Dubova L., Alsina I., Zaharāne L. (2016). Quality of different pea cultivars depending on *Rhizobia* strains. *12th European Nitrogen Fixation conference*. August 25–28, 2016. Budapest, Hungary.
14. Dubova L., Senberga⁷ A., Alsina I. (2016). The effect of soil type and *Rhizobia* strains on the yield formation of broad beans (*Vicia faba*). *5th EUROSOL International congress*. October 16–21, 2016. Istanbul, Turkey.
15. Alsina I., Dubova L., Šenberga⁷ A., Zaharāne L., Zīverts K., Liepiņa M. The effectiveness of inoculation of legumes with *Rhizobia*. *20th Baltic Agronomy Forum*. July 7–8, 2016. Jelgava, Latvija.
16. Senberga⁷ A., Dubova L., Alsina I. (2016). Yield formation of faba beans (*Vicia faba* L.) depending on double inoculation with rhizobia and mycorrhiza fungi. *Legumes for a sustainable world: second International Legume Society conference*. October 11–14, 2016. Troia, Portugal.
17. Gaile Z., Lapina L., Litke L., Alsina I., Dubova L., Senberga⁷ A. (2016). Whether yield increase is always guaranteed by beans' seed treatment with *Rhizobium* bacteria? *International scientific conference "AGROECO 2016"*. October 4–6, 2016. Kaunas, Lithuania.

⁷ mainīts uzvārds no Šenberga uz Klūga

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Gumiņbaktēriju daudzveidības pētījumu nozīme

Gumiņbaktēriju izmantošana tauriņziežu inokulācijai ir visā pasaulē atzīta ilgtspējīgas lauksaimniecības metode, kuru izmantojot mazinās nepieciešamība pēc minerālā slāpekļa mēslojuma. Lai gan slāpekļa mēslojumam ir liela nozīme lauksaimniecībā, būtiski palielinot saražotās pārtikas apjomu, tomēr šī mēslojuma ilgtermiņa un pārmērīga izmantošana visā pasaulē ir atstājusi negatīvas sekas uz apkārtējo vidi, palielinot augsnes auglības degradāciju un izraisot apkārtējās vides piesārņojumu (Norse, 2005). Turpretim gumiņbaktēriju izmantošana lauksaimniecībā ir ne tikai videi draudzīga, bet arī ekonomiski izdevīga, salīdzinot ar minerālā slāpekļa izmantošanu (Bottomley, 1992; Dakora, Keya, 1997; Denton et al., 2003; Klāsens, 1994; Nguyen et al., 2003; Vessey, Chemining'wa, 2006). Tiek lēsts, ka ar tauriņziežu un gumiņbaktēriju simbiozes palīdzību vienā hektārā tiek saistīts 200–300 kg slāpekļa. Īpaši uzsvērtā simbiozes ceļā saistītā slāpekļa nozīme ilgtspējīgā lauksaimniecībā. Turklāt gumiņbaktērijas, kas ir efektīvas slāpekļa saistīšanā, var palielināt olbaltumvielu saturu tauriņziežu sēklās (Peoples, Herridge, Lahda, 1995; Sessitsch et al., 2002).

Senāk gumiņbaktēriju pētniecība bija ierobežota, lielākoties aptverot tikai celmu izdalīšanu un to efektivitātes pārbaudi, izmantojot dažādus tauriņziežus. Attīstoties molekulārās bioloģijas metodēm, kļuva iespējams veikt šo gumiņbaktēriju celmu īpašību plašāku izpēti, tajā skaitā gumiņbaktēriju celmu taksonomiskās daudzveidības noteikšanu (van Berkum, Elia, Eardly, 2006). Gumiņbaktēriju identifikācija, izmantojot molekulārās bioloģijas metodes, ļauj noskaidrot ģenētiskās atšķirības starp dažādiem gumiņbaktēriju celmiem un var skaidrot gumiņbaktēriju celmu fenotipiskās atšķirības. Līdz šim ir veikti daudz pētījumu, kuri parāda Latvijā izdalīto gumiņbaktēriju celmu darbības efektivitātes atšķirības (sīkāk aprakstīts 1.4. apakšnodaļā). Šīs atšķirības lielākoties skaidro ar ārējiem apstākļiem – biotiskajiem vai abiotiskajiem, bet pārsvarā neņem vērā pašu gumiņbaktēriju bioloģiskās atšķirības. Mūsdienās, veicot pētījumus ar mikroorganismiem, arī lauksaimniecības zinātnē aizvien vairāk ir nepieciešams ģenētiskais pamatojums un darbības mehānisma paskaidrojums.

Vēl joprojām trūkst zināšanas par to kā palielināta gumiņbaktēriju daudzveidība ietekmē augu dažādību un to produktivitāti atšķirīgos apstākļos. Uzskata, ka lielāka gumiņbaktēriju daudzveidības klātbūtne ir nepieciešama dažādu augu līdzāspastāvēšanai (Borges et al., 2016). Ir novērots, ka savvaļas baktēriju sastāvs augsnē ietekmē inokulācijas efektivitāti, ko veic ar atlasītiem gumiņbaktēriju celmiem (Torres et al., 2009). Tomēr vēl joprojām zināšanas par šo baktēriju ģenētisko daudzveidību ir ierobežotas. Pēdējos gados, palielinoties interesei par simbiotiskā slāpekļa saistošajām baktērijām un to pielietojumu lauksaimniecībā kā bioloģisko mēslojumu, aizvien vairāk pētījumu veic šo baktēriju daudzveidības noteikšanu (Kawaka et al., 2018). Lai gan gumiņbaktērijas uzskata par vieniem no būtiskākajiem mikroorganismiem simbiotiskā slāpekļa saistīšanā tauriņziežos, tās nav vienīgās augsnes baktērijas, kas spēj saistīt atmosfēras slāpekli. Atmosfēras slāpekļa saistīšanu veic arī tādas augsnes baktērijas kā, piemēram, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Azospirillum* (Wagner, 2011). Tāpēc, veicot gumiņbaktēriju daudzveidības pētījumus, būtu nepieciešams identificēt arī citu slāpekli saistošo baktēriju klātesamību augsnē. Zināšanas par bioloģiskā slāpekļa saistošo baktēriju, īpaši savvaļas populāciju, ģenētisko daudzveidību ir nozīmīgas, lai varētu labāk izprast bioloģiskā slāpekļa saistīšanas efektivitāti un lomu ilgtspējīgā lauksaimniecībā (Kawaka et al., 2018; Sikora, Redžepovič, 2003).

LBTU Gumiņbaktēriju kolekcijā ir iekļauti baktēriju celmi, kas ir izdalīti laika posmā no 1962. gada līdz 2015. gadam. Klimata pārmaiņu rezultātā iespējamās Latvijas augsnēs esošo gumiņbaktēriju populāciju izmaiņas. Laikam ejot, novērojamas ne tikai klimata izmaiņas, bet izmaiņas lauksaimniecības agrotehnikā, augsnes apstrādes metodēs, kā arī augu aizsardzības

līdzekļu pielietojumā. Gumiņbaktēriju daudzveidību ietekmē arī augu kultivēšana, augsnes apstrādes tehnoloģijas, kā arī ķīmisko mēslošanas līdzekļu un pesticīdu lietošana (Sessitsch et al., 2002). Uzskata, ka lauksaimniecība rada ļoti selektīvu un homogēnu vidi, kas samazina baktēriju daudzveidību (Martinez-Romero, Caballero-Mellado, 1996). Turklāt novērots, ka ķīmisko mēslojumu pielietošana iepriekš neapstrādātā augsnē samazina gumiņbaktēriju daudzveidību tauriņziežu gumiņos (Caballero-Mellado, Martinez-Romero, 1999). Pastāv arī pretējs uzskats, ka augsnes apstrāde veicina baktēriju populāciju daudzveidību, salīdzinājumā ar platībām, kas atvēlētas ganībām un netiek apstrādātas (Kennedy, Smith, 1995).

Ar molekulārās identifikācijas palīdzību var veikt arī gumiņbaktēriju daudzveidības attīstības novērtējumu ilgākā laika posmā, kas sniedz ļoti svarīgu informāciju, lai izprastu horizontālo gēnu pārnesei starp baktēriju ģintīm un sugām, sniegtu atbildes par baktēriju evolucionāro attīstību, kā arī par simbiotisko efektivitāti (Pongsilp, 2012). Lai iegūtu esošajiem klimata apstākļiem atbilstošākos – aktīvākos un efektīvākos gumiņbaktēriju celmus, kas var sekmīgāk pārvarēt abiotiskos stresa apstākļus, kā arī atbilstu jaunām tauriņziežu šķirnēm, nepieciešams veikt jaunu gumiņbaktēriju celmu izdalīšanu arī no Latvijas augsnēm. Jaunu gumiņbaktēriju celmu izdalīšana ir nepieciešama arī, lai varētu pilnvērtīgāk veikt bioloģiskās daudzveidības pētījumus (Young, 1992).

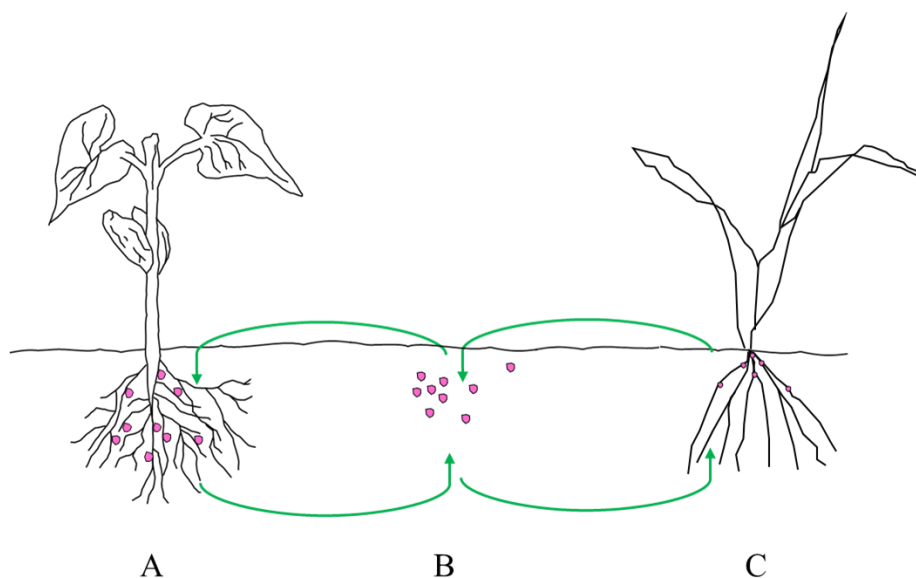
Gumiņbaktēriju celmu identifikācija ir būtiska pētījumos, kuros analizē gumiņbaktēriju saimniekaugu specifisku, kā arī konkurētspēju starp gumiņbaktēriju celmiem (Beattie, Handelsman 1989). Ierobežoto konkurētspēju ar savvaļas gumiņbaktērijiem uzskata par vienu no iemesliem, kāpēc lauka izmēģinājumos bieži nevar novērot inokulācijas pozitīvo ietekmi uz ražu (Sessitsch et al., 2002). Savukārt pētījumos, kuru mērķis ir noskaidrot gumiņbaktēriju celmu fenotipiskās atšķirības un slāpekļa saistīšanas mehānismus, var pilnvērtīgi veikt, tikai balstoties uz šo baktēriju ģenētisko informāciju (Bottomley, 1992). Gumiņbaktēriju celmu daudzveidības un ģenētiskās radniecības pētījumu rezultāti sniedz informāciju par baktēriju genotipiem, kas ir pielāgojušies konkrētajiem apkārtējās vides apstākļiem (Pongsilp, 2012). Tātad gumiņbaktēriju izplatību dažādos apkārtējās vides apstākļos var skaidrot, pamatojoties uz gumiņbaktēriju daudzveidības zināšanām (Evans, Burris, 1992).

Gumiņbaktēriju daudzveidības novērtējums sniedz ieguldījumu fundamentālajā pētniecībā, izzinot augsnes baktēriju bioloģisko daudzveidību, kā arī palielina gumiņbaktēriju kolekcijas praktiskā pielietojuma lietderību. Gumiņbaktēriju celmu daudzveidības pētījumi ir ieguldījums ilgtspējīgā lauksaimniecībā un valsts tautsaimniecībā. Latvijas vietējo gumiņbaktēriju celmu ģenētiskā identifikācija ļaus padziļināti pētīt un izprast tauriņziežu un gumiņbaktēriju simbiotiskās attiecības Latvijas apstākļos. Augsnēs esošo gumiņbaktēriju daudzveidības pētījuma rezultāti palīdzētu izstrādāt ilgtermiņa stratēģiju, lai palielinātu bioloģiskā slāpekļa saistīšanas lomu lauksaimniecībā (Baginsky et al., 2015), kā arī pavērs jaunas perspektīvas jaunu augu augšanu veicinošo mikroorganismu preparātu izveidošanā. Citur pasaulē veiktie pētījumi par gumiņbaktēriju daudzveidību sniedz zināšanas par pētījumu metodiku, tomēr rezultāti nav tieši attiecināmi uz Latvijas apstākļiem, jo gumiņbaktērijas attīstās atkarībā no apkārtējās vides apstākļiem.

1.2. Gumiņbaktēriju bioloģija

1.2.1. Gumiņbaktēriju uzbūve

Gumiņbaktērijas ir gram-negatīvas augsnes baktērijas (Mazur et al., 2015). Šo baktēriju šūnas ir nūjiņveida formas, vidēja izmēra – 0.5 līdz 0.8 μm platas un 1.2 līdz 3.0 μm garas. Gumiņbaktērijas ir kustīgas baktērijas, kas pārvietojas ar viciņas/ņu palīdzību. Ir novērotas gumiņbaktērijas ar vienu polāru viciņu, vai divām līdz sešām viciņām ar peritrihu novietojumu (viciņas ir novietotas pa visu šūnas virsmu) (Somasegaran, Hoben, 1994; Wang et al., 2019a). Gumiņbaktēriju dzīves ciklā var izšķirt trīs stadijas (1.1. att.) – saprofitiskā (brīvi dzīvojot augsnē), simbiotiskā (veidojot gumiņus uz saimniekaugu saknēm), kā arī endofītiskā (atrodoties citu augu, kas nav saimniekaugi, saknēs) (Wang et al., 2019a).



1.1. att. **Gumiņbaktēriju dzīves cikla trīs stadijas:** simbiotiskā (A), saprofitiskā (B) un endofītiskā (C)

Attēls adaptēts no Wang et al., 2019a.

Gumiņbaktēriju tīrkultūru kolonijas pārsvarā ir baltas vai krēmkrāsas, lielākoties necaurspīdīgas. Izņēmums ir, kad baktēriju kolonijas ir jaunas – tad tās var būt arī caurspīdīgas. Gumiņbaktēriju koloniju izskats un īpašības var mainīties atkarībā no izmantotās barotnes, audzēšanas laika un inkubēšanas apstākļiem. Ir novērotas gumiņbaktēriju koloniju tekstūras atšķirības – tās var būt ar “sviesta” konsistenci, elastīgas un stāipīgas, vai arī želejveida. Gumiņbaktēriju kolonijas var būt gan mitras, gan sausas. Pārsvarā gumiņbaktēriju kolonijas ir plakanas, vai noapaļotas, bet ir celmi, kuru kolonijas veido koniskus pacēlumus, vai arī “vērsacs” formas pacēlumus (Somasegaran, Hoben, 1994).

Gumiņbaktēriju ārējais eksopolisaharīdu apvalks piedalās koloniju morfoloģisko īpašību noteikšanā. Gumiņbaktēriju šūnas virsmā atrodas dažādi polisaharīdi, kas veido cieši sakļautu šūnas virsmas slāni – lipopolisaharīdi (LPS), kapsulas polisaharīdi (CPS), polisaharīdi ar neitrālu un skābu reakciju. Savukārt eksopolisaharīdi (EPS) izdalās apkārtējā vidē, un tiem ir maza saistība ar pašas baktēriju šūnas virsmu. Gumiņbaktēriju polisaharīdi ir specifiski sugas vai pat celmu līmenī (Ghosh, Maiti, 2016; Skorupska et al., 2006). Dažādu polisaharīdu veidošanās gumiņbaktērijās ļauj baktēriju celmiem pielāgoties mainīgajiem apkārtējās vides apstākļiem, kā arī nodrošina efektīvu simbiozes veidošanos ar tauriņziežiem (Ghosh, Maiti, 2016; skatīt 1.2.2. apakšnodaļu).

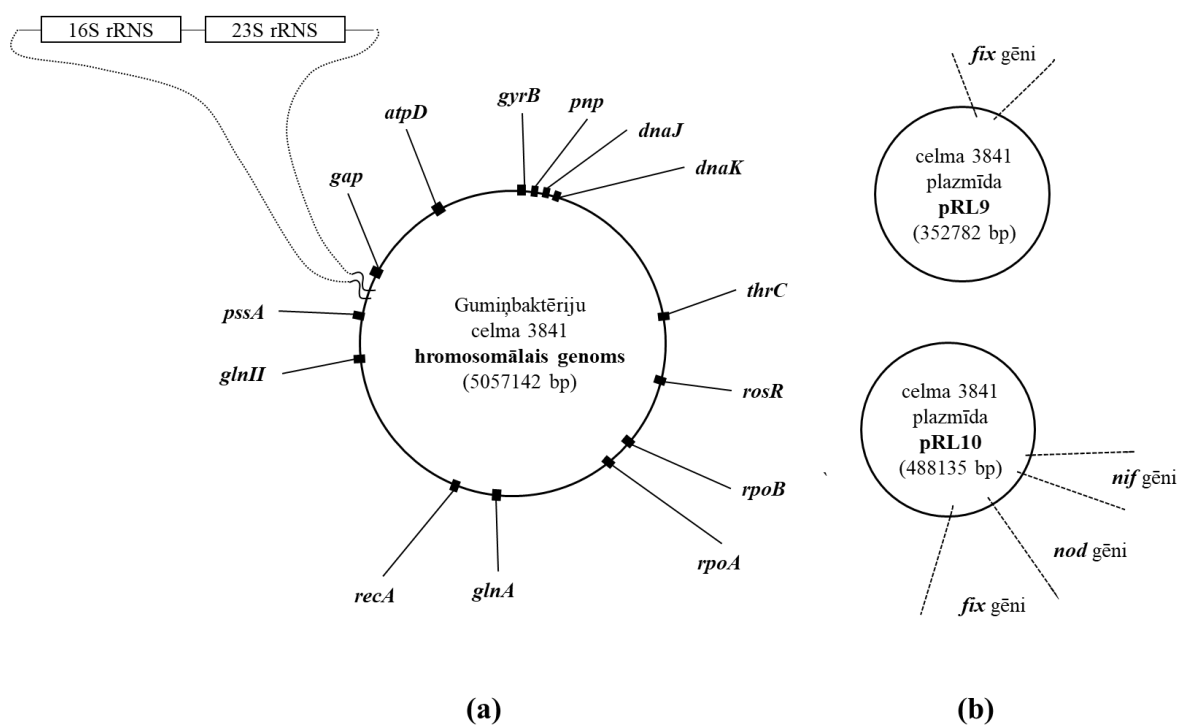
Augšanas temps laboratorijas apstākļos gumiņbaktērijām būtiski atšķiras starp celmiem (Giller, Herridge, Sprent, 2016). Tiek izdalītas ātri augošas (piemēram, *Rhizobium*) un lēni augošas gumiņbaktērijas (piemēram, *Bradyrhizobium*) (Somasegaran, Hoben, 1994). Gumiņbaktēriju veidotās kolonijas trīs līdz piecu dienu laikā uz YMA barotnēm parasti sasniedz 2–4 mm (Giller, Herridge, Sprent, 2016; Somasegaran, Hoben, 1994).

Gumiņbaktēriju genoma uzbūve ir sarežģīta – izšķir **pamata hromosomālo genomu** un **papildu komponentu genomu** (1.2. att.). Līdzīgi kā lielākajai daļai baktēriju, gumiņbaktēriju hromosomālais genoms sastāv no vienas DNS molekulas (t.i. vienas hromosomas), kura ir aplveida. Bet atšķirībā no lielākās daļas citu baktēriju, gumiņbaktērijām, pateicoties to sarežģītajam dzīves ciklam (1.1. att.), hromosomālais genoms ir daudz lielāks, jo ir nepieciešami vairāk gēnu, kas nodrošina gumiņbaktēriju spēju pielāgoties dažādiem dzīves apstākļiem. Lielākā daļa gēnu (70%) hromosomālajā genomā ir saistīti ar gumiņbaktēriju adaptāciju. Šis aplveida hromosomālais genoms satur konservatīvus gēnus (Young et al., 2006). Evolucionārajā bioloģijā **konservatīvi gēni** (*conserved genes*), ir tādi gēni, kuru DNS vai RNS sekvences ir identiskas vai līdzīgas, un selekcijas ceļā ir saglabājušas šo līdzību sugas vai ģints ietvaros. Savukārt papildus komponentu genomu veido viena vai vairākas mazākas aplveida DNS molekulas – **plazmīdas**, kuras pārsvarā satur organisma izdzīvošanai mazāk būtiskus gēnus. Salīdzinot dažādu gumiņbaktēriju sugu un pat celmu pilno genomu sekvences, ir novērotas atšķirības gan hromosomālajā, gan plazmīdu genomu izmēros, kā arī plazmīdu skaitā (Young et al., 2006). Arī gēnu izvietojums dažādām gumiņbaktērijām var atšķirties. Piemēram, gēni, kas atbild par gumiņu veidošanos (*nod* gēni) un gēni, kas nodrošina slāpekļa saistīšanas mehānismu (*nif*, *fix* gēni) var atrasties kādā no lielajām plazmīdām, vai var būt iekļauti hromosomas genomā kā simbiotisko gēnu salas (Mazur et al., 2011). Plazmīdas ir daudz plastiskākas, un tajās ir novērojami biežāki gēnu papildinājumi un zudumi, salīdzinot ar hromosomālo genomu. Plazmīdu izmērs un gēnu saturs, kā arī to atrašanās vieta genomā, var atšķirties pat starp tuvradnieciskām gumiņbaktēriju sugām (Mazur et al., 2011; Young et al., 2006). Gumiņbaktērijas ir baktēriju ekoloģiskā grupa, kas apvieno dažādu ģinšu baktērijas, kuru gēnu sastāvs var būt atšķirīgs. Šajā darbā apkopota informācija par tiem gēniem, kas ieņem nozīmīgu vietu slāpekļa saistīšanas mehānismā un ir būtiski gumiņbaktēriju identifikācijā.

Ir noskaidroti, kuri gumiņbaktēriju gēni ir tie, kas ir iesaistīti gumiņu veidošanās procesā un baktēriju konkurētspējas mehānismos (Sessitsch et al., 2002). Zināms, ka gumiņbaktērijām ir nepieciešami *nod* grupas un *nif* grupas gēni, lai tās spētu izveidot simbiotiskas attiecības ar tauriņziežiem. *Nod* grupas gēni (*nodABC*) atrodami tikai gumiņbaktēriju genomā un ieņem nozīmīgu vietu gumiņu veidošanā. Savukārt *nif* gēni, kas iesaistīti slāpekļa saistīšanas molekulārajā mehānismā, atrodami arī citās baktērijās, piemēram, augšnes baktērijās *Azospirillum brasilense* un *Clostridium acetobutylicum*⁸ (Angus, Hirsch, 2010; Bontemps et al., 2010). Viens no šādiem gēniem ir *nifH*, kas daļēji atbildīgs par slāpekļa saistīšanas procesā iesaistīto nitrogenāzes enzīmu (Bontemps et al., 2010). Papildus *nod* un *nif* gēniem, nozīmīgu vietu simbiotiskā slāpekļa saistīšanā var ieņemt arī *fix* grupas gēni (Fischer, 1994; Iyer, Rajkumar, 2018). Tomēr *fix* gēni, salīdzinājumā ar *nif* un *nod* gēniem, ir daudz mazāk izpētīti. Ir identificēti ap 20 *nod* grupas gēni, 15 *nif* un 17 *fix* grupas gēni (Iyer, Rajkumar, 2018). Šos gēnus dēvē arī par **simbiotiskajiem gēniem** (Mazur et al. 2015). Gēnu ekspresijas eksperimentos novērots, ka mutācijas *nod* gēnos izraisa aizkavētu gumiņu veidošanos, kā arī traucētu infekcijas pavediena attīstību. Inhibējot, vai pretēji – pastiprinot *nod* gēnu ekspresiju, panāktas izmaiņas gumiņbaktēriju saimniekaugu diapazonā (Kondorosi et al., 1989; Surin, Downie, 1989). Novērots, ka *nod* gēni palīdz skaidrot gumiņbaktēriju celmu saimniekaugu

⁸ National Center for Biotechnology Information, Gene database [Tiešsaiste] [skatīts 19.02.2023.]. Pieejams: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/howto/find-func-gene/>

specifiskumu (Iyer, Rajkumar, 2018). Lai gan ģenētiski modificētu gumiņbaktēriju izmantošana lauksaimniecībā ir pretrunīga, organismi, kuru ģenētiskais materiāls ir izmainīts, noder gumiņbaktēriju gēnu darbības izpētē. Piemēram, ir izveidots rekombinants gumiņbaktēriju celms RMBPC-2 (*Sinorhizobium meliloti*), kurš satur gēnu *nifA* un *dctABD* papildus kopijas. Novērots, ka, palielinot šo gēnu ekspresiju, uzlabojas lucernas slāpekļa saistīšanas efektivitāte, norādot, ka šie gēni ieņem nozīmīgu vietu slāpekļa saistīšanas mehānismā (Bosworth et al., 1994).



1.2. att. Gumiņbaktēriju hromosomālā genoma (a) un plazmīdu pRL9 un pRL10 genomu (b) shēmas

Attēlā ietverti gēni (aptuvenās atrašanās vietas genomā norādītas ar līnijām), kas ir nozīmīgi simbiotisko attiecību izveidošanā un slāpekļa saistīšanā, kā arī gumiņbaktēriju identifikācijā. Shematiskais attēls izveidots, balstoties uz GenBank (NCBI⁹) datubāzē pieejamo informāciju

Plazmīdās esošos simbiotiskos gēnus *nif* un *nod* pielieto gumiņbaktēriju daudzveidības pētījumos, kā arī gumiņbaktēriju sugu identifikācijā (Iyer, Rajkumar, 2018). Arī konservatīvos gēnus kas atrodas hromosomālajā genomā, izmanto gumiņbaktēriju ģenētiskajā identifikācijā un radniecības noteikšanā (1.3. apakšnodaļa). Daļa no šiem gēniem ir iesaistīti eksopolisaharīdu (EPS) sintēzē (*exo/exs*, *pss*, *ros*). Gumiņbaktēriju EPS sintēze ir sarežģīts process (1.2.2. apakšnodaļa), ko ietekmē arī apkārtējās vides faktori (Skorupska et al., 2006; Iyer, Rajkumar, 2018). Dažādi specifiski *pss* gēni nodrošina atšķirīgu eksopolisaharīdu tipu sintēzi (Janczarek, Kalita, Skorupska, 2009). Piemēram, *pssA* gēns kodē enzīmu glikozila-IP-transferāzi, kas ir iesaistīts EPS sintēzes sākumposmā. Savukārt *rosR* gēns kodē EPS sintēzes transkripcijas regulatoru (Janczarek, Skorupska, 2003). EPS biosintēzes procesu pārvalda gēni *exo/exs* (Iyer, Rajkumar, 2018).

⁹ National Center for Biotechnology Information, "Rhizobium leguminosarum bv. viciae chromosome complete genome, strain 3841, [Tiešsaiste] [skatīts 19.02.2023.]. Pieejams: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AM236080.1?report=graph>

Gumiņbaktēriju filoģenētikas pētījumos izmanto arī glutamīna sintetāzes (GS) gēnus (piemēram, *glnII*, *glnA*). GS enzīms nepieciešams nitrogenāzes sintēzes procesā, ir nozīmīgs amonjaka asimilācijā, kā arī glutamīna biosintēzē (Bishop et al., 1976; Brown et al., 1994; Turner, Young, 2000). Savukārt gēnu *recA*, kas ir nozīmīgs gumiņbaktēriju darbībā, plaši izmanto arī gumiņbaktēriju identifikācijā. Šis gēns piedalās gumiņbaktēriju DNS rekombinācijas kodēšanā, kā arī veic atbildes reakciju, ja konstatē bojājums DNS (Better, Helinski, 1983; Eisen, 1995; Turner, Young, 2000).

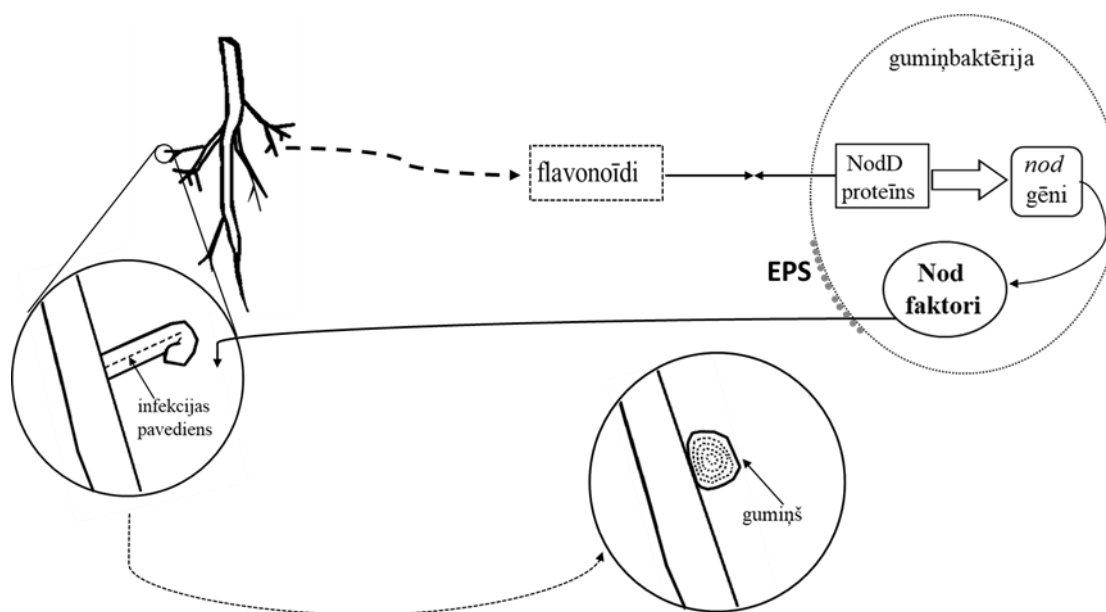
Citi hromosomālā genoma gēni, kuri mazāk aprakstīti literatūrā, bet ir nozīmīgi gumiņbaktēriju filoģenētiskajos pētījumos ir: 1) *atpD* gēns, kurš kodē ATP membrānas sintēzes enzīma beta apakšvienību, kas ir nozīmīga enerģijas ražošanā (Eisen, 1995); 2) *gdh* glikozes dehidrogenāzes gēns, kas ir iesaistīts fosfora savienojumu šķīdināšanā (Naveed et al., 2014) un 3) *rpoB* gēns, kas kodē RNS polimerāzes beta apakšvienību (Aserse et al., 2012).

1.2.2. Atmosfēras slāpekļa saistīšanas mehānisms

Jau kopš senās Ēģiptes laikiem lauksaimnieki ir zinājuši, ka tauriņzieži, piemēram, zirņi, lēcas un āboliņš, ir nozīmīgi augsnes auglības palielināšanai. Tādas prakses kā augsekas, jauktie stādījumi un zaļmēslojuma lietošana ir zināmas jau vismaz tūkstoš gadus, bet tikai 19. gadsimtā parādījās skaidrojumi šai augsnes auglības uzlabošanas parādībai. Šajā laikā augseku un zaļmēslojuma pielietojums lauksaimniecībā bija kļuvis par normālu praksi. Tomēr tas, ka tieši mikroorganismi ir atbildīgi par slāpekļa saistīšanu, nebija zināms līdz 19. gadsimta pēdējai ceturtdaļai, kad atklāja gumiņbaktērijas. Cilvēki novēroja nelielus izaugumus uz tauriņziežu saknēm jau kopš 17. gadsimta, bet tikai 1888. gadā Hermans Helriegels un Hermans Vilfarts (*Herman Hellriegel* un *Herman Wilfarth*) izteica novērojumu, ka tieši sakņu gumiņi veic atmosfēras slāpekļa konvertēšanu par amonjaku. Pirmo reizi no gumiņiem izdalītas gumiņbaktērijas un izolētas to tūrkultūras 1888. gadā, Holandē (Hirsch, 2009). Dabiskās ekosistēmās tauriņzieži spēj saistīt ap 28–84 kg slāpekļa uz ha. Lauksaimniecības tauriņzieži, piemēram, lucerna, amoliņš, āboliņš un vīķis, spēj saistīt 280–560 kg slāpekļa uz ha gadā. Savukārt vīķis, soja un lauka pupas spēj saistīt 113 kg N ha⁻¹ gadā (Nyoki, Ndakidemi, 2016).

Gumiņbaktēriju un tauriņziežu simbiozes izveidošanās ir sarežģīts un ļoti labi koordinēts process starp gumiņbaktērijām un tauriņziežu saknēm (Kijne, 1992; Parniske, Downie, 2003). Šis process ir padziļināti pētīts arī molekulārajā līmenī (Sessitsch et al., 2002). Simbiozes veidošanos uzsāk tauriņziežu dzimtas augs, izdalot rizosfērā no saknēm ķīmiskus savienojumus – **flavonoīdus**, kas darbojas kā signālmolekulas. Flavonoīdi rizosfērā mijiedarbojas ar atbilstošo gumiņbaktēriju receptoriem un ierosina **NodD** proteīnu sintēzi, kuri gumiņbaktērijās sāk ražot specifiskus oligosaharīdus (lipo-hito-oligosaharīdi). Šo oligosaharīdu uzdevums ir uztvert un atpazīt sakņu izdalītos ķīmiskos savienojumus. Šie gumiņbaktēriju oligosaharīdi aktivizē gumiņu veidošanās gēnu komplektu – *nod* gēnus. Aktivizētie gēni sintezē Nod faktorus, kurus atpazīst saimniekaugs (1.3. att.). Lai gan augi nepārtraukti izdala flavonoīdus nelielos daudzumos, gumiņbaktēriju klātbūtnē flavonoīdu koncentrācija rizosfērā paaugstinās. Augu sakņu izdalītie flavonoīdi un baktēriju Nod faktori ir svarīgākie signāli simbiozes sākotnējā inficēšanas procesa nodrošināšanā. Turklāt Nod faktori ir pietiekoši, lai vieni paši spētu ierosināt morfoloģiskās izmaiņas saknēs – spurgaliņu deformāciju, infekcijas pavediena izveidošanu un šūnu dalīšanos saknes primārajā mizā un periciklā (Angus, Hirsch, 2010; Broughton, Jabbouri, Perret., 2000; Miklashevichs et al., 2010; Perret, Staehelin, Broughton, 2000; Russelle, 2008; Schulze et al., 1994; Sessitsch et al., 2002; Skorupska et al., 2006; Wang et al., 2019c). Tālāk augā tiek ierosinātas dažādas bioķīmiskas un morfoloģiskas izmaiņas, veicinot šūnu dalīšanos saknes primārajā mizā un izveidojot gumiņa meristēmu auga saknē. Rezultātā spurgaliņu augšana izmainās – tās ieritinās un

deformējas, lai rizosfēras gumiņbaktērijas, kas piestiprinājušās pie spurgaliņas, tiktu iesprostotas. Šīs iesprostotās gumiņbaktērijas uzsāk auga inficēšanas procesu, kā rezultātā spurgaliņā izveidojas infekcijas pavediens. Gumiņbaktērijas izmanto infekcijas pavedienu, lai iekļūtu auga sakņu šūnās, virzoties to auga šūnu virzienā, kurās noris aktīva šūnu dalīšanās, un izveido gumiņa aizmetni, kuram apkārt izveidojas auga izcelsmes membrāna. Šādu veidojumu sauc par **simbiosomu** (*symbiosome*). Šajā simbiosomā baktērijas palielinās un diferencējas par **bakteroīdiem** – organoīdiem līdzīgām struktūrām (Angus, Hirsch, 2010; van Berkum et al., 1995; Broughton, Jabbouri, Perret, 2000; Gage, 2004; Janczarek, Kalita, Skorupska, 2009; Long, 2001; Miklashevichs et al., 2010; Oldroyd, Downie 2008; Perret, Staehelin, Broughton, 2000; Schulze et al., 1994; Sessitsch et al., 2002; Terpolilli, Hood, Poole, 2012; Udvardi, Poole, 2013).

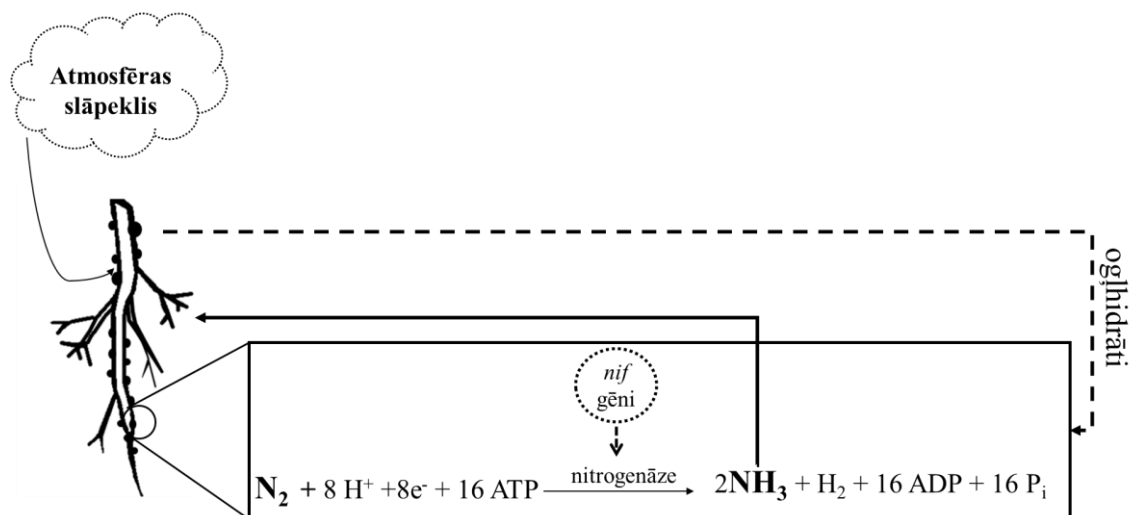


1.3. att. Tauriņziežu sakņu inficēšanās ar gumiņbaktērijām procesa shematiskais attēlojums

Bakteroīdi izmanto enzīmu **nitrogenāzi**, lai katalizētu atmosfēras slāpekļa pārveidošanu (reducēšanu) par augiem pieejamo amonjaku (NH_3) – šo procesu sauc par slāpekļa bioloģisko saistīšanu (1.4. att.). Par nitrogenāzes funkcionēšanu ir atbildīgi gumiņbaktēriju *nif* grupas gēni. Amonjaks, kas iegūts tauriņziežu-gumiņbaktēriju simbiozes ceļā, iekļaujas auga vielmaiņā, kur to izmanto aminoskābju veidošanai, nogādājot to uz citām auga daļām un izmantojot DNS un olbaltumvielu ražošanā (Angus, Hirsch, 2010; Gage, 2004; Giller, Herridge, Sprent, 2016; Janczarek, Kalita, Skorupska, 2009; Long, 2001; Miklashevichs et al., 2010; Naveed et al., 2015; Perret, Staehelin, Broughton, 2000; Schulze et al., 1994; Terpolilli, Hood, Poole, 2012; Udvardi, Poole, 2013).

Bakteroīdiem nepieciešams daudz enerģijas, lai spētu veikt slāpekļa saistīšanu. Šo nepieciešamo enerģiju nodrošina saimniekaugs ogļhidrātu formā, kurus iegūst fotosintēzes ceļā. Tiek lēsts, ka tauriņziežu-gumiņbaktēriju simbiozei nepieciešami aptuveni 10 kg ogļhidrāti, lai saistītu vienu kilogramu atmosfēras slāpekļa (Schulze, 2004). Tāpēc optimālas simbiozes priekšnosacījums ir ne tikai labs saimniekauga veselības stāvoklis, bet arī pietiekoši daudz ūdens, barības vielas, kā arī saules gaismas. Ne mazāk svarīgi ir tādu gumiņbaktēriju celmu iesaistīšanās simbiozes procesā, kas ir efektīvi slāpekļa saistītāji. Gumiņi, kas veic efektīvu slāpekļa saistīšanu, bieži vien ir rozā krāsā ar sarkanu gumiņa iekšpusi, tie ir lielāki un pārsvarā novērojami uz saimniekauga galvenās saknes. Turpretim gumiņi, kurus veido

neefektīvi gumiņbaktēriju celmi, bieži vien iekšpusē ir balti vai gaiši zaļi, un lielākoties tie ir daudzi un nelieli gumiņi, izvietoti viscaur saimniekauga sakņu sistēmā. Gadījumos, kad gumiņbaktēriju pārvietošanās infekcijas pavediena virzienā auga sakņu šūnās ir nesekmīga, auga šūnas var turpināt dalīties, un var tikt izveidoti tukši gumiņi uz auga saknēm. Tā kā šie gumiņi nesatur gumiņbaktērijas, tie nav spējīgi saistīt atmosfēras slāpekli. Šajā gumiņu veidošanas procesā augs patērē enerģiju, tādēļ ir iespējams novērot zemāku ražu (Kijne, 1992).



1.4. att. Atmosfēras slāpekļa saistīšanas un reducēšanas mehānisma shēma

Nozīmīgu lomu efektīvas simbiozes nodrošināšanā un gumiņu veidošanās procesā ieņem arī gumiņbaktēriju šūnu virsmas sastāvdaļas – **eksopolisaharīdi** (EPS), ko izdala gumiņbaktērijas (Skorupska et al., 2006). Gumiņbaktēriju eksopolisaharīdi ir sugas specifiski heteropolisaharīdu polimēri (Young et al., 2006; Krol et al., 2007). EPS un lipopolisaharīdi (LPS) ir nozīmīgi veiksmīgai auga sakņu invāzijai, kā arī efektīvu slāpekļa saistošu gumiņu izveidei (Becker, Puhler, 1998; Frayse, Couderc, Poinot, 2003; Janczarek, Jaroszek-Sciseł, Skorupska, 2009; Janczarek, Kalita, Skorupska, 2009; Mathis et al., 2005; Skorupska et al., 2006). Pēdējos gados palielinājies pētījumu skaits, kuru mērķis ir noskaidrot EPS nozīmīgumu gumiņbaktēriju un tauriņziežu simbiozē. Ir novērots, ka simbiotisko attiecību izveidošanai ar *Phaseoleae* ģints augiem nav nepieciešami EPS. Turpretim gumiņbaktēriju kapacitāte inficēt *Trifolieae* un *Fabeae* ģints tauriņziežus ir stipri ierobežota, ja gumiņbaktērijas nespēj sintezēt EPS. Izvirzīta hipotēze, ka polisaharīdi spēj nomākt saimniekauga aizsardzības reakcijas, kas pretējā gadījumā varētu apturēt sakņu infekciju ar gumiņbaktērijām (Bladergroen, Spaink; 1998; Iyer, Rajkumar, 2018).

Lai arī plaši pētīts, tomēr gumiņu veidošanās process, kā arī gumiņbaktēriju celmu savstarpējā konkurence rizosfērā nav līdz galam izprasti procesi. Viens no lielākajiem šķēršļiem lauksaimniecībā, kas ierobežo simbiotisko slāpekļa saistīšanu, ir efektīvo slāpekļa saistītāju baktēriju celmu konkurēšana ar augsnē brīvi dzīvojošo gumiņbaktēriju celmiem, kuri var būt mazāk efektīvi slāpekļa saistītāji (Janczarek, Jaroszek-Sciseł, Skorupska, 2009; Naveed et al., 2015). Tas ir viens no iemesliem, kāpēc reizēm var novērot, ka sēklu inokulācija ar gumiņbaktērijām nav efektīva (Torres et al., 2009; Naveed et al., 2015). Ieguvums gumiņbaktērijām no veiksmīgas simbiozes izveidošanas ar tauriņziežiem ir būtisks, tādēļ novērojama tik liela baktēriju savstarpējā konkurence. Šis faktors ierosina gumiņbaktēriju dabīgo selekcijas procesu (Denison, Kiers, 2011). Viens no priekšnosacījumiem, lai izveidotu konkurētspējīgu gumiņbaktēriju saturošu preparātu, ir esošās savvaļas gumiņbaktēriju populācijas daudzveidības identifikācija (Sikora, Redžepovič, 2003).

Mazāk apspriests, bet nozīmīgs slāpekļa saistīšanas mehānismā ir ūdeņradis (H_2), kas ir atmosfēras slāpekļa saistīšanas procesa blakusprodukts. Šis radītais H_2 pārsvarā izplatās apkārt esošajā augsnē, radot lielu enerģijas zudumu saimniekaugiem. Tas ir viens no iemesliem, kāpēc slāpekļa saistīšanu reizēm uzskata par neefektīvu enerģijas patēriņu (Annan et al., 2012). Tomēr novēroti *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, un *Azorhizobium* ģinšu gumiņbaktēriju celmi, kuru sastāvā ir ūdeņraža uzņemšanas sistēma (Hup; *hydrogen uptake system*), dēvēti par Hup^+ celmiem. Šie gumiņbaktēriju celmi spēj pārstrādāt ūdeņradi gumiņos, kas radīts atmosfēras slāpekļa saistīšanas procesā. Šādā veidā baktērijās nodrošina daudz efektīvāku enerģijas izmantošanu (Annan et al., 2012; Leyva et al., 1990; Ruiz-Argüeso, Imperial, Palacios, 2000). Hup darbības rezultātā oksidējas slāpekļa saistīšanas procesā saražotais ūdeņradis, nodrošinot enerģijas saglabāšanu. Papildus pieejamā enerģija veicina slāpekļa saistīšanas efektivitāti un var būtiski uzlabot ražas apjomu (Navarro et al., 1993). Kaut gan Hup^+ celmiem ir būtiskas priekšrocības, lielākoties ir sastopami Hup^- gumiņbaktēriju celmi. Tomēr tajā pašā laikā uzskata, ka šis rizosfērā izdalītais H_2 nav pilnībā nelietderīgs enerģijas patēriņš, jo tas ierosina citu augsnē esošu baktēriju darbību, kuras savukārt var veicināt auga augšanu, izskaidrojot Hup^- celmu plašo izplatību (Annan et al., 2012).

1.2.3. Gumiņbaktēriju izplatība dažādos apkārtējās vides apstākļos

Visas gumiņbaktērijas, neņemot vērā to ģenētisko daudzveidību, ir mezofilas, aerobas baktērijas, kuru optimālā vides temperatūra lielākajai daļai atbilst 28 °C. Tomēr dažādi apkārtējās vides faktori, piemēram, pH un sāls koncentrācija var atšķirties starp gumiņbaktēriju sugām, vai pat starp vienas sugas atsevišķiem celmiem (Wang et al., 2019a). Uzskata, ka bieži komerciālajos preparātos esošās gumiņbaktērijas izvēlētas pateicoties to augstajai slāpekļa saistīšanas efektivitāti, bet reti piešķir pietiekoši lielu nozīmi šo baktēriju spējai pielāgoties izmaiņām apkārtējās vides apstākļos. Turpretim savvaļas gumiņbaktēriju priekšrocība ir to paaugstinātā spēja pielāgoties daudzveidīgajiem augsnes apstākļiem, tomēr nereti šo baktēriju slāpekļa saistīšanas efektivitāte ir zema vai nav zināma (Sikora, Redžepovič, 2003).

Gumiņbaktēriju izplatība un slāpekļa saistīšanas efektivitāte var atšķirties atkarībā no augsnes tipa (Slattery, Pearce, Slattery, 2004), īpaši tas novērots sojas un dārza pupiņu gumiņbaktēriju gadījumā (Wang et al., 2019a). Tomēr, lai gan zināšanas par gumiņbaktēriju un tauriņziežu simbiotiskajām attiecībām nepārtraukti tiek papildinātas, vēl joprojām trūkst pilnvērtīgas informācijas par to, kā tieši dažādi augšņu tipi ietekmē šo simbiozi (Pires et al., 2018). Vairākos pētījumos Latvijā novērota gumiņbaktēriju izplatība dažādos augšņu tipos. Piemēram, vislielākās āboliņa gumiņbaktēriju populācijas noteiktas tipiskās un izskalotās velēnu karbonātu un kultivētās velēnu podzolētās augsnēs. Mazāks skaits gumiņbaktēriju konstatēts neapstrādātās augsnēs, stipri podzolētās velēnu, velēnu glejotās un kūdras augsnēs (Kalniņš, 1957). Līdzīgi kā āboliņa grupas gumiņbaktērijas, arī zirņu-vīķu-pupu grupas gumiņbaktērijas visvairāk konstatētas velēnu karbonātu, kultivētās velēnu un vāji podzolētās augsnēs (Klāsens, 1967; Klāsens, 1994). Pētījumā, kurā salīdzināta dažādu gumiņbaktēriju celmu efektivitāte atšķirīgos augsnes tipos, secināts, ka augsnes tipam ir būtiska nozīme simbiozes efektivitātē, un šī ietekme ir atšķirīga starp dažādiem gumiņbaktēriju celmiem (Šenberga et al., 2017). Lai gan ir tādas teritorijas, kuru augsnē nav atrodamas gumiņbaktērijas, uzskata, ka gumiņbaktērijas šādās augsnēs var ienest ar sēklu vai inokulējot gumiņbaktēriju preparātu tieši augsnē. Gumiņbaktēriju klātbūtni augsnē nosaka dažādi faktori, piemēram, vai šajā augsnē ir iepriekš audzēti tauriņzieži un, vai augsnes pH ir gumiņbaktērijām atbilstošs (Somasegaran, Hoben, 1994). Arī augsnes granulometriskajam sastāvam ir nozīme mikroorganismu, tajā skaitā gumiņbaktēriju, izplatībā. Piemēram, pētījumā, kurā noteikta dažādu baktēriju sastopamība dažāda granulometriskā sastāva augsnēs, secināts, ka

gumiņbaktērijas (*Rhizobium* un citas pie α -proteobaktēriju klasei piederošās gumiņbaktērijas) vairāk atrodamas smilšainās augsnēs. Izteikts gumiņbaktēriju (īpaši *Bradyrhizobium* spp.) trūkums novērots mālainās augsnēs (Hemkemeyer et al., 2018).

Minerālvielu trūkums var būtiski ierobežot gumiņbaktēriju-tauriņziežu simbiozes efektivitāti – sākot no tauriņziežu sakņu inficēšanas, gumiņu veidošanās un funkcionēšanas, negatīvi ietekmējot saimniekauga ražu (O'Hara, 2001; O'Hara, Boonkerd, Dilworth, 1988; Sessitsch et al., 2002; Weisany, Raei, Allahverdipoor, 2013). Augsnēs ar ierobežotu minerālvielu saturu novērota traucēta gumiņbaktēriju augšanas regulācija, šo baktēriju gēnu funkcionēšana, ģenētiskā apmaiņa starp augsnē esošajām gumiņbaktērijām, kā arī baktēriju izdzīvošana (Naveed et al., 2015; Sessitsch et al., 2002). Novērots, ka gumiņbaktēriju optimālai darbībai nepieciešamās minerālvielas pārsvarā sakrīt ar tām, kas nepieciešamas saimniekaugu augšanai (Evans, Burris, 1992;). Dažādos izmēģinājumos novērota 11 barības elementu nepieciešamība gumiņbaktēriju un tauriņziežu simbiotisko attiecību izveidošanai: makroelementi – fosfors, kālijs, kalcijs un slāpekļs; un mikroelementi – dzelzs, molibdēns, varš, bors, niķelis, kobalts un selēns (O'Hara, Boonkerd, Dilworth, 1988; Weisany, Raei, Allahverdipoor, 2013). Tomēr tikai četri no šiem elementiem (P, Ca, Fe un Mo) uzrāda būtisku ietekmi uz simbiozes efektivitāti (O'Hara, 2001). Izvērtējot minerālvielu nozīmi simbiozes efektivitātē, jāņem vērā, ka dažādām simbiozes attīstības stadijām (piemēram, saimniekaugu augšana; gumiņbaktēriju izdzīvošana un augšana; sakņu infekcija un gumiņu izveidošana; gumiņu funkcionēšana) ir specifiskas minerālvielu prasības (O'Hara, Boonkerd, Dilworth, 1988; Weisany, Raei, Allahverdipoor, 2013). Kā arī, nepieciešamība pēc barības vielām būs atšķirīga augsnē brīvi dzīvojošām gumiņbaktērijām un baktērijām, kuras izveidojušas simbiotiskas attiecības ar saimniekaugu (O'Hara, 2001).

Fosfors ir viena no svarīgākajām minerālvielām, kas nepieciešama gumiņbaktēriju saimniekaugu optimālai augšanai (Naveed et al., 2015; Weisany, Raei, Allahverdipoor, 2013). To augos izmanto neskaitāmu molekulāro un bioķīmisko procesu nodrošināšanā, īpaši enerģijas iegūšanā, uzglabāšanā un pielietošanā. Slāpekļa saistīšana patērē daudz enerģiju – viena N₂ mola saistīšanai nepieciešami 16–18 mol ATP (Bonilla, Bolaños, 2009). Fosfora trūkums būtiski ierobežo tauriņziežu-gumiņbaktēriju simbiotisko attiecību izveidošanos. Turklāt fosfora daudzums, kas nepieciešams šīs simbiozes izveidošanai ir lielāks, salīdzinājumā ar to, kas nepieciešams paša saimniekaugu augšanai.

Fosforu tauriņziežu-gumiņbaktēriju simbiozē **izmanto gumiņu veidošanai** (Mārks, 1971), kā arī, lai nodrošinātu augsto fosfolipīdu saturu bakteroidos (Graham, Vance, 2000). Nodrošinot tauriņziežus ar pietiekamu fosfora daudzumu, tiek stimulēta sakņu apgāde ar ogļhidrātiem, kas ieņem nozīmīgu lomu gumiņu veidošanās procesā, tādā veidā veicinot gan minerālā, gan atmosfēras slāpekļa asimilāciju (Mārks, 1971). Fosfora deficīta apstākļos saknēs samazinās ogļhidrātu saturs, kas ierobežo gumiņu veidošanos un būtiski kavē simbiotiskā slāpekļa saistīšanu (Mārks, 1971; Weisany, Raei, Allahverdipoor, 2013). Turklāt gadījumā, ja augs ir atkarīgs tikai no gumiņbaktēriju saistītā slāpekļa, fosfora trūkums var izraisīt slāpekļa deficītu augos (Weisany, Raei, Allahverdipoor, 2013). Novērots, ka lēni augošās gumiņbaktērijas ir izturīgākas pret fosfora trūkumu, salīdzinājumā ar ātri augošajām gumiņbaktērijām (Beck, Munns, 1985). Liela daļa augsnē jau esošā fosfora ir augiem neuzņemamā formā, tomēr ir novērots, ka, piemēram, *Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium japonicum* un *Mesorhizobium mediterraneum* gumiņbaktēriju celmi spēj izšķīdināt vai mineralizēt fosfora savienojumus augu rizosfērā, padarot fosforu augam uzņemamā formā (Fernandez et al., 2007; Hara, de Oliveira, 2004; Naveed et al., 2015; Rodriguez et al., 2006).

Lielākoties augsnes satur būtiskas kopējā fosfora rezerves (~ 0.05% pēc masas). Pārsvarā šīs rezerves ir inertā, augiem neuzņemamā formā, un tikai 0.1% no šī fosfora ir augiem pieejams (Dai et al., 2020; Sundara, Natarajan, Hari, 2002; Timofeeva, Sedykh, 2009). Fosfora

nepieciejamība ir problēma, ar ko saskaras visā pasaulē, turklāt to uzskata par vienu no galvenajiem augu ražības limitējošajiem faktoriem (Ibrahim et al., 2022). Turklāt novērots, ka fosfora nepieciešamība ir lielāka tieši efektīvai slāpekļa fiksācijai, salīdzinājumā ar tā nepieciešamību paša saimniekauga augšanai (Nyoki, Ndakidemi, 2016). Šo problēmu risina ar fosfora minerālā mēslojuma izmantošanu, šādi nodrošinot optimālu ražu. Lai gan fosfors šajos mēslojumos sākotnēji ir augiem uzņemamā formā, tas strauji reaģē ar augsni un pakāpeniski kļūst augiem neuzņemams. Atkarībā no augsnes apkārtējās vides apstākļiem, kā arī paša izmantotā fosfora mēslojuma veida, veidojas jauni nešķīstoši fosfora savienojumi, ko augi nespēj uzņemt – skābās augsnēs alumīnija un dzelzs fosfātu formā, kaļķainās augsnēs – kalcija fosfātu formā (Sundara, Natarajan, Hari, 2002; Timofeeva, Sedykh, 2022). Šī iemesla dēļ uzskata, ka ķīmiskā fosfora mēslojuma izmantošanas efektivitāte variē no 5–25%. Fosfora mēslojuma izmantošanas intensitāte ilgtermiņā izraisa augsnes paskābināšanos, ūdens piesārņojumu un eutrofikāciju (Timofeeva, Sedykh, 2022). Lielas saistītā/nešķīstošā fosfora rezerves augsnē varētu ilgtermiņā nodrošināt lauksaimniecības augus ar nepieciešamo fosfora daudzumu, ja tiktu atrasta augsnes apsaimniekošanas metode, kas spētu šķīdināt šīs fosfora rezerves. Viens no šādiem potenciālajiem risinājumiem varētu būt fosfora savienojumus šķīdinājošās baktērijas (*phosphate-solubilizing-bacteria; PBS*) (Sundara, Natarajan, Hari, 2002).

Kālijs ieņem nozīmīgu vietu tauriņziežu-gumiņbaktēriju simbiozē, īpaši gumiņu veidošanās procesā. Veģetācijas izmēģinājumos ar lopbarības pupām novērots, ka kālija trūkums negatīvi ietekmē ogļhidrātu saturu gan tauriņziežu lapās, gan saknēs, kas savukārt kavē gumiņu attīstību un samazina slāpekļa saistīšanas efektivitāti (Nyoki, Ndakidemi, 2016). Kālija deficīta negatīvo ietekmi uz tauriņziežu-gumiņbaktēriju simbiozi un ražu pastiprina palielinātas slāpekļa mēslojuma koncentrācijas klātbūtne. Turpretim, ja šo simbiozi nodrošina ar nepieciešamo kālija daudzumu, novērots palielināts olbaltumvielu saturs lapās un sēklās. Pietiekošs kālija mēslojums uzlabo gumiņu veidošanos un palielina tauriņziežu ražu. Tomēr novērots, ka lauka apstākļos šis efekts nav tik liels, salīdzinājumā ar veģetācijas izmēģinājumiem (Marnauza, 1965). Arī *in vitro* izmēģinājumos novērtos, ka gumiņbaktēriju tīrkultūru augšana ir ierobežota, ja barotne nesatur atbilstošu daudzumu kālija (Weisany, Raei, Allahverdipoor, 2013).

Kalcijs ieņem būtisku vietu gumiņbaktēriju fizioloģiskajos procesos šūnu līmenī – nodrošina šūnapvalka un plazmatiskās membrānas stabilitāti, atbalsta barības vielu uzņemšanu un signālu pānesi starp šūnām, kā arī ir būtisks makroelements enzīmu regulācijas procesā (Beck, Munns, 1985; Reeve et al., 1993; Watkin, O'Hara, Glenn, 1997). Kalciju kopā ar boru uzskata par divām ļoti svarīgām minerālvielām gumiņbaktēriju-tauriņziežu simbiotisko attiecību nodrošināšanā, īpaši simbiozes izveidošanās sākumposmā (baktēriju piesaistīšanās spurgaliņām), gumiņu veidošanās procesā, kā arī slāpekļa saistīšanā (Redondo-Nieto et al., 2003). Paaugstināta Ca apstākļos novērota pastiprināta *nod* gēnu aktivitāte, kā arī *nod* gēnu skaits. Šo būtisko lomu simbiozē skaidro ar Ca nozīmi flavonoīdu sintēzē (Bonilla, Bolaños, 2009). Zema kalcija koncentrācija, īpaši mijiedarbībā ar zemu augsnes pH līmeni vai fosfora trūkumu, traucē gumiņbaktēriju piesaistīšanos saimniekaugam un kavē gumiņu veidošanos, samazinot slāpekļa saistīšanu, kas savukārt izraisa hlorozi uz tauriņziežu lapām. Šajā gadījumā augsnes pH paaugstināšanu uzskata par efektīvu veidu, kā panākt gumiņu veidošanās stimulēšanu (Buerkert et al., 1990; Weisany, Raei, Allahverdipoor, 2013).

Minerālā **slāpekļa** klātbūtne augsnē var kavēt gumiņu veidošanos, nitrogenāzes aktivitāti un slāpekļa saistīšanu. Šāds efekts novērots, piemēram, audzējot soju gadījumos, kad slāpekļa koncentrācija pārsniedz 5mM. Turklāt novērots, ka parasti ieteicamā slāpekļa deva (40–60 kg N ha⁻¹), audzējot lauka pupas, samazina slāpekļa saistīšanas efektivitāti. Arī veģetācijas izmēģinājumos, audzējot lopbarības pupas, palielināta minerālā slāpekļa variantā, novērota kavēta gumiņu veidošanās (Marnauza, 1965). Tomēr, lai gan minerālā slāpekļa izmantošanai novērojama negatīva ietekme, tas **nelielā koncentrācijā ir būtisks** gumiņu

veidošanās sākumā, kā arī slāpekļa saistīšanās auga attīstības sākuma etapā (Graham, 1981; Voisin et al., 2002; Weisany, Raei, Allahverdipoor, 2013). Arī audzējot soju, nelielas minerālā slāpekļa devas (30–40 kg N ha⁻¹) var potenciāli uzlabot ražas kvantitāti un kvalitāti (Zute, Jansone, Šterna, 2021).

Gumiņbaktēriju nitrogenāzes darbības nodrošināšanai īpaši svarīga ir mikroelementu **molibdēna** un **dzelzs** pieejamība (Sessitsch et al., 2002; Weisany, Raei, Allahverdipoor, 2013). Molibdēns bieži vien var būt limitējošais faktors efektīvas simbiozes izveidošanai. Nepietiekīga molibdēna pieejamība augsnē var būtiski samazināt gumiņu veidošanos un atmosfēras slāpekļa saistīšanu, tādā veidā tieši ietekmējot tauriņziežu ražu (Brkic et al., 2004; Fageria, Stone, Santos, 2015). Molibdēna trūkums īpaši novērots skābās augsnēs, jo šādos apstākļos būtiski samazinās molibdēna biopieejamība (Wang et al., 2019d). Savukārt augsnē esošais dzelzs bieži vien ir nešķīstošā un līdz ar to – augiem neuzņemamā formā (Fe⁺³). Ir izdevies izdalīt gumiņbaktēriju celmus, kuri spēj pārveidot augsnē esošo Fe³⁺ augiem pieejamā formā – Fe²⁺, un nogādāt to saimniekauga šūnās (Antoun et al., 1998; Arora, Kang, Maheshwari, 2001). Dzelzs nepieciešamība optimālai gumiņbaktēriju darbībai izskaidrojama ar to, ka viena no visvairāk ražotajām olbaltumvielām gumiņbaktērijās ir dzelzi saturošais leghemoglobīns. Leghemoglobīns gumiņos saista skābekli, tādā veidā novēršot nitrogenāzes inhibēšanu. Dzelzs deficīta gadījumā novērota gumiņu masas samazināšanās, kas galvenokārt ir saistīts ar leghemoglobīna satura samazināšanos, kā arī bakteroīdu skaita samazināšanos un zema nitrogenāzes aktivitāte, salīdzinājumā ar augiem, kuriem nodrošināts pietiekošs dzelzs daudzums (Delgado, Bedmar, Downie, 1998; O'Hara, Boonkerd, Dilworth, 1988; Weisany, Raei, Allahverdipoor, 2013). Arī mikroelements **kobalts** ir nepieciešams gumiņbaktērijām leghemoglobīna sintēzei. Novērtos, ka kobalts gumiņbaktērijām nepieciešams gan brīvi dzīvojot augsnē, gan gumiņos simbiozes gadījumā (Sessitsch et al., 2002; Weisany, Raei, Allahverdipoor, 2013). Kobalta deficīta apstākļos novērojama kavēta gumiņu attīstība (Weisany, Raei, Allahverdipoor, 2013).

Pilnvērtīgai gumiņbaktēriju attīstībai nepieciešami arī tādi mikroelementi kā **varš**, **bors** un **niķelis**. Šo elementu deficīta gadījumā novēroti gumiņu attīstības traucējumi, kavēta simbiozes izveidošanās, kā arī samazināta slāpekļa saistīšanas efektivitāte (Weisany, Raei, Allahverdipoor, 2013). Bors ir nozīmīgs polisaharīdu ražošanā, kas var būtiski ietekmēt gumiņu veidošanos un līdz ar to – atmosfēras slāpekļa saistīšanas efektivitāti (Abreu et al., 2012). Savukārt novērots, ka augšnes apstrāde ar niķeli uzlabo gumiņbaktēriju augšanu, palielinot gumiņu izmēru, kā arī uzlabojot saimniekauga ražu (Bertrand, de Wolf, 1967). Uzskata, ka nelielos daudzumos niķelis ir būtisks hidrogenāzes darbībā, kurai savukārt ir tieša ietekme uz slāpekļa saistīšanas efektivitāti (Brodrick, Giller, 1991). Tomēr pārāk lielas niķeļa devas ir toksiskas ne tikai augiem, bet arī var samazināt gumiņbaktēriju efektivitāti (Dalton, Evans, Hanus, 1985).

Gumiņbaktēriju izdzīvošanu augsnē, auga sakņu infekciju un gumiņu funkcionalitāti būtiski ietekmē arī augšnes pH, augšnes sāļums, nokrišņu daudzums, temperatūra, un citi apkārtējās vides faktori (Chu et al., 2010; Dequiedt et al., 2009; Fierer, Jackson, 2006). **Augšnes pH** ietekmē gumiņbaktēriju augšanu un izdzīvošanu augsnē, gumiņu veidošanos, izveidoto gumiņu daudzumu, nitrogenāzes aktivitāti, flavonoīdu daudzumu un kvalitāti, un gala rezultātā – saistītā slāpekļa daudzumu (Andrés et al., 2012; Graham et al., 1994; Zahran, 1999). Uzskata, ka optimālā augšnes pH normālai gumiņbaktēriju funkcionēšanai lielākoties ir pH 6.0–7.5 (Nollendorfs, Karlsons, 2023; Somasegaran, Hoben, 1994). Arī vairākumam tauriņziežu nepieciešama neitrāla vai nedaudz skāba augsne (Graham et al., 1994). Novērots, ka augšnes skābums var samazināt fosfora, kalcija un molibdēna pieejamību, kas savukārt negatīvi ietekmē gan gumiņbaktēriju, gan saimniekauga augšanu. Augsnē ar pH zem 5.5 novērota traucēta gumiņbaktēriju piesaistīšanās pie tauriņziežu spurgaliņām (Ibrahim et al., 2022; Zahran, 1999), kā arī novērota gumiņbaktēriju populāciju samazināšanās (Slattery,

Pearce, Slattery, 2004; Yamal et al., 2016). Tomēr ir gumiņbaktēriju celmi, kuri spēj pielāgoties augšanai augsnē ar zemu pH un veidot efektīvu simbiozi ar priekšnosacījumu, ka arī saimniekaugs ir izturīgs pret šādu augsnes pH (Zahran, 1999). *In vitro* izmēģinājumos, audzējot gumiņbaktērijas uz dažādu pH saturošām barotnēm, novēroti atsevišķi *Rhizobium* un *Bradyrhizobium* gumiņbaktēriju celmi, kuri uzrāda normālu augšanu arī zema pH gadījumā (Graham et al., 1994). Savukārt lauka izmēģinājumos Horvātijā no augsnes ar pH 4.16–5.00 izdalīti vairāki savvaļas gumiņbaktēriju celmi, kas izveidojuši simbiotiskas attiecības ar soju. Līdzīgi kā ir izdalītas efektīvas gumiņbaktērijas no augsnēm ar zemu pH (4.5), arī no augsnēm ar paaugstinātu pH (9.0) ir izdalītas gumiņbaktērijas, kuras spēj veidot gumiņus un saistīt slāpekli (Wang et al., 2019a).

Pārlietu liela **sāls koncentrācija** augsnē, ko lielākoties pētījumos pārbauda nosakot nātrija hlorīda paaugstinātu koncentrāciju, var būt toksiska gumiņbaktērijām un izraisīt osmotisko stresu, rezultātā kavējot gumiņu veidošanos, samazinot gumiņbaktēriju populācijas lielumu augsnē un līdz ar to – samazinot slāpekļa saistīšanas efektivitāti (Andrés et al., 2012; Zahran, 1999). Gumiņbaktēriju izturību pret sāls stresu nosaka baktēriju genotips (Dogra et al., 2013). Lauka izmēģinājumos ar soju novērots, ka tolerance pret sāls stresu atšķiras starp ātri augošajām un lēni augošajām gumiņbaktērijām. Piemēram, ātri augoši gumiņbaktēriju celmi, kas pieder *Rhizobium* ģintij, uzrāda lielāku izturību pret sāls stresu. Turpretim lēni augošās gumiņbaktērijas (piemēram, *Bradyrhizobium*) uzrāda salīdzinoši mazāku izturību. Izteikts minējums, ka šo atšķirību pamatā ir tieši baktēriju augšanas ātrums (Elsheikh, Wood, 1995). Novērots, ka *Sinorhizobium* ģints gumiņbaktēriju celmi ir izturīgāki pret sāls stresu (NaCl koncentrācija līdz pat 3%), salīdzinājumā ar gumiņbaktēriju celmiem, kas pieder pie *Rhizobium* un *Mesorhizobium* ģintīm (Rejili et al., 2012). Savukārt kādā citā pētījumā novērots, ka *Bradyrhizobium* ģints baktēriju spēja veidot gumiņus palēninās gadījumā, ja NaCl koncentrācija sasniedz 0.2%. Turklāt secināts, ka paaugstinātas NaCl koncentrācijas gadījumā negatīvi ietekmēta *nod* gēnu ekspresija, kā rezultātā var aizkavēties vai pilnībā apstāties gumiņu veidošanās (Andrés et al., 2012). Tomēr izturību pret sāls stresu nevar attiecināt uz kādu konkrētu gumiņbaktēriju ģinti. Pētījumā, kurā novērota gumiņbaktēriju augšana dažādu NaCl koncentrāciju klātbūtnē, noskaidrots, ka izturība pret sāls stresu atšķiras arī starp vienas gumiņbaktēriju sugas dažādiem celmiem (Amarger, Macheret, Laguerre, 1997). Gumiņbaktēriju izturību pret sāls stresu regulē sarežģīts bioķīmiskais mehānisms. Ir novērots, ka gumiņbaktērijas spēj ražot dažādus ķīmiskus savienojumus – osmolītus, fitohormonus un dažādus enzīmus, kuri spēj atbalstīt saimniekauga aizsardzības mehānismu sāls stresa gadījumā. Šādus celmus, kuri paaugstinātas sāls koncentrācijas apstākļos spēj augt un saistīt slāpekli, varētu izmantot komerciālu preparātu izveidē, lai uzlabotu saimniekaugu augšanu sāļā augsnē (Naveed et al., 2015).

Laikā, kad novērojamas straujas **klimata izmaiņas**, aktualizējas problēmas, kas saistītas ar tauriņziežu audzēšanu. Tauriņzieži, salīdzinoši seklās sakņu sistēmas dēļ, ir īpaši pakļauti **abiotiskajam stresam** – gan karsumam un sausuma, kā arī pārlietu lielumam augsnes mitrumam (Blair, Wu, Wang, 2016; Dwivedi et al., 2006; Hamblin, Tennat, 1987; Justino, Sodek, 2013). Abiotiskā stresa apstākļu ietekmē negatīvi ietekmēta arī gumiņbaktēriju sugu daudzveidību, kā arī tauriņziežu–gumiņbaktēriju simbiozes efektivitāte. Tiek lēsts, ka vismaz 90% aramzemes ir pakļautas kāda veida biotiskajam vai abiotiskajam stresam (Chu et al., 2010; Dequiedt et al., 2009; Fierer, Jackson, 2006; Naveed et al., 2015). Apkārtējās vides stress veicina reaktīvo skābekļa formu (ROS) veidošanos. ROS, reaģējot ar olbaltumvielām un nukleīnskābēm, kavē šo molekulu normālu darbību (Yamal et al., 2016). Šie vides faktori var būtiski ietekmēt, piemēram, Nod faktoru signālmolekulu darbību, ietekmējot gumiņbaktēriju saimniekaugu diapazonu (Schultze et al., 1994). Vienas ģints dažādas gumiņbaktēriju sugas un pat vienas sugas dažādi baktēriju celmi var uzrādīt krasi atšķirīgas atbildes reakcijas stresa apstākļos (Pires et al., 2018). Pastāv viedoklis, ka tieši apkārtējās vides apstākļi ir virzījuši

gumiņbaktēriju evolucionāro pielāgošanos vides apstākļiem un līdz ar to – izmaiņas genotipā (Howieson, O'Hara, Carr, 2000; Naveed et al., 2015). Pētījumi norāda uz to, ka veiksmīgas slāpekļa saistīšanas priekšnosacījums ir efektīvu gumiņbaktēriju celmu atlase, izvēloties celmus, kas ir pielāgoti vietējiem apkārtējās vides apstākļiem (Graham, 2008; Kawaka et al., 2014; Zahran, 1999). Atbilstoši izvēlēti gumiņbaktēriju celmi uzlabo tauriņziežu ražu ne tikai optimālos apstākļos, bet arī spēj uzlabot saimniekauga izturību un augšanu nelabvēlīgos apkārtējās vides apstākļos (Abolhasani et al., 2010; Elboutahiri, Thami-Alami, Udupa, 2010; Naveed et al., 2015).

Temperatūrai, īpaši sakņu zonā, ir nozīmīga ietekme uz simbiozi starp gumiņbaktērijām un tauriņziežiem. Temperatūra ietekmē augsnē brīvi dzīvojošo gumiņbaktēriju izdzīvošanu, konkurētspēju, auga sakņu inficēšanas procesu, gumiņu veidošanos, kā arī slāpekļa saistīšanas aktivitāti (Alexandre, Oliveira, 2013; Andrés et al., 2012; Paulucci et al., 2011). Optimālā temperatūra, kas ir atbilstoša vairākumam gumiņbaktēriju, ir 25–31 °C (Somasegaran, Hoben, 1994; Zhang, Lynch, Smith, 1995). Tomēr nav vienas konkrētas temperatūras, kas atbilstu visām gumiņbaktēriju un tauriņziežu simbiozēm (Alexandre, Oliveira, 2013). Gumiņbaktēriju augšanas optimālā temperatūra variē ne tikai starp sugām, bet arī starp gumiņbaktēriju celmiem (Laranjo, Oliveira, 2011). Novērots, ka pazemināta temperatūra (2–15 °C) var negatīvi ietekmēt gumiņu attīstību un slāpekļa saistīšanas aktivitāti, rezultātā samazinot tauriņziežu ražu (Ahlawat, Jain, Nainawatee, 1998; Lira et al., 2005; Lynch, Smith, 1994; Zhang, Smith, 1994; Zhang, Lynch, Smith, 1995). Arī paaugstināta temperatūra negatīvi ietekmē gumiņbaktērijas. Ir novērots, ka gumiņbaktērijas nespēj augt, ja temperatūra pārsniedz 37 °C (Graham, 1992). Pārāk liels karstums kavē gumiņbaktēriju augšanu, samazina izdzīvošanas spējas, kā arī samazina baktēriju spēju kolonizēt saimniekauga sakņu sistēmu (Munevar, Wollum, 1981). Paaugstināta temperatūra var negatīvi ietekmēt gumiņbaktērijas arī netieši, traucējot auga fizioloģiskos procesus – fotosintēzi, elpošanu, ūdens apgādi, izmaiņas augu hormonos un metabolītos, nelabvēlīgi ietekmējot auga sakņu spurgaliņu veidošanos un līdz ar to – traucējot gumiņbaktērijām inficēt augu, izveidot gumiņus, kā arī negatīvi ietekmē izveidoto gumiņu funkcionalitāti (Pankhurst, Gibson, 1973; Roughley, Dart 1970). Kopumā uzskata, ka karstums ir viens no abiotiskajiem stresa faktoriem, kuriem gumiņbaktērijas ir vismazāk pielāgojušās (Naveed et al., 2015). Tomēr jāņem vērā, ka izturība pret karstumu atšķiras ne tikai starp gumiņbaktēriju sugām, bet arī starp vienas sugas celmiem (Laranjo, Oliveira, 2011). Ir novēroti gumiņbaktēriju celmi, kuri, ilgstoši pakļauti augstas temperatūras stresam, ir spējīgi pielāgoties šiem apstākļiem (Yamal et al., 2016). Gumiņbaktērijas uzsāk ražot karsuma šoka proteīnus, lai varētu pielāgoties augstas temperatūras stresam (Naveed et al., 2015; Vriezen, de Bruijn, Nüsslein, 2007). Izmēģinājumā ar soju novēroja, ka augu inokulācija ar karstuma izturīgu *Bradyrhizobium* ģints celmu uzlabo slāpekļa saistīšanas efektivitāti, uzlabo auga augšanu, kā arī rezultātā sniedz lielāku ražu. Šajā pētījumā secināts, ka gumiņbaktēriju celmus, kas izolēti no ģeogrāfiskajiem reģioniem ar karstu klimatu, varētu izmantot tauriņziežu inokulācijai, lai samazinātu karstuma stresa izraisītās sekas (Rahmani et al., 2009).

Gumiņbaktēriju izplatību un izdzīvošanu augsnē, kā arī slāpekļa saistīšanas aktivitāti ietekmē **augšnes mitrums** (Zahran, 1999; Andrés et al., 2012). Izmēģinājumos novērots, ka dažādām gumiņbaktēriju ģintīm atšķiras to izturība pret augšnes sausumu. Piemēram, uzskata, ka *Bradyrhizobium* ģints baktērijas ir izturīgākas pret īslaicīgu sausumu, salīdzinājumā ar *Rhizobium* ģints gumiņbaktērijām (Bottomley, 1992). Īslaicīgs sausuma stress izraisa gumiņbaktēriju populāciju samazināšanos, tomēr populācijas lielums atjaunojas, tiklīdz gumiņbaktērijas nav pakļautas šim abiotiskajam stresam. Ir reģistrēti gumiņbaktēriju celmi, kas pielāgojušies arī ilgstošam augšnes sausumam – piemēram, gumiņbaktēriju aktivitāte ir novērota arī tuksnešu augsnēs (Zahran, 1999). Izturība pret ilgstošu ūdens deficītu novērota arī laboratorijas apstākļos – identificēti *Ensifer/Sinorhizobium* ģintij piederoši gumiņbaktēriju

celmi, kas spējuši izveidot simbiotiskas attiecības ar lucernu pēc 35 gadu ilgas uzglabāšanas izzāvētā augsnē (Jensen, 1961). Uzskata, ka gumiņbaktērijas ražo antioksidantus, osmolītus un stresa olbaltumvielas, lai spētu izdzīvot ūdens deficīta apstākļos. Gumiņbaktēriju spēju izdzīvot ūdens deficīta apstākļos, var izmantot, lai samazinātu sausuma izraisīto negatīvo ietekmi uz tauriņziežu augšanu (Yang, Kloepper, Ryu, 2009). Pastāv hipotēze, ka gumiņbaktērijas spēj samazināt ūdens deficīta ietekmi uz augiem, izmainot sakņu morfoloģisko uzbūvi, oglekļa asimilācijas līmeni, transpirācijas ātrumu, kā arī lapas atvēršanās caurlaidību (Naveed et al., 2015). Tauriņziežu-gumiņbaktēriju simbiozes atbildes reakcija uz ūdens deficītu augsnē ir atkarīga ne tikai no stresa pakāpes, bet arī no auga attīstības stadijas (Zahran, 1999).

1.2.4. Gumiņbaktēriju klasifikācija

Gumiņbaktēriju iedalījums ir komplicēts, un tas laika gaitā ir mainījies, attīstoties mikroorganismu identifikācijas metodēm. Šobrīd pie šīs ekoloģiskās grupas pieskaita baktērijas, kas pieder pie – valsts: *Bacteria*, nodalījums: *Pseudomonadota* (iepriekš *Proteobacteria*). Šobrīd aptuveni 180 identificētās gumiņbaktēriju sugas iedala 21 ģintīs, kas pieder pie *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* un *Gammaproteobacteria* (turpmāk α -, β - un γ -*proteobacteria* vai α -, β - un γ -*proteobaktērijas*) klasēm (Chen et al., 2003; Moulin et al., 2001; Pongsilp, 2012; Wang et al., 2019f). Šajā taksonomiskajā sadalījumā simbiotiskās gumiņbaktērijas atrodas starp baktērijām, kas neveido simbiotiskās attiecības – starp endofītiskām, saprofītiskām un patogēnām baktērijām. Bieži vien šāda fenotipiskā daudzveidība novērojama ne tikai vienas klases, bet arī ģints un pat vienas sugas līmenī (Wang et al., 2019a). Gumiņbaktēriju taksonomisko iedalījumu regulāri pārskata un precizē, jo nepārtraukti tiek atklātas jaunas gumiņbaktērijas, kas pieder pie citām baktēriju ģintīm un sugām. Arī laika gaitā mainās kritēriji, kurus izmanto gumiņbaktēriju klasifikācijai (Pongsilp, 2012; Wang et al., 2019b).

Gumiņbaktēriju pētījumu pirmsākumos visas baktērijas, kuras veidoja gumiņus uz tauriņziežu saknēm, apvienoja vienā ģintī *Rhizobium*. Gumiņbaktēriju celmus klasificēja atkarībā no to saimniekaugiem (Fred, Baldwin, McCoy, 1932; Somasegaran, Hoben, 1994). **Gumiņbaktēriju saimniekaugi** ir augi, ar kuriem gumiņbaktērijas ir spējīgas veidot simbiotiskas attiecības. Ierobežots skaits saimniekaugu reaģē uz konkrētās gumiņbaktēriju sugas izdalītajām signālmolekulām – Nod proteīniem (Kijne, 1992). Novērots, ka daļai gumiņbaktēriju ir ļoti šaurs saimniekaugu loks, kamēr citas gumiņbaktērijas var veidot simbiotiskas attiecības ar dažādu ģinšu tauriņziežiem. Gumiņbaktēriju celma saimniekaugu diapazons ir atkarīgs no gēniem, kas atrodas baktēriju plazmīdās. Ir novēroti gadījumi, kad viens gumiņbaktēriju celms maina saimniekaugus, plazmīdu apmaiņas rezultātā (Iyer, Rajkumar, 2018). Uzskata, ka simbiotiskās attiecības starp tauriņziežiem un gumiņbaktērijām vairākkārt attīstījušās evolūcijas gaitā, līdz ar to ne visas gumiņbaktērijas spēj izveidot simbiotiskas attiecības ar visiem tauriņziežiem, un pastāv dažādas gumiņbaktēriju-saimniekaugu atbilstības pakāpes (Martinez-Romero, 2009; Sprent, 2007; Roberts et al., 2017).

Gumiņbaktēriju celmu iedalījums atkarībā no to saimniekaugiem vēl joprojām ir noderīgs praksē, komerciālajiem gumiņbaktēriju preparātiem (Wang et al., 2019b). Tomēr, pielietojot šādu sadalījumu, jāņem vērā gumiņu veidošanas un atmosfēras slāpekļa saistīšanas efektivitāte. Gumiņu veidošanās uz tauriņziežu saknēm ne vienmēr norāda uz efektīvu slāpekļa saistīšanu (Iyer, Rajkumar, 2018; Terpolilli et al., 2008). Bieži vien pētījumos ignorē to, ka daudzos gadījumos, kad izveidojas simbiotiskas attiecības starp augu un gumiņbaktērijām, nenotiek optimāla slāpekļa saistīšana. Šis apstāklis ir īpaši svarīgs, kad veido komerciālus gumiņbaktēriju preparātus un ieteikumus lauksaimniekiem, kā arī tad, kad pēta slāpekļa saistīšanā iesaistīto gēnu regulāciju (Giller, Herridge, Sprent, 2016). Tomēr gumiņbaktēriju

klasifikācija, kas balstīta uz saimniekaugiem, no kuriem gumiņbaktērijas izdalītas, bija viens no pirmajiem gumiņbaktēriju klasifikācijas veidiem, pirms bija attīstījušās molekulārās identifikācijas metodes. Šīs klasifikācijas pamatā ir fenotipiskie novērojumi, neņemot vērā gumiņbaktēriju ģenētisko daudzveidību un filoģenētisko radniecību. Gumiņbaktērijas apkopoja vienā *Rhizobium* ģintī un izdalīja sešas sugas: *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupini*, *R. leguminosarum* un *R. japonicum* (Coutinho, De Oliveira, Moreira, 2000; Fred, Baldwin, McCoy, 1932; Wang et al., 2019a). Gumiņbaktērijas, kuras izdalītas no gumiņiem uz zirņu, vīķu un pupu saknēm, apvienoja *R. leguminosarum* sugā. No āboliņa, dārza pupiņām un sojas izdalītās gumiņbaktērijas attiecīgi klasificēja – *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. japonicum*. *R. meliloti* apvienoja gumiņbaktērijas, kas izdalītas gan no lucernas, gan amoliņa sakņu gumiņiem. Savukārt no lupīnas un seradellas izdalītās gumiņbaktērijas iekļāva *R. lupini* gumiņbaktēriju sugā (1.1. tabula). Šī gumiņbaktēriju klasifikācija ilgstoši izmantota praksē, izvēloties gumiņbaktēriju celmus tauriņziežu sēklu apstrādē.

1.1. tabula

Gumiņbaktēriju klasifikācija, pamatojoties uz to saimniekaugiem (pēc Coutinho, De Oliveira, Moreira, 2000)

Saimniekaugs	Gumiņbaktēriju sugas
Zirņi, vīķi, pupas	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
Āboliņš	<i>Rhizobium trifolii</i>
Dārza pupiņas	<i>Rhizobium phaseoli</i>
Lucerna, amoliņš	<i>Rhizobium meliloti</i>
Lupīna, seradella	<i>Rhizobium lupini</i>
Soja	<i>Rhizobium japonicum</i>

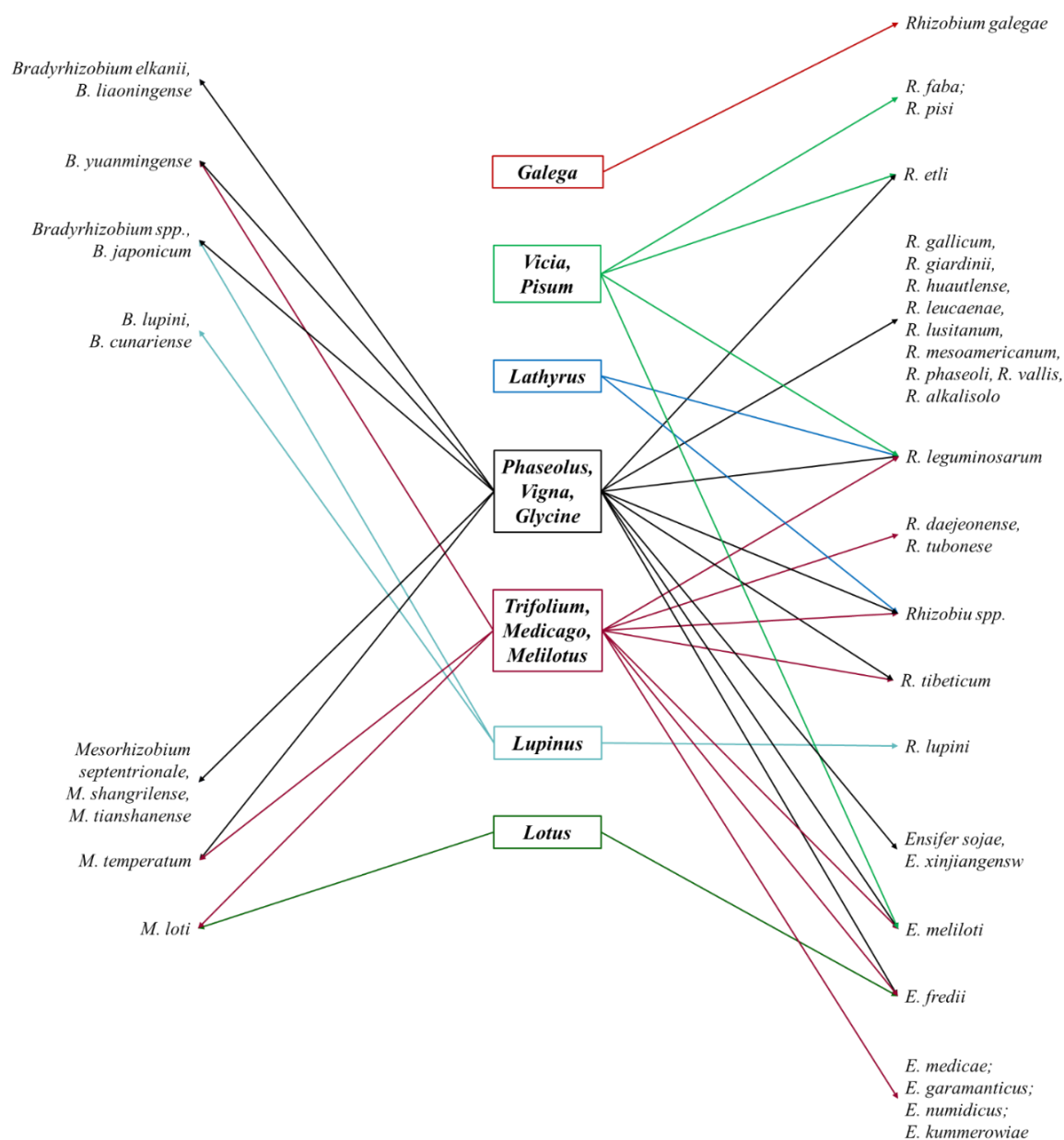
Pēdējos gados veikti apjomīgi pētījumi, kuros identificēti no dažādiem tauriņziežiem izdalīti gumiņbaktēriju celmi. Apkopojot šos rezultātus, redzams, ka liela daļa saimniekaugu spēj veidot simbiotiskas attiecības ar dažādu sugu un pat ģinšu gumiņbaktērijām (1.5. att.). Tajā pašā laikā ir gumiņbaktēriju sugas, kuras ir izteikti specifiskas konkrētam saimniekaugam (Pongsilp, 2012). Jāņem vērā, ka 1.5. attēlā izmantoti dati, kas iegūti pētījumos ārpus Latvijas. Tāpēc, lai gan tie reprezentē gumiņbaktēriju sugu atbilstību konkrēto saimniekaugu ģintīm, šie dati nesniedz informāciju par Latvijas augsnē esošajām gumiņbaktēriju sugām.

Attīstoties gumiņbaktēriju pētniecībai, novērtos, ka gumiņbaktēriju atbilstību konkrētam saimniekaugam noteicošie *nod* grupas gēni, kas atbild par gumiņu veidošanos, ir salīdzinoši vienkārši pārnēsami starp dažādām gumiņbaktērijām. Tāpēc mūsdienās, kad ir pieejama tik plaša informācija par gumiņbaktēriju ģenētisko radniecību, redzams, ka gumiņbaktēriju klasifikācija, kas balstīta tikai uz gumiņbaktēriju atbilstību saimniekaugiem, nav korekta (Wang et al, 2019a).

Gumiņbaktēriju celmi pirms molekulārās identifikācijas ieviešanas, klasificēti ne tikai atkarībā no to saimniekaugiem, bet arī pēc augšanas ātruma, kā arī atkarībā no tā, vai gumiņbaktērijas ražo bāziskus vai skābus savienojumus (Somasegaran, Hoben, 1994). Gumiņbaktēriju klasifikācijā *Rhizobium* ģints papildināja ar *Bradyrhizobium* ģinti, kas aptvēra lēni augošo un bāziskus savienojumus veidojošus gumiņbaktēriju celmus. Abas šīs ģintis iepriekš piederēja *Rhizobiaceae* dzimtai (Pongsilp, 2012).

Molekulārās bioloģijas identifikācijas metodēm kļūstot precīzākām, attīstoties ģenētisko marķieru pielietojumam un sniedzot lielāku bioloģiskās daudzveidības izšķirtspēju, tika ievērojami uzlabotas zināšanas par gumiņbaktēriju taksonomiju (Sessitsch et al., 2002).

Balstoties uz filoģenētiskajām analīzēm, daļu sugu no *Rhizobium* ģints pārnēsa uz *Bradyrhizobium* ģinti, savukārt daudzas sugas, kuras sākotnēji iekļāva *Rhizobium* un *Bradyrhizobium* ģintīs, sadalīja un apvienoja jaunās ģintīs. Ātri augošos sojas gumiņbaktēriju celmus apvienoja jaunā ģintī – *Sinorhizobium* (Sikora, Redžepovič, 2003). Tomēr ņemot vērā, ka sešus gadus pirms *Sinorhizobium* ģints nosaukuma publicēšanas, publicēja baktēriju, kas pieder pie ģints *Ensifer*, tad, lai gan *Sinorhizobium* ģints nosaukums bija ieguvis lielāku atpazīstamību, Prokariotu Sistemātikas Starptautiskā komiteja (ICSP) nolēma priekšroku dot *Ensifer* ģints nosaukumam. Daudzi zinātnieki, iekaitot ICSP *Agrobacterium* un *Rhizobium* apakškomiteju publiski nepiekrīt šādam lēmumam. Zinātniskajās publikācijās bieži izmanto tikai *Sinorhizobium* ģints nosaukumu vai norāda abu ģinšu nosaukumus kā sinonīmus (*Sinorhizobium/Ensifer*) (Pongsilp, 2012; Young, 2010; Young, 2003). *Bradyrhizobium*,



1.5. att. Tauriņziežu ģintis un to simbiotiskās gumiņbaktēriju sugas (pēc Pongsilp, 2012)

Attēla vidū ierāmētas ir Latvijā visbiežāk audzētās tauriņziežu ģintis. Ar bultām norādītas saimniekaugiem atbilstošās gumiņbaktēriju sugas.

Rhizobium un *Sinorhizobium/Ensifer* ģintis savā starpā atšķiras pēc guanīna–citozīna (G+C) sastāva, DNS–DNS hibridizācijas rezultātiem, seroloģiskajām analīzēm un citiem parametriem (Chen, Yan, Li, 1988). Pamatojoties uz 16S rRNS gēna sekvenču analīzēm, daļu no *Rhizobium* ģints sugām apvienoja jaunā ģintī *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997). Savukārt, balstoties gan uz 16S rRNS gēna, gan MLSA filoģenētiskajām analīzēm, daļu no *Rhizobium* ģints baktērijām iedala divās jaunās ģintīs – *Neorhizobium* un *Pararhizobium* (Wang et al., 2019a).

Lielākoties pētījumi par gumiņbaktērijām, tajā skaitā pētījumi Latvijā aptver gumiņbaktērijas, kas ietilpst α -proteobaktēriju klasē – *Rhizobium*, *Sinorhizobium/Ensifer*, *Bradyrhizobium* un *Mesorhizobium* ģintis (1.2. tabula) (Saidi et al., 2013; Young, Haykka, 1996). Gumiņbaktērijām, kas pieder α -proteobaktēriju klasei, ir novērota visplašākā sugu ģeogrāfiskā izplatība, kā arī visplašākais saimniekaugu diapazons (Wang et al., 2019f). Lai gan gumiņbaktērijas, kas pieder β - un γ -proteobaktēriju klasēm ir daudz mazāk izpētītas, ir novērots, ka arī šīs baktērijas spēj izveidot simbiotiskas attiecības ar tauriņziežiem, norādot uz to, ka simbiotiskas attiecības ar tauriņziežiem ir plašāks fenomens, nekā līdz šim uzskatīts. Šis bija salīdzinoši jauns atklājums (kopš 2000. gadu sākuma), salīdzinot ar vairāk kā simts gadus ilgajiem gumiņbaktēriju pētījumiem, un izmainīja senos uzskatus par to, ka tikai baktērijas no α -proteobaktēriju klases spēj veidot gumiņus uz tauriņziežu saknēm (Chen et al., 2003; Minamisawa et al., 2002; Moulin et al., 2001; Shiraishi, Matisushita, Hougetsu, 2010). Latvijā līdz šim, strādājot ar tauriņziežiem un gumiņbaktērijām, par pākšaugu simbiotiskajām baktērijām uzskatīti tikai α -proteobaktēriju klases baktēriju celmi.

1.2. tabula

Gumiņbaktēriju klasifikācija, balstoties uz ģenētisko radniecību

Klase	Dzimta	Ģintis	Saimniekaugi
α - proteobacteria	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Vicia faba</i> , <i>V. cracca</i> , <i>V. hirsute</i> , <i>V. sativa</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>M. lupulina</i> , <i>Galega orientalis</i> , <i>Trifolium repens</i> , <i>T. pratense</i> , <i>Lathyrus japonicus</i> , <i>L. hirsutus</i> , <i>Lupinus albus</i> , <i>Melilotus officinalis</i> , <i>M. albus</i> , <i>Vigna radiata</i> , <i>V. unguiculata</i>
		<i>Ensifer/ Sinorhizobium</i>	<i>Vicia faba</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Melilotus albus</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Vigna radiata</i> , <i>V. unguiculata</i>
		<i>Neorhizobium</i>	<i>Galega</i> sp.

Klase	Dzimta	Ģintis	Saimniekaugi
α - proteobacteria	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Medicago sativa</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Vigna radiata</i> , <i>Lupinus luteus</i> , <i>L. albus</i> , <i>L. angustifolius</i>
	<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Vigna radiata</i> , <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Trifolium lupinaster</i>
β - proteobacteria	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Vigna sp.</i>
γ - proteobacteria	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Vicia faba</i>

Tabulā iekļautas gumiņbaktēriju ģintis, kas spēj izveidot simbiozi ar saimniekaugiem, kurus audzē Latvijas klimatiskajos apstākļos (Bontemps et al., 2010; Leite et al., 2017; de Oliveria-Longatti et al., 2015; Pongsilp, 2012; Ramirez et al., 2019; Saidi et al., 2013).

1.3. Gumiņbaktēriju daudzveidības noteikšana

Gumiņbaktēriju daudzveidību ietekmē četri faktori – 1) evolucionārā vēsture; 2) dabiskā atlase, pielāgojoties apkārtējās vides apstākļiem; 3) pielāgošanās saimniekaugiem un spēja uz to saknēm veidot gumiņus, pateicoties izmaiņām simbiotiskajos gēnos; un 4) horizontālā gēnu pārnese starp gumiņbaktērijām, veidojot jaunas gēnu kombinācijas (Wang et al., 2019b). Vadoties pēc Prokariotu Sistemātikas Starptautiskās komitejas (ICSP) vadlīnijām, prokariotu, piemēram gumiņbaktēriju, suga sevī apvieno baktēriju celmus, kuri ir fenotipiski līdzīgi un kuriem ir genomu līdzība (vismaz 70% DNS-DNS hibridizācija un 16S rRNS sekvenču līdzība ar ne vairāk par 3% atšķirībām) (Mazur et al. 2015; Rossello-Mora, Amann, 2001). Pirms molekulārās bioloģijas attīstības, gumiņbaktērijas klasificēja, balstoties uz to fenotipiskajām īpašībām (Kwon et al., 2005). Lai noteiktu gumiņbaktēriju **fenotipisko daudzveidību**, izmanto dažādas metodes: 1) seroloģiskās analīzes; 2) enzīmu, izdalīto polisaharīdu un taukskābju sastāva noteikšana; 3) bakteriofāgu noteikšana; 4) šķīstošo proteīnu identifikācija; 5) kā arī gumiņbaktēriju celma simbiotiskās efektivitātes novērtējums (piemēram, ražas lielums un kvalitāte). Tomēr zinātnieki ir nonākuši pie slēdziena, ka gumiņbaktēriju fenotipiskā aprakstīšana nav pietiekoša pilnvērtīgai gumiņbaktēriju identifikācijai un daudzveidības noteikšanai. Turklāt ir vairākas gumiņbaktēriju sugas, kas savā starpā nav atšķiramas, vadoties tikai pēc fenotipiskajām atšķirībām (Hartmann, Amarger, 1991; Pongsilp, 2012). Baktēriju taksonomisti uzsver nepieciešamību izmantot vairāku metožu kopumu, lai pilnvērtīgi aprakstītu baktērijas (Murray et al., 1992; Young, 1992; Wang et al., 2019b,f).

Pateicoties molekulārās bioloģijas metožu attīstībai, mūsdienās strauji attīstās baktēriju identifikācija un daudzveidības pētījumu precizitāte, kas ļāvusi noteikt gumiņbaktēriju plašo ģenētisko daudzveidību, īpaši augsnes paraugos – savvaļas gumiņbaktēriju populācijās (Sikora, Redžepovič, 2003). **Genotipisko daudzveidību** var raksturot, izmantojot molekulārās bioloģijas metodes, kas balstītas uz DNS analīzēm. Metodes, kuras bieži izmanto šim nolūkam: 1) DNS sekvenču analīzes; 2) genotipēšanas metodes, kas ietver gan amplificēto fragmentu garuma polimorfisma (AFLP) analīzi, gan restrikcijas fragmentu garuma polimorfisma (RFLP)

analīzi; 3) un plazmīdu profilēšana. Šīs metodes papildina viena otru un sniedz pilnīgāku priekšstatu par gumiņbaktēriju celmu ģenētisko daudzveidību (Pongsilp, 2012). Ārpus Latvijas veikti daudzi pētījumi tauriņziežu-gumiņbaktēriju simbiozes izziņāšanai, izmantojot molekulārās bioloģijas metodes. Gumiņbaktēriju daudzveidības pētniecībai pievērsta īpaša uzmanība, ar kuras palīdzību skaidro līdz šim iegūtos apjomīgos fenotipisko raksturojumu rezultātus (Kondorosi et al., 1989; Sessitsch et al., 2002; Surin, Downie, 1989). Priekšrocība molekulāro marķieru izmantošanai gumiņbaktēriju identifikācijā ir tāda, ka šos rezultātus neietekmē apkārtējie vides apstākļi, atšķirībā no, piemēram, lauka izmēģinājumiem, kur slāpekļa saistīšanas efektivitāti ietekmē ne tikai gumiņbaktēriju genotips, bet arī ļoti daudz ārējie faktori. Senāk molekulārās bioloģijas metožu izmantošana bija daudz laikietilpīgāka, bet, attīstoties molekulārās bioloģijas zināšanām un tehnoloģijām, šīs metodes ir salīdzinoši vienkārši un plaši pielietojamas. Izmantojot šīs metodes, rezultāti ir ātrāk iegūstami, un tie var uzrādīt daudz lielāku ģenētisko daudzveidību nekā veicot identifikāciju pēc fenotipisko īpašību identifikācijas metodēm. Sekvencēšanas rezultāti sniedz detalizētu un uzticamu informāciju par gumiņbaktērijām. Turklāt publiski pieejamās datubāzes strauji tiek papildinātas ar jaunu informāciju, jo molekulārās bioloģijas metodes ir visplašāk pielietotās gumiņbaktēriju daudzveidības pētījumos (Konstantinidis, Tiedje, 2005; Murray et al., 1992). Gumiņbaktēriju sugu saraksts nepārtraukti papildinās, un īpaši straujš pieaugums novērojams pateicoties pētījumiem, kas izmanto 16S rRNS gēna sekvencēšanu gumiņbaktēriju pētījumos (Janda, Abbott, 2007). DNS sekvencēšanas pamatā ir slāpekļa bāzu (adenīns, guanīns, citozīns, timīns) secības noteikšana (Reeve et al., 2016a). Izstrādātas vairākas metodes, kas balstītas uz polimerāzes ķēdes reakcijas (PCR) metodi, lai pētītu gumiņbaktēriju celmu ģenētisko daudzveidību un radniecību. Visbiežāk izmanto hromosomālos marķierus (piemēram, 16S rRNS gēns, 16S-23S rRNS ITS, *dnaK*, *recA*, *atpD* gēni) un plazmīdās esošos simbiotiskos marķierus (piemēram, *nodD*, *nodA*, *nodC*, *niH* gēni) (Eardly et al., 2005; Gaunt et al., 2001; Laguerre et al., 2001; Laguerre et al., 2003; Mutch, Young 2004; Silva et al., 2005; Tamimi, Young, 2004).

Soļi, kas jāveic gumiņbaktēriju identifikācijā, neatkarīgi no izvēlēta molekulārā marķiera ir līdzīgi. Veic pētāmā gumiņbaktēriju celma DNS izdalīšanu un universālo praimeru izvēli, atkarībā no analizējamā gēna. Ņemot vērā izmantoto ģenētisko marķieri, pielāgo PCR protokolu, lai veiktu attiecīgā gēna amplifikāciju. Rezultātā iegūst konkrētā gēna DNS fragmentu, kuru sekvencē. Šī fragmenta nukleīnskābju secību salīdzina ar sekvencēm, kas atrodas publiski pieejamās datu bāzēs, kā piemēram GenBank (NCBI¹⁰). Lai vizualizētu celmu ģenētiskās atšķirības, veic analizējamo sekvenču līdzības salīdzinājumu, kā arī filoģenētisko analīzi (Pongsilp, 2012).

1.3.1. Genotipēšanas metode gumiņbaktēriju daudzveidības noteikšanā

Viena no populārākajām metodēm baktēriju identifikācijā ir DNS genotipēšanas metode, izmantojot PCR. Šīs metodes pamatā ir DNS fragmentu amplificēšana, izmantojot speciāli izvēlētus praimerus (van Berkum, Elia, Eardly, 2006). Gumiņbaktēriju celmu daudzveidības noteikšanai visbiežāk izmanto amplificēto fragmentu garuma polimorfisma (AFLP) (Aserse et al., 2012; van Berkum, Elia, Eardly, 2006). Šīs metodes priekšrocība ir nelielās izmaksas, jo gumiņbaktēriju filoģenētikas noteikšana ar šo metodi ietver PCR un elektroforēzes gēla metodes, bez sekvencēšanas nepieciešamības. Šīs metodes pamatā ir veiksmīga praimeru izvēle, kas var vienlaicīgi amplificēt vairākus konkrētus DNS fragmentus, kuru izmēri ir

¹⁰ National Center for Biotechnology Information database, [Tiešsaiste] [skatīts 19.02.2023.]. Pieejams: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

atšķirīgi. Unikālo amplificēto fragmentu profilu (*fingerprint*) vizualizē izmantojot elektroforēzes gelu. Aprakstīti vairāki praimeru pāri (ERIC, REP, BOX), kas izmantojami gumiņbaktēriju daudzveidības noteikšanā (Gillings, Holley, 1997; Ogutcu et al., 2009; Vinuesa et al., 2005). Piemēram, ar BOX-PCR metodi iespējams atšķirt ļoti tuvu radniecīgus gumiņbaktēriju celmus, tāpēc šo metodi izmanto vēl joprojām. Lai gan ar šīs metodes palīdzību ir iespējams veikt gumiņbaktēriju identifikāciju, AFLP metode ir salīdzinoši sarežģīta un ļoti laikietilpīga (Wang et al., 2019b).

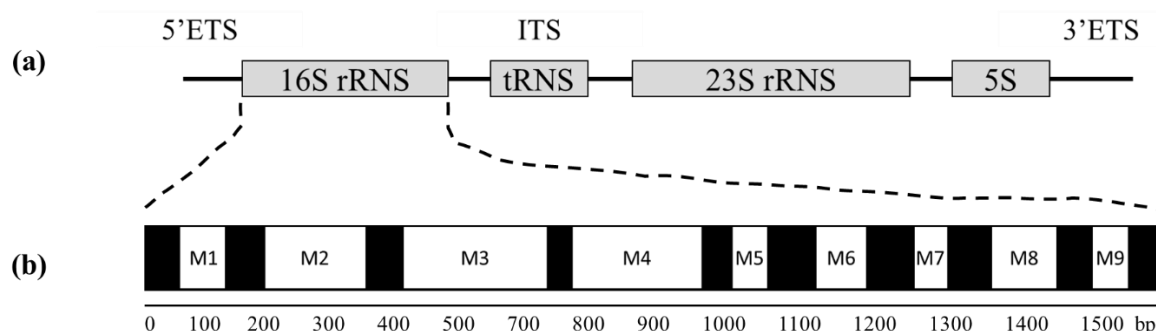
Genotipēšanas metodi bieži izmanto *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* un *Mesorhizobium* ģinšu pētījumos (Reeve et al., 2016b). Tomēr, tā kā šī metode neiekļauj DNS fragmentu sekvenčēšanu, pārliecinošu fragmentu profilu novērtējuma analīze ir ierobežota, kas var apgrūtināt gumiņbaktēriju celmu ģenētisko atšķirību izvērtēšanu. Piemēram, tas, ka divi fragmenti ir vienāda izmēra, ne vienmēr nozīmē, ka šie fragmenti ir ģenētiski identiski. Kā arī, iegūto rezultātu pārnese ir ierobežota, apgrūtinot dažādu izmēģinājumu rezultātu salīdzināšanu. Lai varētu pilnvērtīgi salīdzināt genotipēšanas rezultātus, ir jāveic analīzes, iekļaujot vairākus atsauces standartus. Tādēļ genotipēšanas metodi parasti izmanto kā vienu no vairākām metodēm (piemēram, papildus 16S rRNS gēna sekvenčēšanai), aprakstot gumiņbaktēriju ģenētisko daudzveidību (van Berkum, Elia, Eardly, 2006). Lai efektīvi izmantotu genotipēšanas metodi, nepieciešams zināt pētāmo gumiņbaktēriju piederību konkrētai dzimtai, kas ne vienmēr ir iespējams (Browman et al., 2015).

1.3.2. Ribosomālo gēnu izmantošana gumiņbaktēriju identifikācijā

16S rRNS gēns, ko dēvē arī par 16S rDNS, ir aptuveni 1500 bāzu pāru (bp) garš DNS fragments, kas kodē mazās apakšvienības ribosomālo RNS (rRNS) (Janda, Abbott, 2007; Kawaka et al., 2018; Pongsilp, 2012) un ieņem nozīmīgu vietu šūnu funkcionēšanā (Pei et al., 2010). 16S rRNS gēns ir **konservatīvs** DNS reģions baktēriju genomā, kas atrodams visās baktērijās. Šis ir iemesls, kāpēc 16S rRNS gēnu plaši izmanto kā marķieri, lai veiktu baktēriju taksonomisko un filoģenētisko identifikāciju (Tran, Pham, Phan, 2017). Kopš PCR metodes atklāšanas, šis gēns kļuvis par visplašāk pielietoto marķieri, veicot filoģenētiskās analīzes un dodot iespēju klasificēt jaunas baktērijas (Browman et al., 2015; Rossello-Mora, Amann, 2001; Singer et al., 2016). 16S rRNS gēns līdz šim ir sekvenčēts tūkstošiem dažādu sugu baktērijām (Earl et al., 2018). Turklāt šis gēns kā molekulārais marķieris būtiski veicinājis baktēriju filoģenētikas pētījumus, un tā izmantošana gumiņbaktēriju ģenētiskās radniecības noteikšanā un klasifikācijā ir kļuvusi par standarta metodi (Aserse et al., 2012; Janda, Abbott, 2007; O'Hara et al., 2016; Sessitsch et al., 2002; Young, Downer, Eardly, 1991). Arī jaunu gumiņbaktēriju ģinšu un sugu aprakstīšanai izmanto 16S rRNS gēna sekvenčēšanas rezultātus (Janda, Abbott, 2007; Pongsilp, 2012). Tiek lēsts, ka 16S rRNS gēna sekvences izmantošana 90% gadījumos sniedz informāciju par baktēriju ģinti, savukārt baktēriju celma sugas piederību var noteikt 65 līdz 68% gadījumu (Drancourt et al., 2000; Mignard, Flandrois, 2006). Slietksnis, pie kura dažādus baktēriju celmus pieskaita pie vienas sugas, ir 97.0 – 98.7% līdzība šo celmu 16S rRNS gēnu sekvenčēs. Gumiņbaktēriju gadījumā gan novērojams, ka dažādus celmus, kuriem ir gandrīz identiskas 16S rRNS gēna sekvences, var iedalīt dažādās gumiņbaktēriju sugās (Wang et al., 2019b).

16S rRNS gēns sastāv gan no **konservatīviem** rajoniem, kuri ir identiski daudzām baktēriju ģintīm, gan arī no **mainīgiem** rajoniem (1.6.b att.), kas var saturēt atšķirīgu ģenētisko informāciju ne tikai starp dažādām sugām, bet arī sugas ietvaros – starp dažādiem celmiem (Janda, Abbott, 2007; Pongsilp, 2012). Pateicoties 16S rDNS konservatīvajiem rajoniem, šo gēnu plaši izmanto baktēriju evolucionāro attiecību pētījumos. Salīdzinošajai taksonomijai izmanto 16S rRNS gēna mainīgo rajonu fragmentu sekvences (Janda, Abbott,

2007; Pongsilp, 2012; Rosselli et al., 2016). Lielākais šķērslis 16S rRNS gēna izmantošanā baktēriju daudzveidības pētījumos ir saistīts ar pirmo DNS amplifikācijas soli, jo atbilstošu oligonukleotīdu izvēle PCR reakcijai ir ļoti būtiska, bet ne vienmēr vienkārša. Lai veiktu veiksmīgu baktēriju identifikāciju, bieži pietiek ar 500 līdz 700 bp lielu gēna fragmenta sekvenču. Tomēr būtiska ir pareizā gēna reģiona sekvenču izvēle. Identifikācijas rezultāti var atšķirties no tā, kuru gēna reģionu analizē. Pētījumos bieži izmanto kādu no sekojošajiem mainīgajiem gēna fragmentiem: M2, M3, M4, M1–M2, M1–M3, M2–M3, M2–M4, M3–M4, M4–5, M3–6 vai M–9 (Browman et al., 2015; Wagner et al., 2016). Baktēriju daudzveidības pētījumos pārsvarā izmanto M3–M4, M4–M5 vai M5–M6 fragmentus, (Earl et al., 2018; Pootakham et al., 2017). Tomēr novērots, ka visprecīzākos rezultātus iegūst, izmantojot 16S rRNS gēna reģionus M1 un M9, salīdzinājumā ar citiem gēna reģioniem (Browman et al., 2015).



1.6. att. Baktēriju ribosomālās RNS operona struktūra (a) un reprezentatīvs baktēriju 16S rRNS gēna sekvenču shematiskais attēlojums (b)

Attēlā (b) ietverti konservatīvie gēna rajoni (melnā krāsā) un mainīgie gēna rajoni (baltā krāsā; M1–M9). Veidots pēc Singer et al., 2016 (*Salmonella* spp.).

Mikroorganismu klasifikācija, izmantojot 16S rRNS marķieri kļuvusi par standarta metodi vides mikrobiomu analizēšanā (Earl et al., 2018). Pateicoties šiem mikrobiomu pētījumiem, publiski pieejamās datubāzēs (piemēram, GenBank (NCBI⁹) un SILVA¹¹) ir pieejami daudz mikroorganismu sekvenču dati, kas nepārtraukti tiek papildināti ar jauniem rezultātiem, tādēļ 16S rRNS gēnu var veiksmīgi izmantot visu baktēriju identifikācijā (Sessitsch et al., 2002; Young, Downer, Eardly, 1991). Tomēr šī marķiera izmantošanu baktēriju klasifikācijā ierobežo nepilna 16S rRNS gēna (aptuveni 500 bp) sekvenču (Earl et al., 2018), kuru bieži izmanto ātrai gūnibaktēriju celmu radniecības noteikšanai (Pongsilp, 2012). Tādēļ liela daļa brīvpieejas datubāzēs pieejamā informācija par vides paraugiem sastāv no daļējām 16S rRNS gēna sekvenču (Singer et al., 2016; Wagner et al., 2016). Lai gan atsevišķu 16S rRNS gēna mainīgo rajonu sekvenču izmantošana jaunu baktēriju identifikācijā ģints vai sugas līmenī aizņem mazāk laika, tomēr tikai pilna (M1–M9; ~1500 bp) vai gandrīz pilna garuma 16S rRNS gēna sekvenču uzrāda lielāku taksonomisko precizitāti. Līdz ar to tieši šie DNS fragmenti ir pierādīti kā atbilstošākie filoģenētiskajām analīzēm (Browman et al., 2015; Callahan et al., 2019; Earl et al., 2018; Johnson et al., 2019; Pootakham et al., 2017; Singer et al., 2016; Wagner et al., 2016; Young, Haukka, 1996). Pilna garuma 16S rRNS gēna sekvenču izmantošana palielina filoģenētisko izšķirtspēju (Earl et al., 2018).

Baktēriju ribosomālās RNS operona struktūra sastāv no gēna, kas kodē mazās apakšvienības ribosomālo RNS (16S rRNS), gēniem, kas kodē lielās ribosomu apakšvienības ribosomālo RNS (23S rRNS un 5S), transporta RNS (tRNS), kā arī DNS fragmentiem starp ribosomālo RNS apakšvienību gēniem (ITS) (1.6.a att.). Baktēriju genomā atrodas vairākas

¹¹ SILVA ribosomal RNA database, [Tiešsaiste] [skatīts 19.02.2023.]. Pieejams: <https://www.arb-silva.de/>

ribosomālās RNS gēnu kopijas. Vienā ribosomālās RNS operonā atrodas katra šī gēna viena kopija. Savukārt genomā var atrasties 1–15 šādi operoni (Dethlefsen, Schmidt, 2007). Vairākas ribosomālās RNS gēna (piem., 16S rRNS gēna) kopijas genomā ar iespējamām variācijām šī gēna sekvencē, var apgrūtināt šo gēnu izmantošanu baktēriju identifikācijā (Ibal et al., 2019). Ribosomālās RNS brīvpieejas datubāzē *rrnDB*¹² atrodama informācija par gumiņbaktēriju ģinšu un atsevišķu sugu 16S rRNS gēna kopiju skaitu genomā (1.3. tabula). Šī gēna kopiju skaits atšķiras starp dažādu ģinšu pārstāvjiem – piemēram, *Rhizobium leguminosarum* un *Neorhizobium galegae* identificētas 3 16S rRNS gēna kopijas, bet *Mesorhizobium sp.* un *Bradyrhizobium japonicum* ir tikai 1–2 šī gēna kopijas genomā. Savukārt zināms, ka β- un γ-proteobaktēriju klases gumiņbaktērijām (piem., *Burkholderia sp.*, *Pseudomonas frederiksbergensis*) ir līdz pat septiņām 16S rRNS gēna kopijām genomā.

1.3. tabula

Dažādu gumiņbaktēriju 16S rRNS gēna kopiju skaits genomā

Klase	Gumiņbaktērijas (suga / ģints)	16S rRNS gēna kopiju skaits genomā
α-proteobaktērijas	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	3
	<i>Rhizobium gallicum</i>	3
	<i>Neorhizobium galegae</i>	3
	<i>Mesorhizobium sp.</i>	1–2
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1–2
β-proteobaktērijas	<i>Paraburkholderia terricola</i>	5
	<i>Paraburkholderia caledonica</i>	6
	<i>Burkholderia sp.</i>	4–7
γ-proteobaktērijas	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	6–7

Tabula veidota, izmantojot ribosomālās RNS brīvpieejas datubāzes *rrnDB*¹³ publicēto informāciju.

Pēdējos gados 16S rRNS gēnu plaši izmanto baktēriju identifikācijā, un šīs datubāzes nepārtraukti papildina ar jaunām sekvencēm, tomēr dažkārt novērojams informācijas iztrūkums, īpaši gadījumos, ja to izmanto kā vienīgo molekulāro marķieri (O'Hara et al., 2016). Ir gadījumi, kad dažādu ģinšu vai sugu mikroorganismu 16S rRNS gēnu sekvences ir gandrīz vai pilnībā identiskas – šajos gadījumos nevar veikt identifikāciju sugas līmenī (Janda, Abbott, 2007). Piemēram, *Agrobacterium* ģints baktērijas, kas ir augu patogēni, reizēm ir grūti atšķiramas no gumiņbaktērijām, jo abu šo ģinšu 16S rRNS gēnu sekvences ir gandrīz identiskas (Pongsilp, 2012). Arī pilna 16S rRNS gēna izmantošana bieži sniedz nepilnīgu informāciju par mikroorganismu un bieži nav pietiekoša, lai identificētu visus baktēriju celmus sugas līmenī (Browman et al., 2015; Janda, Abbott, 2007). Izmantojot 16S rRNS gēnu kā marķieri baktēriju identifikācijā un filoģenētiskajā analīzē, jāņem vērā, ka šis gēns pats par sevi nesniedz būtisku informāciju par baktēriju funkcionālajām īpašībām, piemēram, to morfoloģiju, patogēnēzi vai atmosfēras slāpekļa saistīšanas efektivitāti, līdz ar to nesniedz informāciju par šo mikroorganismu ietekmi uz apkārtējo vidi un nozīmi lauksaimniecībā (Browman et al., 2015). Veicot pētījumu ir jāizvērtē šī marķiera pielietojums un atbilstība izvirzīto mērķu sasniegšanai (Murray et al., 1992). Bieži, kad ir zināma pētāmo baktēriju piederība dzimtai, papildus 16S rRNS gēna sekvencēšanai, pielieto arī genotipēšanas metodi, izmantojot, piemēram, ERIC, REP vai BOX praimerus (1.3.1. apakšnodaļa) (Browman et al., 2015).

¹² The ribosomal RNA operon copy number database, [Tiešsaiste] [skatīts 19.02.2023] Pieejams: <https://rrndb.umms.med.umich.edu/about/>

¹³ The ribosomal RNA operon copy number database, [Tiešsaiste] [skatīts 19.02.2023] Pieejams: <https://rrndb.umms.med.umich.edu/about/>

Līdzīgi kā 16S rRNS gēnu, arī **23S rRNS gēnu**, kas kodē lielās ribosomu apakšvienības ribosomālo RNS, izmanto kā molekulāro marķieri baktēriju identifikācijā. Atšķirībā no 16S rRNS, 23S rRNS (2300 bp) satur vairāk informācijas. Novērots, ka 23S rRNS gēna dendrograma veido dziļāku zarojumu, salīdzinājumā ar 16S rRNS gēnu, uzrādot lielāku genotipu daudzveidību. Tajā pašā laikā, novērots, ka gumiņbaktēriju celmu identifikācija ar 16S rRNS un 23S rRNS gēniem uzrāda līdzvērtīgus rezultātus (Pongsilp, 2012).

DNS fragmentu starp mazo un lielo ribosomālo RNS apakšvienību gēniem – **16S-23S rRNS ITS reģionu**, kā arī citus konservatīvos gēnus, kas atrodas hromosomālā genoma kodolā (*housekeeping genes*), izmanto gumiņbaktēriju identifikācijai kā 16S rRNS gēna alternatīvu. Salīdzinājumā ar 16S rRNS gēnu, 16S-23S ITS fragmenta evolucionārā attīstība ir straujāka, bet tā ir pietiekoši nemainīga, lai saglabātu filoģenētisko informāciju (O'Hara et al., 2016; Pongsilp, 2012). Uzska, ka ITS fragmentu sekvences ir noderīgas gumiņbaktēriju celmu identifikācijā, pateicoties ITS fragmenta sekvenču daudzveidībai un garuma variācijām ne tikai ģints, bet arī sugas līmenī (Pongsilp, 2012).

1.3.3. Citu gēnu izmantošana gumiņbaktēriju identifikācijā

Pilnīgākas izpratnes veidošanai par gumiņbaktēriju evolucionārajām un ekoloģiskajām attiecībām izmanto vairāku gēnu sekvenču analīzes (Turner, Young, 2000). Papildus ribosomālo gēnu izmantošanai, gumiņbaktēriju identifikācijā izmanto arī citus hromosomālā genoma konservatīvos gēnus (1.4. tabula). Šie gēni organismam nepieciešami, lai spētu uzturēt šūnas pamatfunkcijas, kā arī, tie ir iesaistīti atmosfēras slāpekļa saistīšanā. Ģenētiskās atšķirības šajos gēnos varētu norādīt gan par atšķirībām slāpekļa saistīšanas efektivitātē, gan atšķirībām saimniekaugu atbilstībā starp dažādiem gumiņbaktēriju celmiem (Wang et al., 2019c). Gumiņbaktērijām šādi gēni ir, piemēram, *dnaK*, *dnaJ*, *glnA*, *gyrB*, *recA*, *gltA*, *glnII*, *rpoA*, *rpoB*, *atpD*, *tpD*, *gap*, *pnp*, *thrC*, *gdh* (Hungria, Menna, Delamuta, 2015; Naveed et al., 2014; O'Hara et al., 2016). Priekšrocības konservatīvo gēnu izmantošanai gumiņbaktēriju celmu daudzveidības pētījumos ir: 1) gēnu izplatība genomā ir plaša; 2) gēnu izkliede genomā ir viendabīga, ar vismaz 100kb izkliedi, kas samazina horizontālās gēnu pārnesei iespējamību; 3) gumiņbaktēriju genomā šādiem gēniem ir tikai viena gēna kopija (Hungria, Menna, Delamuta, 2015). **Glutamīna sintēzes enzīmus** (GSI, GSII), kā arī *recA* un *atpD* gēnu ģenētiskos marķierus bieži izmanto kā alternatīvu 16S rRNS gēnam gumiņbaktēriju identifikācijā. GSI un GSII ekspresija novērota tikai gumiņbaktērijās, un to uzskata par priekšrocību gumiņbaktēriju ģenētiskajā identifikācijā. Atsevišķi gēna GSI filoģenētiskie rezultāti atbilst 16S rRNS rezultātiem. Savukārt GSII gēns uzrāda atšķirīgas gumiņbaktēriju filoģenētiskās attiecības, salīdzinot ar GSI un 16S rRNS gēniem (Turner, Young, 2000). Arī **eksopolisaharīdu (EPS) sintēzes gēnu** (*rosR*, *pssA*, *pssY*) sekvenču analīzes izmanto gumiņbaktēriju celmu identificēšanai sugas ietvaros. Pateicoties tam, ka EPS ir gumiņbaktēriju sugai specifiski, izmantojot šos gēnus kā ģenētiskos marķierus, ir iespējams atšķirt tuvradnieciskas gumiņbaktēriju sugas (Janczarek, Jaroszek-Sciseł, Skorupska, 2009; Janczarek, Kalita, Skorupska, 2009; Krol et al., 2007; Young et al., 2006). Gumiņbaktēriju celmu ģenētiskajai identifikācijai gan starpsugu līmenī, gan sugas ietvaros izmanto arī gēnu **SMc00019**, *truA*, *thrA* ģenētiskos marķierus. Šos ģenētiskos marķierus veiksmīgi pielietoto *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* un *Sinorhizobium* ģintīm piederošo gumiņbaktēriju celmu identifikācijā, un tie ir atzīti par noderīgiem šo baktēriju taksonomijā, filoģenētikā un populāciju ģenētikā (Zhang et al., 2012).

Gumiņbaktēriju celmu identificēšanai un to daudzveidības novērtēšanai izmanto arī plazmīdās esošos simbiotiskos gēnus, kas iesaistīti gumiņu veidošanā un slāpekļa saistīšanā – **nod** un **nif gēnus** (Hungria, Menna, Delamuta, 2015). Izmēģinājumos novērots, ka

nitrogenāzes gēna (*nifH*) filoģenētiskie rezultāti kopumā sakrīt ar 16S rRNS gēna rezultātiem (Murray et al., 1992). Priekšrocība *nif* (it īpaši *nifH*) gēnu izmantošanā gumiņbaktēriju identifikācijā ir lielais sekvenču rezultātu apjoms salīdzinājumā ar citiem gēniem (neskaitot, piemēram, 16S rRNS), kas ir pieejami publiskajās datubāzēs. Slāpekļa saistīšanās iesaistīto gēnu identifikācija ir nozīmīga ne tikai gumiņbaktēriju celmu taksonomiskās daudzveidības novērtēšanā, bet arī slāpekļa saistīšanas mehānismu pētniecībā, kā arī efektīvāko gumiņbaktēriju atlasē komerciālo preparātu sagatavošanā (Kent et al., 1998). Gēni, kas atbild par gumiņu veidošanos uz auga saknēm (*nod* gēni) ir būtiski ģenētiskie marķieri, lai atšķirtu gumiņbaktērijas no citām baktērijām, kuras arī ir spējīgas saistīt slāpekli, bet neveido gumiņus uz auga saknēm (piemēram, *Rhodopseudomonas palustris*, *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp.) (Gnat et al., 2015). Ģenētiskās atšķirības *nod* gēnu sekvencēs varētu skaidrot atšķirības slāpekļa saistīšanas efektivitātē, kas novērojamas starp dažādiem gumiņbaktēriju celmiem (Wang et al., 2019a). *nif* gēnu bieži izmanto kā ģenētisko marķieri, atšķirot gumiņbaktērijas no citām baktērijām, kuras spēj veidot gumiņus, nesaistot slāpekli (Taxonomy¹⁴). Simbiotisko gēnu filoģenētiskā analīze ir nozīmīga, lai iegūtu informāciju par baktēriju celmu slāpekļa fiksācijas īpašībām, ne tikai jaunu celmu aprakstam, ko sniedz 16S rRNS gēna identifikācija (Gnat et al., 2015).

1.4. tabula

Dažādu ģenētisko marķieru pielietojums gumiņbaktēriju pētniecībā

Ģenētiskais marķieris	Izmantošanas iespējas	Literatūras avoti
16S rRNS gēns	Identifikācija (īpaši jaunu celmu identifikācijā); Filoģenētika	Aserse et al., 2012; Browman et al., 2015; Earl et al., 2018; Janda, Abbott, 2007; Mignard, Flandrois, 2006; O'Hara et al., 2016; Pongsilp, 2012; Pootakham et al., 2017; Rosselli et al., 2016; Singer et al., 2016; Tran, Pham, Phan, 2017
23S rRNS gēns	Filoģenētika	Pongsilp, 2012
16S-23S rRNS ITS reģions	Identifikācija (ģints vai sugas līmenī)	O'Hara et al., 2016; Pongsilp, 2012
<i>glnII</i>, <i>glnA</i>, <i>recA</i>, <i>atpD</i>	Identifikācija (ģints, sugas vai celmu līmenī); Filoģenētika	Brown et al., 1994; Eisen, 1995; Turner, Young, 2000
<i>rosR</i>, <i>pssA</i>, <i>pssY</i>	Identifikācija (sugas līmenī)	Janczarek, Jaroszek-Scisiel, Skorupska, 2009; Janczarek, Kalita, Skorupska, 2009; Janczarek, Skorupska, 2003; Krol et al., 2007; Young et al., 2006

¹⁴ Taxonomy: *Bacteria confused with rhizobia, including Agrobacterium taxonomy*. [Tiešsaiste] [skatīts 19.02.2023.]. Pieejams: <https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/not-rhizobia>

Ģenētiskais marķieris	Izmantošanas iespējas	Literatūras avoti
SMc00019, truA, thrA	Identifikācija (<i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Sinorhizobium</i>); Filoģenētika	Zhang et al., 2012
nod	Identificē celmus, kas spēj veidot gumiņus; Filoģenētika; Slāpekļa saistīšanas mehānismu pētniecība	Gnat et al., 2015; Hungria, Menna, Delamuta, 2015; Wang et al., 2019a
nif	Identificē celmus, kas saista slāpekli; Filoģenētika; Slāpekļa saistīšanas mehānismu pētniecība	Gnat et al., 2015; Hungria, Menna, Delamuta, 2015; Kent et al., 1998; Murray et al., 1992

1.3.4. Multi-lokusu sekvenču analīze gumiņbaktēriju identifikācijā

Lai novērtētu gumiņbaktēriju celmu radniecību, parasti veic atsevišķu gēnu DNS sekvenču salīdzināšanu. Tomēr viena gēna izmantošana filoģenētikas pētījumos bieži nesniedz pilnvērtīgu informāciju, kas reprezentētu genomu kā vienu veselumu (Murray et al., 1992). Vairāki pētījumi iesaka veikt multi-lokusu sekvenču analīzi (MLSA/MLST; *multi-locus sequence analysis/typing*), lai identificētu gumiņbaktēriju ģenētisko daudzveidību. Šīs metodes pamatā ir ģenētiskās mainības salīdzināšana vairākos gēnos vienlaicīgi (van Berkum, Elia, Eardly, 2006; Christensen et al., 2004; O'Hara et al., 2016; Sarkar, Guttman, 2004). Gumiņbaktēriju identifikācija izmantojot MLSA ietver gan 16S rRNS gēnu, gan citus konservatīvus gēnus, kā arī simbiotiskos gēnus (Pongsilp, 2012). Tā piemēram, gumiņbaktēriju celmi ir identificēti, un to daudzveidība izvērtēta, izmantojot MLSA metodi, kurā ietverti gēnu *recA*, *glnII*, *rpoB* un 16S rRNS gēnu ģenētiskie marķieri. Ar MLSA metodi vairākos pētījumos veiksmīgi identificēti *Bradyrhizobium* ģintij piederošās sugas (Aserse et al., 2012; Nzoué et al., 2009). Gumiņbaktēriju identifikācijai ar MLSA metodi izmanto arī *atpD*, *dnaJ*, *dnaK*, *gap*, *glnA*, *gltA*, *gyrB*, *pnp*, *rpoA* un *thrC* gēnu marķierus (Menna et al., 2009; Turner, Young, 2000; Vinuesa et al., 2005). MLSA ir atzīta par būtisku metodi baktēriju filoģenētisko attiecību raksturošanai (Menna et al., 2009). Ar šo metodi var ne tikai raksturot gumiņbaktēriju celmu ģenētisko daudzveidību, bet to var pielietot arī praktiski, veidojot komerciālos gumiņbaktēriju preparātus (van Berkum, Elia, Eardly, 2006).

Līdz šim zinātnieki nav vienojušies par vienu universālu, vispāratzītu metodi, kas būtu izmantojama gumiņbaktēriju identifikācijā un šo baktēriju daudzveidības pētījumos. Bieži vien izvēlēto marķieru precizitāte un izšķirtspēja atšķiras, atkarībā no pētāmajiem gumiņbaktēriju celmiem – to taksonomisko piederību un pētījuma izvirzīto mērķi (1.4. tabula), kā arī, no tā, vai šie gumiņbaktēriju celmi ir, iepriekš identificēti. Izdalot jaunas baktērijas no augsnes vai gumiņiem, nav iespējams zināt, vai visas izdalītās baktērijas pieder pie kādas no gumiņbaktēriju ģintīm. Tāpēc pētījumu sākt ar specifiskiem gumiņbaktēriju marķieriem (piemēram, *nod*, *nif*), būtu neproduktīvi un identifikāciju vajadzētu sākt ar marķieriem, kas

būtu atrodami visās baktērijās, piemēram, 16S rRNS gēns. Identifikācija ar šo marķieri ne vienmēr sniedz vislielāko filoģenētisko precizitāti sugas ietvaros, tomēr ar šīs metodes palīdzību var iegūt uzticamus rezultātus par pētāmo baktēriju piederību ģintij vai pat sugai. Tālāk, uzzinot baktēriju taksonomisko piederību, ir iespējami pētījumi ar citiem ģenētiskajiem marķieriem (Wang et al., 2019e).

1.4. Gumiņbaktēriju pētniecības attīstība Latvijā

Pētījumi par gumiņbaktēriju izplatību Latvijas augsnēs un to efektivitāti uzsākti divdesmitā gadsimta divdesmitajos gados – profesora Alfrēda Kalniņa vadībā. Gumiņbaktēriju preparāta, nitragīna, ietekme uz lupīnām pārbaudīta jau 1921. gadā Aucē (Kalniņš u.c., 1957). Trīsdesmito gadu beigās veikti plaši pētījumi, lai izzinātu Latvijas augsnēs sastopamo gumiņbaktēriju ekoloģiju, šo baktēriju simbiotiskās īpašības, kā arī vides faktorus, kas nosaka slāpekļa saistīšanas efektivitāti.

Nitragīna ražošana Latvijā uzsākta 1936. gadā, Latvijas Universitātes Lauksaimniecības fakultātes Kontroles un tīrkultūru laboratorijā profesora A. Kalniņa vadībā. Ražoti nitragīna preparāti, kas specifiski atbilst dažādām tauriņziežu sugām (Lauksaimniecības leksikons, 1937a). Nitragīna ražošanai izmantotie gumiņbaktēriju celmi pārbaudīti, lai tie atbilstu Latvijas agroklīmatiskajiem apstākļiem un vietējām tauriņziežu šķirnēm (Kalniņš u.c., 1957). Inokulācija ar gumiņbaktērijām Latvijas lauksaimniekiem ieteikta gadījumos, kad audzēts Latvijai jauns tauriņziežu kultūraugs, kā arī gadījumos, ja augsne iepriekš nav izmantota tauriņziežu audzēšanai (Lauksaimniecības leksikons, 1937a). Kalniņš savos pētījumos novērojis, ka ne vienmēr tauriņziežu sēklu inokulācija ar gumiņbaktērijām sniedz gaidīto pozitīvo rezultātu, kā iemeslu minot mazaktīvos/neaktīvos komerciālos preparātus, kļūdas sēklu apstrādē, gumiņbaktēriju preparātu kontamināciju, kā arī nepiemērotus augsnes apstākļus (augšnes mitrums, temperatūra, pH, barības vielas) (Kalniņš, 1938; Lauksaimniecības leksikons, 1937b). Novēroja, ka gumiņbaktēriju celmi, kas izdalīti no viena un tās paša augsnes parauga, var uzrādīt atšķirīgu slāpekļa saistīšanas aktivitāti. Līdz šim brīdim uzskatīja, ka gumiņbaktēriju celmi vienas fizioloģiskās grupas ietvaros uzrāda vienlīdzīgu aktivitāti. Kalniņš (1938) novērtēja, ka gumiņbaktēriju efektivitāte atkarīga no tauriņziežu sugas, veicot izmēģinājumus, kuros pētīts gumiņbaktēriju specifiskums. Novēroja, ka gumiņbaktēriju efektivitāte ir atkarīga ne tikai no ārējās vides apstākļiem, bet arī no paša gumiņbaktēriju celma un tā konkurences spējām, infekcijas spējas un slāpekļa saistīšanas aktivitātes (Kalniņš, 1959). Jau pētījumu pirmsākumos Latvijā novērtēja tauriņziežu un gumiņbaktēriju simbiozes pozitīvo ietekmi uz augsnes auglības uzlabošanu un tās ietekmi uz tauriņzieža ražu (Kalniņš, 1949; 1964). Jāpiebilst, ka šajā laikā runā tikai par gumiņbaktēriju fenotipiskajām atšķirībām, bet neapspriež šo fenotipisko atšķirību ģenētisko pamatojumu.

A. Kalniņš (1957) ir veicis apjomīgu pētījumu par āboliņa gumiņbaktēriju celmu izplatību Latvijas augsnēs. Šajā pētījumā ieguva ap 300 gumiņbaktēriju celmu un noteica šo celmu slāpekļa saistīšanas aktivitāti. Šajā pētījumā gumiņbaktēriju celmu aktivitāti mēģināja sasaistīt ar augsnes tipu. Novēroja arī gadījumus, kad viena auga dažādos gumiņos atrodami gan aktīvi, gan neaktīvi gumiņbaktēriju celmi. Novērtēja, ka neaktīvie gumiņbaktēriju celmi pārsvarā atrodami savvaļas āboliņa sugās. Kalniņš secināja, ka āboliņa gumiņbaktēriju izplatība Latvijas augsnēs atkarīga ne tikai no augsnes tipa, bet arī pH, organiskās vielas satura un augsnes mitruma. Turklāt kā svarīgu faktoru minēja augsnes apstrādes veidu – secinot, ka gumiņbaktēriju skaitu var palielināt ar augsnes aršanu (Kalniņš, 1957).

Kā vienu no pirmajām metodēm gumiņbaktēriju konkurences spēju novērtēšanai Latvijā izmantoja Kalniņa adaptēto seroloģiskās identifikācijas metodi. Kalniņš veica 100 gumiņbaktēriju celmu seroloģisko tipu identificēšanu. Secināja, ka katrs seroloģiskais tips sevī

ietver baktēriju celmus ar atšķirīgu slāpekļa saistīšanas aktivitāti. Uzrādīja arī seroloģiskās grupas, kas ietver tikai aktīvus gumiņbaktēriju celmus un grupas ar zemu celmu aktivitāti. Secināja arī, ka slāpekļa saistīšanas efektivitāte ir atkarīga no gumiņbaktēriju celma aktivitātes un tā spējas konkurēt ar augsnē jau esošajām baktērijām (Kalnins, Klasens, Leimane, 1966).

Laikam ejot mainījušies aktuālie lauksaimniecības kultūraugi. Kalniņš pētījumus galvenokārt veica, izmantojot lupīnas un āboliņus, un šo augu gumiņbaktērijas. Kalniņa vadībā izstrādātas vairākas disertācijas saistībā ar gumiņbaktēriju pētniecību. A.J. Klincāre veikusi pētījumus par gumiņbaktēriju un citu augsnē esošu mikroorganismu savstarpējām attiecībām, un šo attiecību ietekmi uz gumiņbaktēriju un to saimniekaugu simbiozi. Klincāre padziļināti pētījusi lucernas gumiņbaktērijas (Šteinberga, 2000). Sešdesmito gadu beigās aizstāvēti divi diplomdarbi saistībā ar gumiņbaktērijām. I. Belicka (1968), izmantojot Kalniņa adaptēto seroloģijas metodi, novērtēja lucernas gumiņbaktēriju izplatību Latvijas augsnēs. Profesors Valdis Klāsens (1976) savos pētījumos galvenokārt izmantoja zirņu-vīķu-pupu grupas gumiņbaktērijas. V. Klāsens Latvijā ieviesa jaunu metodi gumiņbaktēriju identificēšanai – gumiņbaktēriju spēju izveidot un saglabāt rezistenci pret antibiotiku streptomicīnu. Ar šīs metodes palīdzību varēja atšķirt inokulētos gumiņbaktēriju celmus no augsnē jau brīvi dzīvojošajām gumiņbaktērijām. Klāsena vadībā turpinājās Latvijas augsnēs esošo gumiņbaktēriju ekoloģijas pētījumi. J. Filipovičs (1970) veica pētījumu par lupīnas un seradellas gumiņbaktēriju izplatību Latvijas augsnēs.

V. Klāsens (1994) uzsvēra, ka gumiņbaktēriju efektivitātes pētījumi ne tikai pasaulē, bet arī Latvijā pārliecinoši demonstrē gumiņbaktēriju izmantošanas nepieciešamību lauksaimniecībā. Tomēr arī norādīja, ka lauka izmēģinājumos, salīdzinājumā ar veģetācijas trauku izmēģinājumiem, gumiņbaktēriju efektivitātes rezultāti reizēm ir pretrunīgi (Klāsens, 1967). Kā iespējamo iemeslu minēja to, ka gumiņbaktērijām lauka apstākļos jāpārvar vairāki šķēršļi, kas ietver ne tikai paša mikroorganisma bioloģiskās spējas (konkurence ar citiem augsnes mikroorganismiem un auga inficēšanas spēja), bet šīs simbiozes izveidošanos var ierobežot arī abiotiskie faktori. Klāsens izvirzīja mērķi noteikt, kas ierobežo gumiņbaktēriju efektivitāti lauka apstākļos. Šajā pētījumā novēroja, ka, lai gan populācijas blīvums ir mazāks, salīdzinot ar āboliņa grupas gumiņbaktērijām, zirņu-vīķu-pupu grupas gumiņbaktēriju izplatība aptver visas Latvijas augsnes. Līdzīgi kā āboliņa grupas gumiņbaktērijas (Kalniņš, 1957; Klāsens, 1994), arī zirņu-vīķu-pupu grupas gumiņbaktēriju izplatību būtiski ierobežo augsnes pH un audzētā tauriņziežu suga. Slāpekļa saistīšanas aktivitāte un efektivitāte būtiski atšķirās starp gumiņbaktēriju celmiem. Novēroja arī gumiņbaktēriju celmu specifiskuma atšķirības attiecībā pret to saimniekaugiem. Atsevišķi gumiņbaktēriju celmi spēja veidot simbiozi tikai ar konkrētiem saimniekaugiem, kamēr citi – ar plašāku saimniekaugu spektru. Klāsens izvirzīja hipotēzi, ka augsnē nav atrodami gumiņbaktēriju celmi ar zemu aktivitāti, bet šo aktivitāti ietekmē saimniekaugs, apkārtējie vides un tehnoloģiskie apstākļi (Klāsens, 1994).

Līdz 20. gadsimta 80. gadiem veikti intensīvi pētījumi par tauriņziežu un gumiņbaktēriju simbiotiskajām attiecībām, izstrādāti daudzi zinātniskie darbi, studentu pētnieciskie darbi, kā arī rekomendācijas lauksaimniekiem. Šajā laikā netiek pētīti gumiņbaktēriju un tauriņziežu simbiozes mehānismi. Lielākā daļa šo pētījumu aptver informāciju par konkrētu gumiņbaktēriju celmu ietekmi uz saimniekaugu augšanu. Gumiņbaktēriju celmu pozitīvā ietekme uz olbaltumvielu veidošanos novērota lupīnās (Vīgule, 1976). Celmu salīdzinājumu un efektivitātes novērtējumu veica āboliņa (Laicāne, 1981; Šteinberga, 2000; Trops, 1979), lucernas (Apenītis, 1992; Lotiņa, 1985; Runcis, 1997; Stikute, 1973), pupiņu un lauka pupu (Runcis, 1997), kā arī galegas sējumos (Šteinberga, 2000). Visos šajos pētījumos konstatēti aktīvāki un mazāk aktīvi gumiņbaktēriju celmi, un šīs aktivitātes atšķirības pārsvarā skaidrotas ar augsnes apstākļiem, izmantotajām saimniekauga šķirnēm, biotiskajiem un abiotiskajiem apstākļiem. Šajā laikā izveidoja apjomīgu gumiņbaktēriju kolekciju, kurā apkopoja efektīvākos

gumiņbaktēriju celmus atbilstošus dažādām saimniekaugu grupām. Deviņdesmito gadu beigās novērojams straujš zinātnisko darbu, kas saistīti ar gumiņbaktērijām, kritums.

Pēdējos desmit gados aktualizējusies tauriņziežu audzēšana un līdz ar to – aktualizējusies sēklu pirmssējas inokulācijas lietderība. Tāpēc ir palielinājies arī zinātnisko darbu skaits, kas saistīts ar gumiņbaktēriju un tauriņziežu simbiozi. Daļa no pētnieciskajiem darbiem turpina dažādu gumiņbaktēriju celmu efektivitātes salīdzinājumu sekojošajos saimniekaugos: lucerna, lauka pupas (Alsina et al., 2016; Anševica u.c., 2009; Dubova, 2020; Akmentiņa, 2000; Šenberga et al., 2017), pupiņas (Akmentiņa, 2000), zirņi (Šenberga et al., 2017), kā arī lupīnas (Liepiņa, 2007; Steinberga et al., 2008). Lai gan izmēģinājumos veģetācijas traukos novēro gumiņbaktēriju celmu pozitīvo ietekmi uz ražu, lauka izmēģinājumi uzrāda ļoti dažādus rezultātus. Augsnes pētījumi Latvijā norāda, ka gumiņbaktēriju celmu potenciālās optimālās efektivitātes sasniegšanai ir ļoti būtiski nodrošināt gumiņbaktērijām atbilstošus apkārtējās vides apstākļus. Abiotisko un biotisko faktoru ietekme lielākoties nomāc dažādo gumiņbaktēriju celmu ietekmi uz slāpekļa saistīšanu (Adamovičs, Klāsens, 2003).

LBTU kolekcijas gumiņbaktērijas izdalītas laika posmā no 1962. līdz 2015. gadam. Līdz šim nav identificēta šo celmu taksonomiskā piederība, izmantojot molekulārās bioloģijas metodes, kā arī nav izvērtēta šo celmu daudzveidība. Bet tieši šī genomā ierakstītā informācija varētu sniegt atbildes par Latvijas gumiņbaktēriju celmu aktivitātes un efektivitātes daudzveidību. Vienīgā literatūrā atrodamā informācija par molekulāro metožu izmantošanu Latvijas gumiņbaktēriju celmu daudzveidības noteikšanā ir trīs dažādu celmu analīze, izmantojot genotipēšanas metodi. Pētījumā secināts, ka gumiņbaktēriju celmi būtiski atšķiras savā starpā, tomēr nav uzrādīti genotipēšanas analīzes rezultāti, līdz ar to tos nevar analizēt, salīdzinājumā ar citu pētnieku iegūtajiem rezultātiem (Anševica, Alsina, Steinberga, 2009).

K O P S A V I L K U M S

Pēdējos gados tauriņziežu audzēšanai pievērsta pastiprināta nozīme ilgtspējīgā lauksaimniecībā, it īpaši Eiropas Savienībā. Pateicoties tauriņziežu simbiotiskajām attiecībām ar gumiņbaktērijām, tauriņzieži spēj saistīt atmosfēras slāpekli un izmantot to olbaltumvielu ražošanā. Tauriņziežu inokulāciju ar gumiņbaktērijām rekomendē visā pasaulē, lai palielinātu optimālas simbiozes izveidošanās iespēju. Savukārt, palielinoties gumiņbaktēriju lomai lauksaimniecībā, pieaug pētījumu skaits, kas izvērtē gumiņbaktēriju daudzveidību. Augsnes baktēriju daudzveidību, kā arī gumiņbaktēriju efektivitāti ietekmē apkārtējās vides apstākļi, kas spēj veicināt, vai pretēji – ierobežot gumiņbaktēriju augšanu, kā arī daudzveidību. Būtiska ietekme uz baktēriju daudzveidību novērota augsnes tipam, dažādu minerālvielu trūkumam (īpaši fosfors, kālijs, kalcija) vai pārbagātībai (piemēram, slāpekļi), kā arī mikroelementiem (īpaši molibdēns un dzelzs). Būtisks gumiņbaktēriju daudzveidību limitējošais faktors ir augsnes reakcija.

Gumiņbaktēriju ģenētiskā identifikācija un daudzveidības noteikšana sniedz plašākas iespējas un ieguldījumu modernā un ilgtspējīgā lauksaimniecībā, sniedzot ieskatu šo baktēriju darbības mehānismos, kā arī dodot iespēju skaidrot fenotipiskās atšķirības starp dažādiem gumiņbaktēriju celmiem, ko nevar panākt, izmantojot klasiskās agronomijas un mikrobioloģijas metodes. Laika gaitā, attīstoties dažādām identifikācijas metodēm, novērojamas straujas izmaiņas gumiņbaktēriju klasifikācijā. Senāk plaši izmantoto klasifikāciju pēc saimniekaugiem mūsdienās uzskata par neatbilstošu un nekorektu. Šobrīd klasifikācija galvenokārt balstās uz baktēriju ģenētisko informāciju. Vēl līdz 2000. gadam par gumiņbaktērijām uzskatīja tikai α -proteobaktēriju klasei piederošās baktērijas. Tomēr pēdējos gados aizvien plašāk apspriež β - un γ -proteobaktēriju iekļaušanu gumiņbaktēriju iedalījumā.

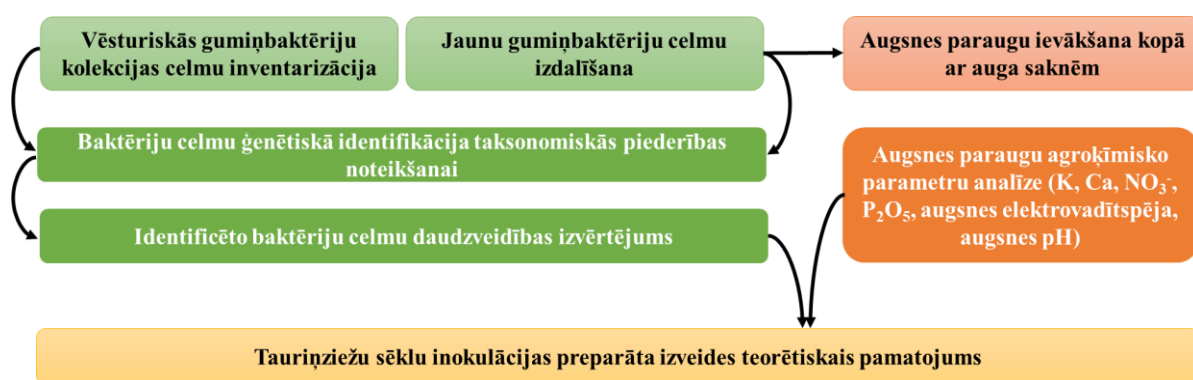
Gumiņbaktēriju identifikācijā un daudzveidības noteikšanā izmanto dažādus molekulāros marķierus – gan hromosomālajā genomā, gan plazmīdās esošos gēnus. Marķieru izvēli veic atbilstoši izvirzītajam mērķim, balstoties uz zināšanām par gumiņbaktēriju uzbūvi un šo gēnu nozīmi baktēriju funkcionēšanā. Lai to veiksmīgi varētu izdarīt, nepieciešamas zināšanas par šo gēnu lomu dažādos gumiņbaktēriju dzīves ciklos un mehānismos (piemēram, infekcijas pārejas izveidošana auga spurgaliņās, gumiņu izveidošana, baktēriju konkurētspēja, atmosfēras slāpekļa saistīšanas mehānisms). Mūsdienās pieejama plaša informācija par dažādu gēnu funkcionālo nozīmi. Līdz ar to gumiņbaktēriju identifikācijas pētījumi, izmantojot dažādus gēnus, paver iespējas ne tikai savā starpā salīdzināt dažādus gumiņbaktēriju celmus, bet arī interpretēt šo informāciju un skaidrot šo atšķirību fenotipiskās sekas. Baktēriju identifikācijai un filoģenētikas pētījumiem, kas nepieciešami gumiņbaktēriju daudzveidības izvērtēšanai, lielākoties izmanto dažādus hromosomālos gēnus (piemēram, 16S rRNS, 23S rRNS, *rosR*, *pssA*), savukārt plazmīdās esošos simbiotiskos gēnus *nod* un *nif* izmanto atmosfēras slāpekļa saistīšanas mehānismu pētniecībā. Gumiņbaktēriju celmu identifikācijai pamatā izmanto 16S rRNS gēna sekvences salīdzināšanu ar datubāzē pieejamajām fragmentu sekvencēm. Gumiņbaktēriju identifikāciju un filoģenētiskās analīzes var veikt ne tikai izmantojot atsevišķus gēnus, bet arī izmantojot vairāku gēnu kompleksu (multi-lokusu sekvencēšanas metode).

Molekulārās bioloģijas metodes paver iespējas izveidot kvalitatīvākus un efektīvākus gumiņbaktēriju preparātus. Citur pasaulē veikti daudz un plaši gumiņbaktēriju daudzveidības pētījumi. Lai gan šie pētījumi sniedz padziļinātas zināšanas par metodēm, kuras izmantojamas gumiņbaktēriju identifikācijā, tomēr šos rezultātus nevar tieši piemērot Latvijas apstākļiem, jo novērots, ka gumiņbaktēriju evolucionārā attīstība ir cieši saistīta ar baktēriju izplatību un apkārtējās vides apstākļiem. Līdz šim Latvijā veikti plaši pētījumi, kur salīdzināta gumiņbaktēriju celmu efektivitāte. Tomēr šo rezultātu pielietojums praksē ilgtermiņā nav pilnībā ticams, jo izmēģinājumos konkrētais gumiņbaktēriju celms var uzrādīt augstāku efektivitāti tikai konkrētajos apkārtējās vides apstākļos. Turklāt tā kā nav veikts šo gumiņbaktēriju celmu ģenētiskais salīdzinājums, nevar apgalvot, ka šīs efektivitātes dažādības pamatā ir celmu bioloģiskās atšķirības, nevis kādi citi ārēji faktori. Šī darba mērķis ir pirmo reizi identificēt taksonomisko piederību gumiņbaktēriju celmiem, kas izdalīti no plaša spektra tauriņziežiem Latvijā laika posmā no 1962. līdz 2019. gadam, kā arī izvērtēt šo baktēriju celmu daudzveidību. Gumiņbaktēriju ģenētiskās identifikācijas rezultāti paver iespējas produktīvai kolekcijā esošo gumiņbaktēriju izmantošanai, ar mērķi palielināt atmosfēras slāpekļa saistīšanas efektivitāti, tādā veidā palielinot bioloģiskā slāpekļa saistīšanas nozīmi, un līdz ar to – sniedzot ieguldījumu ilgtspējīgā lauksaimniecībā.

2. MATERIĀLI UN METODIKA

2.1. Pētījuma struktūra

Pētījums veikts vairākos soļos (2.1. att.). Kā pirmais solis, veikta LBTU Augsnes un augu zinātņu institūta Gumiņbaktēriju kolekcijas celmu (turpmāk – vēsturiskā kolekcija) inventarizācija, kā arī jaunu gumiņbaktēriju celmu izdalīšana no plaša spektra saimniekaugiem dažādās teritorijās Latvijā (2.2. apakšnodaļa). Izdalot jaunus gumiņbaktēriju celmus, kolekcionēti augsnes paraugi, kuriem veikta dažādu agroķīmisko parametru analīze (2.4. apakšnodaļa). Vēsturiskās kolekcijas un jauniegūtie celmi identificēti ar molekulārās bioloģijas metodēm un izvērtēta šo celmu taksonomiskā daudzveidība (2.3. apakšnodaļa). Baktēriju taksonomiskās piederības un daudzveidības rezultāti, kā arī augsnes agroķīmisko parametru analīžu rezultāti izmantoti, lai noteiktu atbilstošākās celmu asociācijas, kurus izmantot dažādu tauriņziežu sēklu inokulācijai.

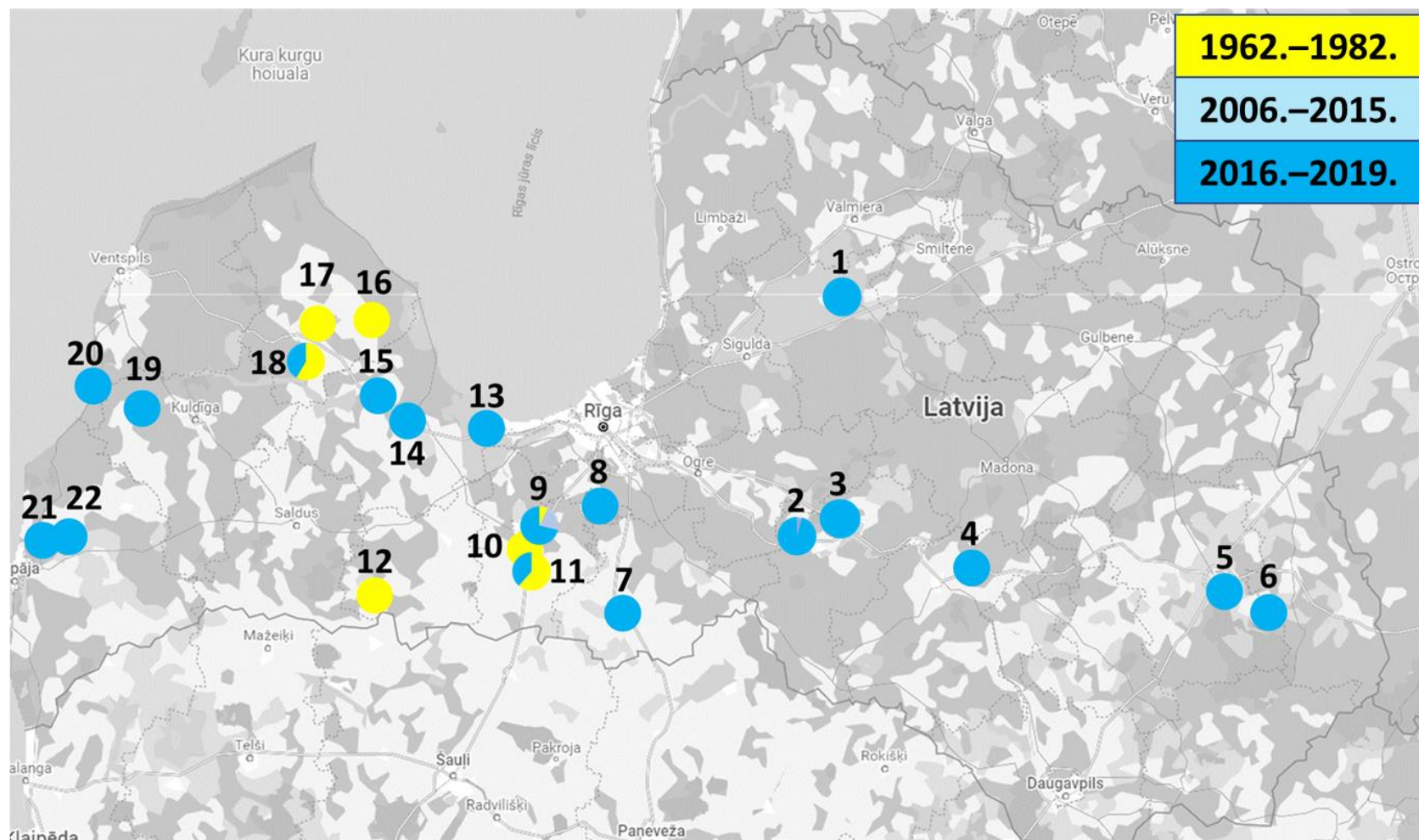


2.1. att. Promocijas darba pētījuma struktūras shematiskais attēlojums

2.2. Gumiņbaktēriju celmi

Daļa no pētījumā izmantotajiem baktēriju paraugiem ir **vēsturiskās kolekcijas gumiņbaktēriju celmi** (2.1. tabula). Gumiņbaktērijas, kas atrodas vēsturiskajā kolekcijā izdalītas no dažādiem saimniekaugiem Latvijā laika posmā no 1962. līdz 2015. gadam (2.2. att.). Vēsturiskās kolekcijas gumiņbaktēriju celmus līdz šim pētījumam uzglabāja ledusskapī (4 °C) Petri platēs vai mēģenēs, kas satur balto pupiņu, pelēko zirņu, vai YMA barotni (*yeast mannitol agar*; rauga un iesala ekstrakta barotne). Baktēriju tīrkultūras šajā laika posmā pārsēja vismaz reizi gadā, lai saglabātu baktēriju celmu dzīvotspēju.

Otra daļa no pētāmajiem celmiem bija **jaunizdalīti gumiņbaktēriju celmi**. Gumiņbaktēriju celmi šajā pētījumā izdalīti no dažādām teritorijām Latvijā 2016., 2017. un 2019. gadā (2.2. att.), lai papildinātu LBTU Augsnes un augu institūta esošo kolekciju ar jauniem gumiņbaktēriju celmiem, kas izdalīti no plaša spektra tauriņziežiem. Lai izdalītu jaunus gumiņbaktēriju celmus, tauriņziežu dzimtas augu izraka aptuveni 15 cm rādiusā ap to un aptuveni 20 cm dziļumā, augu uzmanīgi izcēla no augsnes, cenšoties nebojāt sakņu sistēmu, lai nezaudētu gumiņus. Auga sakņu daļu ievietoja plastmasas maisiņā kopā ar augsnes paraugu, kas paredzēts tālākām augsnes agroķīmisko parametru analīzēm. Gumiņus no saknēm atdalīja tajā pašā dienā vai arī saknes uzglabāja ledusskapī +4 °C līdz gumiņu nolasīšanai. Gumiņus no saknēm atdalīja ļoti uzmanīgi, lai tie netiktu bojāti – nogriežot nelielu saknes daļu, aptuveni 0.5 cm katrā virzienā no gumiņa (Tampakaki, Alsina, Ntatsi, 2014).



2.2. att. Teritorijas Latvijā, kur veikta baktēriju izdalīšana no tauriņziežu gumiņiem

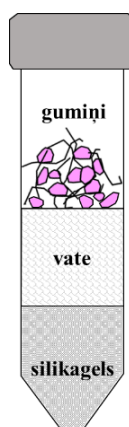
Kartē ar cipariem atzīmētas paraugu ievākšanas vietas: 1. Priekulji; 2. Skrīveri; 3. Kokneses nov.; 4. Kūkas pag.; 5. Grīškānu pag.; 6. Stojerovas pag.; 7. Bauska; 8. Olaines nov.; 9. Jelgava; 10. Dimzas; 11. Pēterlauki; 12. Vecauce; 13. Jūrmala; 14. Tumes pag.; 15. Pūre; 16. Pļavas; 17. Talsi; 18. Stende; 19. Ēdoles pag.; 20. Jūrkalnes pag.; 21. Medzes pag.; 22. Tadaļu pag. Apļa diagramma procentuāli norāda laika posmu, kurā baktērijas konkrētajā paraugu ievākšanas vietā izdalītas.

Visus gumiņus no viena auga uzglabāja vienā 15 vai 50 mL (atkarībā no gumiņu daudzuma) centrifūgas stobriņā, kas saturēja silikagēlu un vati (attiecība 1:1; 2.3. att.) (Tampakaki, Alsina, Ntatsi, 2014). Šādā veidā gumiņus uzglabāja ledusskapī +4 °C līdz baktēriju tīrkultūru izdalīšanai no gumiņiem viena mēneša laikā.

2.1. tabula

LBTU Augšnes un augu zinātņu institūta Gumiņbaktēriju kolekcijas celmi

N.p.k.	Gumiņbaktēriju celms	Saimniekaugs
1.–10.	20; 110; 69; 407; 408; 501; 505; LP; LP-1; LP-2;	<i>Vicia faba</i>
11.–15.	23; 202; 302; Zi-1; Zi-3;	<i>Pisum sativum</i>
16.–18.	245a; P9M2; LucS	<i>Medicago sativa</i>
19.–20.	02; G-1	<i>Galega orientalis</i>
21.–24.	326; Āb.-2; Sark.āb.-1; Sark.āb.-3	<i>Trifolium</i> sp.
25.	116	<i>Phaseolus vulgaris</i>
26.–28.	3; LUP1; LUP2	<i>Lupinus</i> sp.
29.–30.	V; V1	<i>Vigna</i> sp.
31.–33.	S-1; S-2; S-3	<i>Glycine max</i>
34.	06	Nav zināms



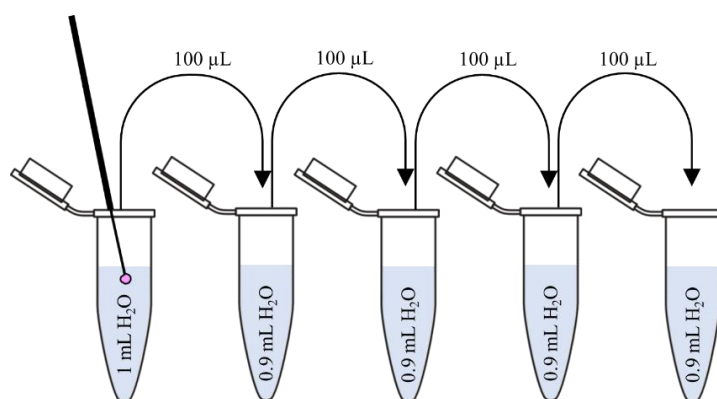
2.3. att. Gumiņu uzglabāšana

Gumiņus, pēc to atdalīšanas no saimniekaugu saknēm, uzglabāja centrifūgas stobriņā, kas saturēja silikagēlu un vati (1:1).

Baktēriju celmu izdalīšana no gumiņiem. Ilgstošas uzglabāšanas gadījumā, ja gumiņi izkaltuši, tos pirms gumiņbaktēriju izdalīšanas, ievietoja traukā ar destilētu ūdeni un atstāja uz nakti ledusskapī, lai tie atgūtu šūnas turgoru. Pirms baktēriju izdalīšanas no gumiņiem tos noskaloja destilētā ūdenī. Gumiņu virsmas sterilizēšanu veica sterilos trauciņos – 1 min 70% spirta šķīdumā, 2–4 min (atkarībā no gumiņu izmēra) 3–5% nātrija hipohlorīta šķīdumā. Gumiņus skaloja 3–5 reizes sterilā destilētā ūdenī. Virsmas sterilizētos gumiņus saberza ar sterilu stikla spieķīti ūdens pilienā mikrocentrifūgas stobriņā. Saberztā gumiņa suspensiju uztriepa uz Petri plates, kas satur YMA barotni.

Gumiņbaktēriju tīrkultūru iegūšana. Lai iegūtu gumiņbaktēriju tīrkultūras, gan veicot vēsturiskās kolekcijas inventarizāciju, gan izdalot gumiņbaktēriju celmus, izmantoja YMA Petri plates, kas papildinātas ar kādu no indikatoru krāsvielām – 0.0025% Kongo sarkano (Congo Red), vai 0.002% bromtimola zilo (bromothymol blue). Petri plates inkubēja tumsā 25–

30 °C, līdz parādījās gļotveida baktēriju kultūras (3–10 dienas). Baktēriju attīrīšanu tīrkultūru iegūšanai veica ar atšķaidījumu metodi: 1.5 mL mikrocentrifūgas stobriņā iepildīja 1 mL sterilu ūdeni, kurā izšķīdināja 1 µL baktēriju celma šūnas. No šī stobriņa 100 µL pārnese uz otro stobriņu, kas saturēja 900 µL sterilu ūdeni, izšķīdināja un atkal pārnese 100 µL uz nākamo stobriņu, kas saturēja 900 µL sterilu ūdeni. Šādi turpināja līdz kopā iegūti pieci mikrocentrifūgas stobriņi ar dažādiem gumiņbaktēriju atšķaidījumiem (2.4. att). 100 µL no katra baktēriju atšķaidījuma pārnese uz jaunu YMA barotni saturošu Petri plati un vienmērīgi izlīdzināja pa visu plates virsmu. Petri plates inkubēja tumšā 25–30 °C apmēram 5 dienas (Tampakaki, Alsina, Ntasi, 2014). Baktēriju attīrīšanu ar atšķaidījumu metodi atkārtoja vismaz vēl vienu reizi. Iegūto tīrkultūru pavairoja uzglabāšanai uz YMA Petri plates. Lai saglabātu kolekcijas celmu dzīvotspēju, baktēriju celmus pārsēja uz jaunām barotnēm vismaz reizi gadā.



2.4. att. Gumiņbaktēriju tīrkultūru iegūšana ar atšķaidījumu metodi

Gumiņbaktēriju tīrkultūra (1µL; rozā krāsā) atšķaidīta sterilā ūdenī mikrocentrifūgas stobriņos. Pēc baktēriju tīrkultūras pievienošanas, 100µL no katra stobriņa pārnese uz nākamo, iegūstot dažādas pakāpes atšķaidījumus.

Visiem pētāmajiem celmiem izveidoja vienotu gumiņbaktēriju kolekcijas kodu sistēmu, kurā pirmais burts “R” norāda uz to, ka baktērijas celms pieder gumiņbaktēriju kolekcijai (no “*rhizobium*”), savukārt nākamais burts vai burti norāda uz saimniekaugu, no kura gumiņbaktēriju celms izdalīts (piemēram., “P” = *Pisum sativum*; “V” = *Vicia faba*), šādā veidā atvieglojot praktisko darbu ar kolekcijas baktērijām.

2.3. Gumiņbaktēriju identifikācija

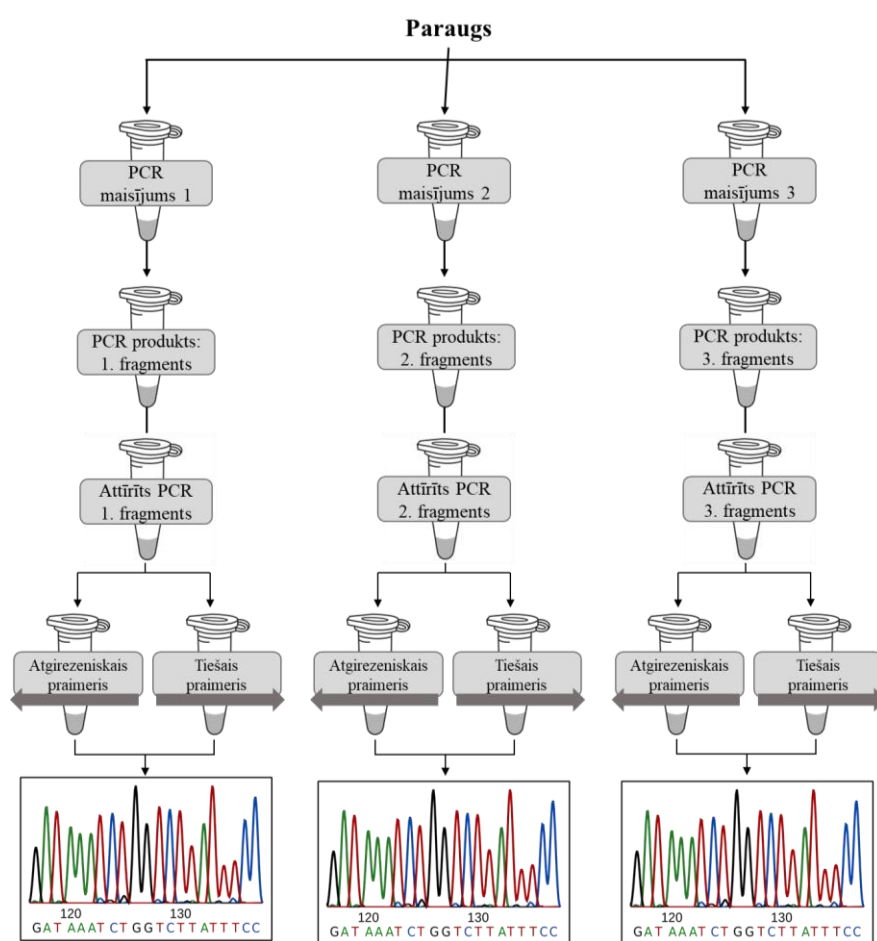
2.3.1. DNS izdalīšana

Gumiņbaktēriju celmu identifikācijai ar molekulārās bioloģijas metodēm izmantoja celmu tīrkultūras, kuras pirms DNS izdalīšanas atkārtoti pārsēja uz jaunām YMA Petri platēm. Baktēriju celma tīrkultūras paraugu paņēma no YMA plates ar vienreizlietojamas 1 µL bakterioloģiskās cilpas palīdzību un ievietoja 1.5 mL centrifūgas stobriņā, kas saturēja 100 µL PrepMan™ Ultra paraugu sagatavošanas reaģenta šķīdumu. Reaģents Prep Man Ultra (PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent; Applied Biosystems; ThermoFisher Scientific; ASV) paredzēts ātrai DNS izdalīšanai no dažādiem paraugiem, ieskaitot baktērijas. Pēc gumiņbaktēriju celma ievietošanas, centrifūgas stobriņa vāciņu nostiprināja ar parafilmu (3M, ASV), lai izvairītos no paraugu kontaminācijas maisīšanas un karsēšanas laikā. Paraugu samaisīja kratot, izmantojot TissueLyser II (Qiagen, ASV) iekārtu režīmā 30 Hz 30 sekundes. Paraugu karsēja 10 minūtes 100 °C (Thermo Block, TDB-120, BIOSAN, Latvija). Pēc karsēšanas paraugu atdzesēja 2 min istabas temperatūrā. Paraugu centrifugēja ar 14000 x g

(SIGMA® 1-14, Vācija) 2 min. Pēc centrifugēšanas 50 µL supernatanta (šķīduma virsējā daļa) pārvietoja jaunā 1.5 mL mikrocentrifūgas stobriņā. Šādu amplifikācijai gatavu gumiņbaktēriju DNS paraugu var uzglabāt –20 °C neierobežotu laika periodu.

2.3.2. 16S rRNS gēna amplifikācija un sekvencēšana

Lai veiktu gumiņbaktēriju 16S ribosomālās RNS (16S rRNS) gēna amplifikāciju, izmantoja *MicroSeq® Full Gene 16S rDNA Bacterial Identification PCR* komplektu (Applied Biosystems, ASV). 16S rRNS gēns ir pārāk garš (~1500 bp), lai to varētu amplificēt pilnā garumā, tāpēc, lai nodrošinātu kvalitatīvu, pilna garuma gēna sekvenci, to amplificēja trīs atsevišķās PCR reakcijās, rezultātā iegūstot trīs fragmentus. Katru no amplificētajiem fragmentiem sekvencēja no abām pusēm, izmantojot tiešo (*forward*) un atgriezenisko (*reverse*) praimeru. Eksperimenta shematiskais attēlojums redzams 2.5. att.



2.5. att. 16S rRNS gēna amplifikācijas shematiskais attēlojums

Attēls adaptēts no *MicroSeq® Full Gene 16S rDNA Bacterial Identification PCR* komplekta rokasgrāmatas¹⁵. Vienam gumiņbaktēriju celma paraugam sagatavo trīs PCR maisījumus. Rezultātā amplificē trīs 16S rRNS gēna fragmentus (PCR produkti: 1., 2. un 3. fragments), kurus attīra. Katram no fragmentiem sagatavo divas sekvencēšanas reakcijas – ar atgriezenisko un tiešo praimeru; iegūtās fragmenta sekvenču salīdzina, pārbauda un apvieno vienā.

¹⁵ 16S rRNS gēna amplifikācijas komplekta *MicroSeq® Full Gene 16S rDNA Bacterial Identification* rokasgrāmata. [Tiešaiste] [skatīts 22.05.2023.]. Pieejams: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4347484#/4347484>

Izdalīto gumiņbaktēriju DNS atšķaidīja 1:50, izmantojot nukleāžu brīvu ūdeni (Applied Biosystems, ASV). 7 µL 1:50 atšķaidīto DNS sajauc ar 7 µL PCR maisījumu (MicroSEQ™ Full Gene 16S rDNA PCR Master Mixes, Applied Biosystems, ASV). Vienam DNS paraugam sagatavoja trīs reakcijas ar trīs dažādiem PCR maisījumiem (MM 1, MM 2, MM 3). Katrs PCR maisījums saturēja atbilstošos praimeru pārus, lai amplificētu specifisku baktēriju genomiskās DNS 16S rRNS gēna daļu. Amplifikāciju veica arī komplektā iekļautajiem kontroles paraugiem – *E. coli* (pozitīvā kontrole) un nukleāžu brīvam ūdenim (negatīvā kontrole). 16S rRNS gēna fragmentu amplifikācijas eksperimenta shēma attēlota 2.2. tabulā.

2.2. tabula

16S rRNS gēna fragmentu amplifikācijas eksperimenta shēma

Secība	Reakcijas tips	Reakcijas maisījuma sastāvdaļas
1.	Negatīvā kontrole	1) 7 µL nukleāžu brīvs ūdens + 7 µL MM 1 2) 7 µL nukleāžu brīvs ūdens + 7 µL MM 2 3) 7 µL nukleāžu brīvs ūdens + 7 µL MM 3
2.	Gumiņbaktēriju paraugs	1) 7 µL gumiņbaktēriju DNS paraugs + 7 µL MM 1 2) 7 µL gumiņbaktēriju DNS paraugs + 7 µL MM 2 3) 7 µL gumiņbaktēriju DNS paraugs + 7 µL MM 3
3.	Pozitīvā kontrole	1) 7 µL <i>E. coli</i> DNS paraugs + 7 µL MM 1 2) 7 µL <i>E. coli</i> DNS paraugs + 7 µL MM 2 3) 7 µL <i>E. coli</i> DNS paraugs + 7 µL MM 3

DNS fragmentu amplifikāciju veica PCR iekārtā (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, ASV), kurā izvēlēts 9600 simulācijas režīms, lai nodrošinātu optimālos apstākļus komplektā esošo reaģentu darbībai. Polimerāzes ķēdes reakcijas programma:

2.3. tabula

Polimerāzes ķēdes reakcijas programma 16S rRNS gēna fragmentu amplifikācijai

Temperatūra (°C)	Ilgums	Ciklu skaits
95	10 min	1
95	30 s	30
60	30 s	
72	45 s	
72	10 min	1
4	∞	1

PCR produkta kvalitāti pārbaudīja, izmantojot 2% agarozes gelu. Agarozes gelu pagatavoja, izšķīdinot 2 g agarozī (TopVision Agarose, ThermoFisher Scientific, ASV) 100 mL 1x TAE buferī (4 mM Tris-acetāts, 1 mM EDTA, pH 8.0, ThermoFisher Scientific, ASV). DNS vizualizācijai agarozes gela šķīdumam pievienoja 10 µL etīdija bromīda šķīduma (2.5 mg/mL; Sigma-Aldrich, ASV). Elektroforēzes kameru piepildīja ar 1x TAE buferi. Agarozes

gela bedrītēs iepildīja 6 µL parauga (5 µL PCR produkts + 1 µL DNS krāsviela (DNA Gel Loading Dye (6X), ThermoFisher Scientific, ASV). Kā DNS fragmentu garuma marķieri izmantoja Gene Ruler 100 bp Plus (ThermoFisher Scientific, ASV). Elektroforēzes strāvas spriegums – 90 V. Elektroforēzes gels vizualizēts UV transiluminatora (Cleaver Scientific Ltd, Apvienotā Karaliste) iekārtā. Paraugus, kuriem nenovēroja amplificēto DNS fragmentu, vai novēroja blakus zonas, neizmantoja turpmākai analīzei.

Amplificētos PCR produktus attīrīja no dezoksinnukleotīdiem (dNTPs) un praimeriem, izmantojot maisījumu, kas satur 0.5 µL eksonukleāzi Exo I (20 vienības µL⁻¹; ThermoFisher Scientific, ASV) un 1 µL sārmains fosfatāzi Fast AP (1 vienība µL⁻¹; ThermoFisher Scientific, ASV). Šādu 1.5 µL maisījumu pievienoja 5 µL PCR produktam, samaisīja un apstrādāja 37 °C 15 min, un 85 °C 15 min, izmantojot PCR iekārtu (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, ASV).

Attīrītā PCR produkta sekvenčēšanas reakciju veica, izmantojot *MicroSeq® Full Gene 16S rDNA Bacterial Identification Sequencing* komplektu (Applied Biosystems, ASV). Šajā komplektā ietilpst seši sekvenčēšanas reakcijas maisījumi, kuri atbilst iepriekš izmantotajam PCR amplifikācijas komplektam – trīs dažādu 16S rRNS gēna fragmentu sekvenčēšanai gan ar tiešajiem gan atgriezeniskajiem praimeriem. Sagatavoja reakcijas maisījumu, kurš sastāvēja no 3 µL attīrītā PCR produkta, 4 µL atbilstošā sekvenčēšanas maisījuma un 3 µL nukleāžu brīva ūdens. Sekvenčēšanas reakciju (2.4. tabula) veica PCR iekārtā (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, ASV), izmantojot 9600 simulācijas režīmu.

2.4. tabula

16S rRNS gēna amplificētā fragmenta sekvenčēšanas polimerāzes ķēdes reakcijas programma

Temperatūra (°C)	Ilgums	Ciklu skaits
96	10 s	25
50	5 s	
60	4 min	
4	∞	1

Sekvenčēšanas PCR produktu attīrīšanu veica, izmantojot *MicroSEQ™ ID Sequencing Clean-up* kārtidžus (Applied Biosystems™; ASV). Kārtidžus sagatavoja, centrifugējot 3 min 850 x g. Kārtidžu kolonnu izņēma un ievietoja jaunā 1.5 mL mikrocentrifūgas stobriņā. Katras kolonnas centrā iepildīja 10 µL sekvenčēšanas PCR produkta. Paraugus centrifugēja 3 min 850 x g. Attīrītos sekvenčēšanas produktus uzglabāja saldētavā –20 °C. Sekvenčēšanas PCR produktu elektroforēzi veica, izmantojot Sanger ģenētisko analizatoru (*3500 Genetic Analyzer*; Applied Biosystems/HITACHI, ASV). Ģenētiskā analizatora parametri: kapilāru garums 50 cm; 96 bedrīšu plates (*MicroAmp Optical 96-Well reaction plate*; ThermoFisher Scientific, ASV). Izmantots polimērs POP-7™ (Applied Biosystems™, ASV). 96 bedrīšu platē katrā bedrītē ievietoja 10 µL Hi-Di™ formamīda (Applied Biosystems™, ASV) un 10 µL attīrītā sekvenčēšanas PCR parauga.

2.3.3. 16S rRNS sekvencēšanas rezultātu analīze

Sekvencēšanas rezultātus analizēja, izmantojot programmu CLC Main Workbench 20.0.2. (Qiagen, ASV). Sākotnēji visas sekvenču manuāli pārbaudīja, salīdzinot sekvencēšanas rezultātā iegūtos hromatogrammas pīkus ar programmas identificētajiem nukleotīdiem, šādā veidā pārbaudot, vai programma ir izpildījusi precīzu nukleotīdu secības noteikšanu. Kļūdas izlabotas manuāli. Tālāk apkopoja visas sešas sekvenču vienā sekvencē – savietojot kopā viena baktērijas celma visus trīs 16S rRNS gēna fragmentus. Sekvencēšanu katram gēna fragmentam veica abos virzienos, tādā veidā apstiprinot sekvencētā fragmenta nukleotīdu secību. Pilno apvienoto 16S rRNS gēna sekvenci izmantoja gumiņbaktēriju celma identifikācijai, kā arī filoģenētiskajām analīzēm.

Gumiņbaktēriju celmus identificēja, izmantojot publiski pieejamo ASV Nacionālās biotehnoloģijas informācijas centra (NCBI) GenBank standarta nukleotīdu datubāzes (nr/nt) meklēšanas programmu BLAST¹⁶. Šīs datubāzes meklētājā ievadīja gumiņbaktēriju celma sekvencēšanas rezultātā iegūto pilna garuma 16S rRNS gēna sekvenci. No datubāzē piedāvātajiem rezultātiem izmantoja organismu, kuram uzrādīja pētāmajam celmam tuvāko identificēto taksonomisko piederību un sekvenču līdzību. Visu genotipu taksonomisko piederību papildus pārbaudīja, izmantojot brīvpieejas datubāzi SILVA¹⁷ (Vācija). Šajā pētījumā identificētās gumiņbaktēriju celmu pilna garuma 16S rRNS gēnu sekvenču deponētas NCBI GenBank datubāzē.

2.3.4. 16S rRNS sekvencēšanas datu statistiskā analīze

Visas pētāmo gumiņbaktēriju celmu pilna garuma 16S rRNS gēna sekvenču analīzē, veicot daudzkārtējo sekvenču salīdzinājumu (*multiple sequence alignment*) CLC Main Workbench 20.0.2. programmā, izmantojot šādus parametrus: *gap open cost* = 10.0; *gap extension cost* = 1.0; *end gap cost* = as any other; *alignment mode* = very accurate. Papildus šajā pētījumā iekļautajiem gumiņbaktēriju celmiem, sekvenču salīdzinājumā iekļāva arī identificēto celmu tuvradniecīgu baktēriju pilna garuma vai gandrīz pilna garuma 16S rRNS gēna sekvenču, izmantojot NCBI GenBank datubāzē pieejamo informāciju.

Pirms filoģenētiskās dendrogrammas izveides, no izveidotā sekvenču salīdzinājuma izņēma ārā pētāmo gumiņbaktēriju celmu paraugus, kuriem ir identiskas sekvenču, atstājot tikai vienu reprezentatīvu paraugu katrai unikālajai pilna garuma 16S rRNS gēna sekvencei. Balstoties uz veikto daudzkārtējo sekvenču salīdzinājumu, izveidoja filoģenētisko dendrogrammu, izmantojot parametrus: *Neighbor Joining* filoģenētiskās dendrogrammas konstrukcijas metode; nukleotīdu aizvietošanas modelis (*nucleotide substitution model*) = Kimura 80. Lai pārbaudītu filoģenētiskā koka būtiskumu un evolucionāro ticamību, izmantoja butstrapa (*bootstrap*) analīzes metodi 1000 atkārtojumos. Butstrapa analīzes vērtības filoģenētiskā koka zarojuma mezglu punktos, kuras ir 70% vai augstākas, norāda uz filoģenētiskā koka zarojuma ticamību (Sleator, 2011). Pēc šādiem principiem izveidoja vairākus filoģenētiskos kokus – vienu, kurā apvienoja visus pētījumā iekļautos gumiņbaktēriju celmus, kā arī atsevišķus kokus, kur sīkāk apskatītas gumiņbaktēriju celmu pārstāvētās klases.

¹⁶ NCBI BLAST[®] (*Basic Local Alignment Search Tool*), [Tiešsaiste] [skatīts 28.05.2023.]. Pieejams: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

¹⁷ SILVA ribosomal RNA database, [Tiešsaiste] [skatīts 19.02.2023.]. Pieejams: <https://www.arb-silva.de/>

2.3.5. 16S rRNS gēna mainīgo reģionu aprēķināšana

Pilna 16S rRNS gēna mainīgos un konservatīvos reģionus noteica, aprēķinot, cik bieži pētāmo gumiņbaktēriju celmu daudzkārtējā sekvenču salīdzinājumā noteiktā pozīcijā (bp) ir visbiežāk sastopamais nukleotīds. Biežumu aprēķināja pēc formulas:

$$\text{biežums} = \frac{a \cdot k}{n}, \quad (1)$$

kur:

a = nukleotīda sastopamība konkrētajā pozīcijā gumiņbaktēriju sekvenču salīdzinājumā;

k = maksimālais biežuma indekss (ja visos paraugos nukleotīds sastopams = 1);

n = kopējais paraugu skaits sekvenču salīdzinājumā.

2.4. Augsnes analīzes

Augsnes paraugus ievāca vienlaicīgi ar jaunu gumiņbaktēriju celmu izdalīšanu (2.2. apakšnodaļa). Auga sakņu daļu izraka un kopā ar augsnes paraugu ievietoja plastmasas maisiņā. Pēc gumiņu nolasīšanas, augsnes paraugus uzglabāja plastmasas maisiņos bez auga sakņu daļas. Paraugus uzglabāja sausā telpā, istabas temperatūrā līdz analīžu veikšanai (līdz trīs mēnešiem).

2.4.1. Augsnes agroķīmisko rādītāju mērījumi

Augsnes analīzes veiktas vadoties pēc divām dažādām metodēm. Augsnes pH, elektrovadītspēju ($\mu\text{S}/\text{cm}$), Na (mg kg^{-1}), K (mg kg^{-1}), NO_3^- (mg kg^{-1}) un Ca (mg kg^{-1}) noteica izmantojot LAQUAtwin kabatas izmēra mērītājus (Horiba, Vācija). Augsnes paraugam pievienoja destilētu ūdeni attiecībā 1:1 50 mL centrifūgas stobriņā. Paraugu sakratīja un atstāja istabas temperatūrā 24 h. Augsnes paraugus centrifugēja un augsnes analīzēm izmantoja supernatantu (šķīduma virsējo daļu). Vienu pilienu (vismaz 0.1 mL) uzpilināja uz mērītāja sensora, to aizvēra un nolasīja rezultātu. Augsnes mērījumus ar LAQUAtwin veica trīs atkārtojumos.

Fosfora saturu augsnē noteica LBTU Augsnes un augu zinātņu institūta laboratorijā pēc Egnera-Rīma metodes (LV ST ZM 82-97¹⁸). Augsnes paraugus (4 g) apstrādāja ar kalcija laktāta buferšķīdumu (200 mL; pH 3.6–3.7). Paraugu skaloja 1.5 h kratītājā. Pēc kratīšanas, suspensiju atstāja istabas temperatūrā 18–20 h. Nesaduļķojot nogulsnes, paņēma 15 mL izvilkuma, kam pievienoja 15 mL krāsojošā šķīduma (amonija molibdāts, kālija-antimona tartrāts, askorbīnskābe) un rūpīgi samaisīja. Pēc 30 min paraugu kolorimetrēja, izmantojot 1 cm kivetes 710 nm gaismas plūsmā. Rezultātu salīdzināja ar c_{st} standartiem un aprēķināja pēc formulas:

$$x = \frac{V \times c_{st} \times d_x}{B \times d_{st}} \quad (2)$$

kur: x = P_2O_5 , mg kg^{-1} augsnes;

¹⁸ “Augšņu agroķīmiskās izpētes un izpētes rezultātu novērtēšanas kārtība” [Tiešsaiste] [skatīts 19.02.2023.]. Pieejams: <https://www.vaad.gov.lv/lv/media/1031/download>

V = izvilkuma gatavošanai ņemtā šķīduma tilpums, mL;
 C_{st} = standartšķīduma koncentrācija, mg L⁻¹;
 d_x = analīzes nolasījums uz spektrofotometra (optiskais blīvums);
 d_{st} = standartšķīduma nolasījums uz FEK (optiskais blīvums);
 B = augsnes iesvars, kas ņemts izvilkuma gatavošanai, g.

2.4.2. Augsnes agroķīmisko rādītāju rezultātu datu apstrāde

Augsnes agroķīmisko rādītāju analīžu rezultātus apskatīja gan pēc saimniekaugiem, no kuriem izdalītas gumiņbaktērijas attiecīgajā augsnes paraugā, gan pēc identificētajām baktēriju ģintīm vai sugām. Datu vizualizācijai izmantoja *MS Excel* programmas kastveida un nogriežņa procentiņu diagrammas (“*Box and Whisker*”), uzrādot datu izkliedi konkrētās grupas ietvaros (saimniekauga ģints vai identificētās baktērijas ģints/suga).

Statistiskās analīzes veica programmā *MS Excel*, ar brīvpieejas spraudni *XLSTAT*. Lai noteiktu pētāmo pazīmju lineārās sakarības ciešumu, veica Pīrsona korelācijas analīzi. Korelācijas ciešumu novērtēja pēc sekojošajiem koeficientu rādītājiem: 0–0.299 = vāja sakarība; 0.3–0.699 = vidēji cieša sakarība; 0.7–1.0 = cieša sakarība (Ratner, 2009). Lai noteiktu augsnes analīžu rādītāju ietekmi savā starpā, veica PCA analīzi (*Principal components analysis*; galveno komponentu analīze), konstruējot augsnes analīžu rādītāju slodzes grafiku (Jolliffe, Cadima, 2016).

3. PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Tauriņziežu sēkļu apstrādē izmantotie Latvijas gumiņbaktēriju celmi līdz šim identificēti vadoties pēc fenotipiskajām īpašībām, bet to ģenētiskā identitāte nebija zināma. Atlasot efektīvākos gumiņbaktēriju celmus un identificējot tos, var izveidot augstas kvalitātes komerciālus preparātus, kas nodrošinātu maksimālo slāpekļa saistīšanu konkrētam kultūraugam. Gumiņbaktēriju preparātu produktu izstrādē ir nepieciešams zināt, kādu sugu baktēriju celmi tiek pievienoti konkrētam preparātam (Bottomley, 1992; Young, 1992).

3.1. LBTU kolekcijā esošo gumiņbaktēriju celmu inventarizācija

Pētījumā veica LBTU Augsnes un augu zinātņu institūta Gumiņbaktēriju kolekcijā jau esošo (turpmāk tekstā “vēsturiskā gumiņbaktēriju kolekcija”) un no jauna izdalīto gumiņbaktēriju celmu inventarizāciju, rezultātā iegūstot baktēriju tīrkultūras ar apkopotu pieejamo informāciju par šiem baktēriju celmiem (3.1. tabula). Informācija, kuru apkopoja par katru kolekcijā esošo baktēriju celmu, ietver celma kodu (gan vēsturiski piešķirto, gan kodu, kas piešķirts pēc inventarizācijas); saimniekaugu, no kura saknēm gumiņbaktēriju celms izdalīts; gadu, kad veikta baktēriju izdalīšana; teritoriju, kur veikta gumiņbaktēriju celma izdalīšana. Daļu gumiņbaktēriju celmu, kas atradās LBTU vēsturiskajā gumiņbaktēriju kolekcijā zem viena nosaukuma, bet atsevišķās mēģenēs, sadalīja vairākos jaunus paraugus, lai varētu pārliecināties, vai visas mēģenes ar vienu nosaukumu, patiešām satur ģenētiski identiskus gumiņbaktēriju celmus, un baktēriju pārsēšanā gadu desmitu garumā nav notikusi kāda celma kontaminācija. Piemēram, gumiņbaktēriju celmu ar vēsturisko nosaukumu “23” sadalīja vairākos paraugus – RP02301, RP023Z un RP023Y (3.1. tabula). Katram paraugam atsevišķi tālāk veica ģenētisko identifikāciju (skatīt apakšnodaļu 3.2.). Ne visus gumiņbaktēriju celmus, kas iepriekš bija iekļauti vēsturiskajā kolekcijā, inventarizācijas procesā varēja veiksmīgi attīrīt un iegūt tīrkultūras. Tā, piemēram, celmam “110”, kas iepriekš bijis iekļauts vairākos pētījumos (Dubova, 2020; Klāsens, 1994), novēroja augstu kontaminācijas pakāpi, kas neļāva iegūt dzīvotspējīgu gumiņbaktēriju tīrkultūru, ģenētiskās identitātes noteikšanai.

Vēsturiskā gumiņbaktēriju kolekcija pirms inventarizācijas saturēja 34 gumiņbaktēriju celmus (2.1. tabula). Savukārt pēc inventarizācijas kolekcijā atrodas 46 attīrīti vēsturiskās kolekcijas celmi. Papildus šiem celmiem, iegūti 143 jauni gumiņbaktēriju celmi. Kopumā atjaunotajā LBTU gumiņbaktēriju kolekcijā atrodas 189 gumiņbaktēriju celmi, kas izdalīti no 14 dažādām tauriņziežu ģintīm, no kuriem 59 celmi izdalīti no lauka pupām, 32 celmi izdalīti no sojas, 23 celmi no āboliņa, 22 celmi no zirņiem un 15 celmi izdalīti no lucernas. Savukārt no atlikušajiem 10 ģinšu pārstāvjiem no katra izdalīti mazāk par 10 gumiņbaktēriju celmiem. Kolekcijas celmi izdalīti no dažādām teritorijām Latvijā, aptverot 15 dažādus novadus Latvijā, kā arī 3 teritorijas ārpus Latvijas (sīkāk par baktēriju celmu izplatību skatīt apakšnodaļu 3.3.). Atjaunotajā LBTU Augsnes un augu zinātņu institūta Gumiņbaktēriju celmu kolekcijā apvienoti gumiņbaktēriju celmi, kas izdalīti sākot no 1962. gada līdz 2019. gadam.

LBTU Gumiņbaktēriju celmu kolekcijas inventarizācijas apkopojumā (3.1. tabula) iekļauti visi gumiņbaktēriju celmi, kuriem iegūtas baktēriju tīrkultūras. Visiem šiem celmiem veiktas DNS analīzes, tomēr ne visiem baktēriju celmiem veikta ģenētiskā identifikācija, iegūtas DNS vai amplificēto DNS fragmentu kvalitātes dēļ.

LBTU Augšnes un augu zinātņu institūta gumiņbaktēriju kolekcijas inventarizācija

N.p.k.	Jaunais kolekcijas gumiņbaktēriju celma kods [vecais kods]	Gumiņbaktēriju celma izdalīšana		
		Saimniekaugs	Izdalīšanas gads	Teritorija
Triba: <i>Fabeae</i>				
Ģints: <i>Pisum</i>				
1.–3.	RP02301, RP023Z, RP023Y [23]	<i>P. sativum</i>	1962.	Vecauce, Dobeles novads
4.	RP20201 [202]	<i>P. sativum</i>	1964.	Pļavas, Talsu novads
5.	RP30201 [302]	<i>P. sativum</i>	1973.	Talsi, Talsu novads
6.–10.	RP00101 [Zi-1]; RP00301, RP00302, RP00303, RP00304 [Zi-3]	<i>P. sativum</i>	2011.	Stende, Talsu novads
11.–12.	RP00701; RP00601	<i>P. sativum</i>	2016.	Pūre, Tukuma novads
13.–14.	RP01201; RP01101	<i>P. sativum</i>	2016.	Stoļerovas pagasts, Rēzeknes novads
15.–17.	RP01001; RP00801; RP00901	<i>P. sativum</i>	2016.	Priekuļi, Priekuļu novads
18	RP00501	<i>P. sativum</i>	2016.	Dižstende, Talsu novads
19	RP01401	<i>P. sativum</i>	2016.	Pēterlauki, Jelgavas novads
20.–22.	RP2030; RP2040; RP2010	<i>P. sativum</i>	2018.	Pēterlauki, Jelgavas novads
Ģints: <i>Vicia</i>				
23.	RV02001 [20]	<i>V. faba</i>	1962.	Vecauce, Dobeles novads
24.	RV06902 [69]	<i>V. faba</i>	1970.	Jelgavas novads
25.–28.	RV40703, RV40704, RV40705 [407]; RV40801 [408]	<i>V. faba</i>	1972.	Pēterlauki, Jelgavas novads
29.–30.	RV50104 [501]; RV50503 [505]	<i>V. faba</i>	1973.	Dimzas, Jelgavas novads
31.	RV00101 [LP]	<i>V. faba</i>	2009.	Stende, Talsu novads
32.–33	RV00201 [LP-1]; RV00301 [LP-2]	<i>V. faba</i>	2010.	Stende, Talsu novads
34.	RV00801	<i>V. faba</i>	2016.	Pūre, Tukuma novads
35.–37.	RV00901; RV01001; RV01101	<i>V. faba</i>	2016.	Priekuļi, Priekuļu novads
38.–39.	RV01401; RV01501	<i>V. faba</i>	2016.	Stoļerovas pagasts, Rēzeknes novads
40.–41.	RV01201; RV01301	<i>V. faba</i>	2016.	Griškānu pagasts, Rēzeknes novads
42.–44.	RV00501; RV00601; RV00701	<i>V. faba</i>	2016.	Dižstende, Talsu novads
45.–46.	RV08601; RV01901	<i>V. faba</i>	2016.	Jelgava

3.1. tabulas turpinājums

N.p.k.	Jaunais kolekcijas gumiņbaktēriju celma kods [vecais kods]	Gumiņbaktēriju celma izdalīšana		
		Saimniekaugs	Izdalīšanas gads	Teritorija
47.	RV02201	<i>V. faba</i>	2016.	Pēterlauki, Jelgavas novads
48.–50.	RV01601; RV01701; RV01801	<i>V. faba</i>	2016.	Bauska, Bauskas novads
51.–52.	RV2010; RV2020	<i>V. faba</i>	2018.	Jelgava
53.–54.	RV2021; RV2001	<i>V. faba</i>	2018.	Skrīveri, Skrīveru novads
55.	RV19ĶE	<i>V. faba</i>	2019.	Jūrmala
56.–70.	RV19/P2; RV19/P4; RV19/P5; RV19/P6; RV19/K3; RV19/K5; RV19/K10; RV19/K12; RV19.1/2; RV19.1/10; RV19.1/13; RV19.2/4; RV19.2/11; RV19.2/13; RV19.3/5	<i>V. faba</i>	2019.	Medzes pagasts, Grobiņas novads
71.–72.	RVLTSKR; RVL60	<i>V. faba</i>	2019.	Senie Traķi (Senieji Traķi), Lietuva
73.–74.	RVi00601; RVi00701	<i>V. cracca</i>	2016.	Kūkas pagasts, Krustpils novads
75.–76.	RVi00401; RVi00501	<i>V. cracca</i>	2016.	Priekuļi, Priekuļu novads
77.–78.	RVi00801; RVi00901	<i>V. cracca</i>	2016.	Griškānu pagasts, Rēzeknes novads
79.	RVi00101	<i>V. sativa</i>	2016.	Dižstende, Talsu novads
80.–81.	RVi00201; RVi00301	<i>V. sativa</i>	2016.	Pūre, Tukuma novads
Ģints: <i>Lathyrus</i>				
82.	RLa00301	<i>L. pratensis</i>	2016.	Griškānu pagasts, Rēzeknes novads
83.	RLa00101	<i>L. pratensis</i>	2016.	Pūre, Tukuma novads
Triba: <i>Galegeae</i>				
Ģints: <i>Galega</i>				
84.	RG00201 [02]	<i>Galega</i> sp.	1982.	Saku, Igaunija
85.	RG00101 [G-1]	<i>G. orientalis</i>	2008.	Saku, Igaunija
86.	RG00401	<i>G. orientalis</i>	2016.	Griškānu pagasts, Rēzeknes novads
87.–88.	RG2010; RG2020	<i>G. orientalis</i>	2018.	Skrīveri, Skrīveru novads
Triba: <i>Genisteae</i>				
Ģints: <i>Lupinus</i>				
89.	RL00301 [3]	<i>Lupinus</i> sp.	1970.	Pēterlauki, Jelgavas novads
90.–91.	RL00401 [LUP1]; RL00501 [LUP2]	<i>Lupinus</i> sp.	Nav pieejamas informācijas	

3.1. tabulas turpinājums

N.p.k.	Jaunais kolekcijas gumiņbaktēriju celma kods [vecais kods]	Gumiņbaktēriju celma izdalīšana		
		Saimniekaugs	Izdalīšanas gads	Teritorija
92.–93.	RL01001; RL01101	<i>Lupinus</i> sp.	2016.	Olaines novads
94.–96.	RL00701; RL00701/2; RL00801	<i>L. angustifolius</i>	2016.	Dižstende, Talsu novads
97.	RL00901	<i>L. albus</i>	2016.	Priekuļi, Priekuļu novads
Triba: <i>Loteae</i>				
Ģints: <i>Lotus</i>				
98.	RL00101	<i>Lotus</i> sp.	2016.	Priekuļi, Priekuļu novads
99.–101.	RL00201; RL00301; RL00401	<i>Lotus</i> sp.	2016.	Jelgava
102.–103.	RVg2011; RVg2021	<i>Lotus</i> sp.	2018.	Skrīveri, Skrīveru novads
Ģints: <i>Anthyllis</i>				
104.	RA00101	<i>Anthyllis</i> sp.	2016.	Jūrmala
Triba: <i>Phaseoleae</i>				
Apakštriba: <i>Phaseolinae</i>				
Ģints: <i>Phaseolus</i>				
105.–107.	RPh11601, RPh11602, RPh11603 [116]	<i>P. vulgaris</i>	1963.	Pēterlauki, Jelgavas novads
108.	RPh00501	<i>P. vulgaris</i>	2016.	Dižstende, Talsu novads
109.	RPh00601	<i>P. vulgaris</i>	2016.	Jelgava
Ģints: <i>Vigna</i>				
110.–111.	RVg00101 [V]; RVg00201 [V1]	<i>Vigna</i> sp.	2013.	Jelgava
112.	RVn2010	<i>V. unguiculata</i>	2018.	Jelgava
Apakštriba: <i>Glycininae</i>				
Ģints: <i>Glycine</i>				
113.–118.	RS00104 [S-1]; RS00201, RS00202, RS00203, RS00204 [S-2]; RS00301 [S-3]	<i>G. max</i>	2014.	Stende, Talsu novads
119.	RS00601	<i>G. max</i>	2016.	Pūre, Tukuma novads
120.–123.	RS2010; RS2020; RS2030; RS2040	<i>G. max</i>	2018.	Skrīveri, Skrīveru novads
124.–133.	RS2011; RS2021; RS2031; RS2041; RS2051; RS2061; RS2071; RS2081; RS2281; RS2091	<i>G. max</i>	2018.	Priekuļi, Priekuļu novads
134.–135.	RS3010; RS3020	<i>G. max</i>	2019.	Olaines novads
136.–137.	RSBASF/S; RSBASF/M	<i>G. max</i>	2019.	Tadaiķu pagasts, Durbes novads

3.1. tabulas turpinājums

N.p.k.	Jaunais kolekcijas gumiņbaktēriju celma kods [vecais kods]	Gumiņbaktēriju celma izdalīšana		
		Saimniekaugs	Izdalīšanas gads	Teritorija
138.–140.	RSMix19/XS; RSMix19/M; RSMix19/L	<i>G. max</i>	2019.	Jelgava
141.–144.	RS2041/19; RS2061/19; RS2081/19; RS2030/19	<i>G. max</i>	2019.	Jelgava
Ģints: <i>Medicago</i>				
145.	RM09201 [P9M2]	<i>Medicago sp.</i>	1962.	Jelgava
146.–148.	RM24502, RM24503, RM24505 [422a]	<i>Medicago sp.</i>	1972.	“Ļeņingradas kolekcija” (Allen, Hamatova, 1973)
149.	RM00101 [LucS]	<i>Medicago sp.</i>	2015.	Jelgava
150.	RM00301	<i>M. falcata</i>	2016	Pūre, Tukuma novads
151.	RM00401	<i>M. sativa</i>	2016	Priekuļi, Priekuļu novads
152.	RM00501	<i>M. sativa</i>	2016	Kūkas pagasts, Krustpils novads
153.	RM00701	<i>M. sativa</i>	2016	Griškānu pagasts, Rēzeknes novads
154.–157.	RM00901; RM01001; RM01101; RM01201	<i>M. sativa</i>	2016	Jelgava
158.–159.	RLuc2011; RLuc2021	<i>M. sativa</i>	2018	Skrīveri, Skrīveru novads
Ģints: <i>Melilotus</i>				
160.	RMe00101	<i>Melilotus sp.</i>	2016	Stoļerovas pagasts, Rēzeknes novads
161.–163.	RAm2010; RAm2012; RAm2021	<i>Melilotus sp.</i>	2018	Skrīveri, Skrīveru novads
164.	RAm2020	<i>M. albus</i>	2018	Skrīveri, Skrīveru novads
165.	RAm2011	<i>M. officinalis</i>	2018	Skrīveri, Skrīveru novads
Ģints: <i>Trifolium</i>				
166.	RT32603 [326]	<i>T. pratense</i>	2006	Skrīveri, Skrīveru novads
167.–169.	RT00101 [Sark.āb.-1]; RT00201 [Āb.-2]; RT00301 [Sark.āb.-3]	<i>Trifolium sp.</i>	2007	Jelgava
170.	RT00901	<i>T. pratense</i>	2016	Priekuļi, Priekuļu novads
171.–172.	RT01001; RT01101	<i>T. repens</i>	2016	Priekuļi, Priekuļu novads
173.	RT00501	<i>Trifolium sp.</i>	2016	Dižstende, Talsu novads
174.–177.	RT01901; RT02001; RT02101; RT02201	<i>Trifolium sp.</i>	2016	Jūrmala
178.	RT00701	<i>T. campestre</i>	2016	Pūre, Tukuma novads
179.	RT00801	<i>T. repens</i>	2016	Pūre, Tukuma novads

3.1. tabulas nobeigums

N.p.k.	Jaunais kolekcijas gumiņbaktēriju celma kods [vecais kods]	Gumiņbaktēriju celma izdalīšana		
		Saimniekaugs	Izdalīšanas gads	Teritorija
180.	RT01301	<i>Trifolium sp.</i>	2016	Griškānu pagasts, Rēzeknes novads
181.	RT01601	<i>Trifolium sp.</i>	2016	Kokneses novads
182.	RT01701	<i>T. pratensis</i>	2016	Ēdoles pagasts, Kuldīgas novads
183.	RT01801	<i>T. repens</i>	2016	Jūrkalnes pagasts, Ventspils novads
184.	RT2010	<i>T. repens</i>	2018	Skrīveri, Skrīveru novads
185.–186.	RT2020; RT2021	<i>T. pratensis</i>	2018	Skrīveri, Skrīveru novads
187.–188.	RT2011; RT2050	<i>Trifolium sp.</i>	2018	Skrīveri, Skrīveru novads
Ģints: <i>Ononis</i>				
189.	RO00101	<i>O. arvensis</i>	2016	Tumes pagasts, Tukuma novads

3.2. Gumiņbaktēriju celmu ģenētiskā identifikācija

Lai identificētu gumiņbaktēriju celmu taksonomisko piederību, analizēja pilnu 16S rRNS gēnu. Lai iegūtu pilna 16S rRNS gēna sekvenci, to amplificēja trīs atsevišķos fragmentos, un katru fragmentu sekvencēja no abām pusēm, izmantojot gan tiešo, gan atgriezenisko praimeru. Tātad viena parauga identifikācijai veica sešu fragmentu sekvencēšanu un analīzi. Kopumā analizēja 173 gumiņbaktēriju celmus, veicot 1038 sekvencēšanas reakcijas. Ne visi sekvencētie paraugi uzrādīja kvalitatīvus hromatogrammas rezultātus, tāpēc no analizētajiem 173 paraugiem, identificēt varēja 146 baktēriju celmus. Visus sekvencētos 16S rRNS gēna fragmentus apkopoja un apkopoto sekvenci izmantoja, lai noteiktu šī celma 16S rRNS gēna sekvenču līdzību ar NCBI GenBank datubāzē pieejamajām sekvencēm un identificētu tuvākā organisma taksonomisko piederību sugas vai ģints līmenī (1. pielikums). No datubāzē piedāvātajiem rezultātiem, izmantoja organismu, kuram uzrādīta pētāmajam celmam tuvākā identificētā taksonomiskā piederība un sekvenču līdzība, manuāli izvērtējot šī rezultāta ticamību – pārbaudot datubāzes parauga anotāciju. Visi identificētie gumiņbaktēriju celmi uzrādīja vismaz 99% līdzību ar datubāzē pieejamo organismu 16S rRNS gēna sekvencēm. Baktēriju celmus, kuru 16S rRNS sekvenču bija identiskas, apkopoja vienā genotipā. Kopā ieguva 62 unikālus genotipus, kurus tālāk izmantoja filoģenētiskajās analīzēs.

Identificētie celmi pieder pie četrām baktēriju klasēm – α -, β -, γ -*proteobacteria* un *Bacilli*. Lielākā daļa identificēto paraugu (96 celmi) pieder α -proteobaktēriju klasei, savukārt 15 celmi pieder β -proteobaktēriju klasei, bet 28 celmi – γ -proteobaktēriju klasei. Septiņi identificētie celmi pieder *Bacilli* klasei. Sīkāk par identificēto baktēriju daudzveidību aprakstīts 3.2.2. apakšnodaļā. Visu identificēto baktēriju celmu sekvenču deponēja NCBI GenBank datubāzē. Šajā datubāzē celmi atrodami, izmantojot GenBank piešķirtos kodus (1. pielikums).

No tauriņziežu gumiņiem izdalīto baktēriju ģenētiskā identifikācija, izmantojot pilna garuma 16S rRNS gēna sekvenses

N.p.k	Genotips (paraugu grupas kods filoģenētiskajā kokā)	Genotipā iekļauto baktēriju celmu skaits	Taksonomiskais iedalījums (klase)	Taksonomiskā piederība un sekvenses līdzība (%)*
1.	RhL01	31	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> (100%) <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (100%) <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (100%)
2.	RhL05	1		<i>Rhizobium leguminosarum</i> (100%)
3.	RhL03	1		<i>Rhizobium leguminosarum</i> (99%) <i>Rhizobium</i> <i>leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (99%)
4.	RhL06	1		<i>Rhizobium leguminosarum</i> (99%)
5.	RhL02	6		<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (100%) <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (99%)
6.	RhSP01	1		<i>Rhizobium</i> sp. (99%) <i>Bradyrhizobium</i> sp. (99%) <i>Rhizobium leguminosarum</i> (99%)
7.	RhSP02	1		<i>Rhizobium</i> sp. (100%) <i>Bradyrhizobium</i> sp. (99%) <i>Rhizobium leguminosarum</i> (99%)
8.	RhG01	4		<i>Rhizobium gallicum</i> (99%)
9.	RhL04	1		<i>Rhizobium leguminosarum</i> (99%)
10.	ShSP01	1		<i>Ensifer adhaerens</i> (100%) <i>Sinorhizobium</i> sp. (99%)
11.	RhSP03	1		<i>Rhizobium</i> sp. (99%)
12.	RhSP04	1		<i>Rhizobium</i> sp. (99%)
13.	RhSP05	16		<i>Rhizobium</i> sp. (100%)
14.	RhSP07	13		<i>Rhizobium</i> sp. (100%)
15.	RhSP08	1		<i>Rhizobium</i> sp. (99%)
16.	RhSP09	1		<i>Rhizobium</i> sp. (99%)
17.	RhSP06	7		<i>Rhizobium</i> sp. (100%)
18.	NhG01	3		<i>Neorhizobium galegae</i> (99%)
19.	MhSP01	1		<i>Mesorhizobium</i> sp. (99%)
20.	MhSP02	1		<i>Mesorhizobium</i> sp. (100%)
21.	ASP01	1		<i>Azospirillum</i> sp. (99%)

3.2. tabulas nobeigums

N.p.k	Genotips (paraugu grupas kods filoģenētiskajā kokā)	Genotipā iekļauto baktēriju celmu skaits	Taksonomiskais iedalījums (klase)	Taksonomiskā piederība un sekvenču līdzība (%)*
22.	BhJ01	1	α - proteobacteria	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (100%)
23.	RhSP10	1		<i>Rhizobium</i> sp. (100%)
24.	PbT01	3	β - proteobacteria	<i>Paraburkholderia terricola</i> (99%)
25.	PbT02	1		<i>Paraburkholderia terricola</i> (99%)
26.	PbT03	2		<i>Paraburkholderia terricola</i> (99%)
27.	PbT04	1		<i>Paraburkholderia terricola</i> (100%)
28.	BSP04	3		<i>Burkholderia</i> sp. (99%)
29.	BSP05	1		<i>Burkholderia</i> sp. (99%)
30.	BSP06	1		<i>Burkholderia</i> sp. (99%)
31.	PbC01	1		<i>Paraburkholderia caledonica</i> (100%)
32.	BSP07	1		<i>Burkholderia</i> sp. (99%)
33.	AcSP01	1		<i>Achromobacter</i> sp. (99%)
34.	RA01	2	γ -proteobacteria	<i>Rahnella aquatilis</i> (99%)
35.	RA02	3		<i>Rahnella aquatilis</i> (99%)
36.	RA03	1		<i>Rahnella aquatilis</i> (99%)
37.	SrP01	1		<i>Serratia plymuthica</i> (99%)
38.	SrP02	1		<i>Serratia plymuthica</i> (99%)
39.	SrP04	1		<i>Serratia plymuthica</i> (99%)
40.	ESP01	1		<i>Enterobacter</i> sp. (99%)
41.	ESP02	1		<i>Enterobacter</i> sp. (99%)
42.	ESP03	1		<i>Enterobacter</i> sp. (99%)
43.	ESP04	1		<i>Enterobacter ludwigii</i> (100%)
44.	EA01	1		<i>Enterobacter asburiae</i> (100%)
45.	EL01	1		<i>Enterobacter ludwigii</i> (99%)
46.	PnA01	1		<i>Pantoea agglomerans</i> (99%)
47.	PnA02	1		<i>Pantoea agglomerans</i> (99%)
48.	PnSP01	1		<i>Pantoea agglomerans</i> (100%)
49.	SrP03	1		<i>Serratia plymuthica</i> (100%)
50.	SrP05	1		<i>Serratia plymuthica</i> (100%)
51.	PSP01	1		<i>Pseudomonas</i> sp. (99%)
52.	PSP02	1		<i>Pseudomonas</i> <i>frederiksbergensis</i> (99%)
53.	PSP04	2		<i>Pseudomonas</i> sp. (100%)
54.	PSP05	1		<i>Pseudomonas</i> sp. (99%)
55.	PSP06	1		<i>Pseudomonas</i> sp. (99%)
56.	PSP07	1		<i>Pseudomonas</i> sp. (99%)
57.	PSP08	1		<i>Pseudomonas</i> sp. (99%)
58.	PaSP05	2	Bacilli	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (99%)

3.2. tabulas nobeigums

N.p.k	Genotips (paraugu grupas kods filoģenētiskajā kokā)	Genotipā iekļauto baktēriju celmu skaits	Taksonomiskais iedalījums (klase)	Taksonomiskā piederība un sekvences līdzība (%)*
59.	PaSP01	2	<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (99%)
60.	PaSP02	1		<i>Paenibacillus peoriae</i> (100%)
61.	PaSP03	1		<i>Paenibacillus polymyxa</i> (99%)
62.	PaSP04	1		<i>Paenibacillus polymyxa</i> (100%)

* pētāmā baktēriju celma sekvences līdzība (%) ar GenBank datubāzē esošā organisma sekvenci.

Lai pārliecinātos par identificēto celmu taksonomiskās piederības ticamību, visus genotipus identificēja arī izmantojot SILVA brīvpieejas datubāzi (1. pielikums). Ģints līmenī 92% genotipu taksonomiskā identitāte sakrita starp abām datubāzēm, no kuriem 76% genotipi uzrādīja identiskus rezultātus; 8% genotipu, kuriem GenBank uzrādīja identitāti ģints līmenī, SILVA datubāzē tie identificēti sugas līmenī; 2% genotipu sakrita identificētās ģintis, bet atšķīrās sugas identitāte. Atšķirīgu taksonomisko piederību noteica 8% genotipu (5 no 62; RhSP05–RhSP09). Šos genotipus ar GenBank datubāzes palīdzību identificēja kā *Rhizobium* ģintij piederošus, savukārt, izmantojot SILVA datubāzi, šos genotipus identificēja kā *Agrobacterium* ģintij piederošus (*A. fabacearum* un *A. radiobacter*). Zināms, ka *Rhizobium* un *Agrobacterium* ir tuvradnieciskas ģintis, kuras reizēm ir gūti atšķiramas, izmantojot tikai 16S rRNS gēnu (Pongslip, 2012). Tāpēc identificējot taksonomisko piederību, jāņem vērā arī fenotipiskās pazīmes, veicot paraugu ievākšanu – piemēram, gumiņu krāsa, kā arī tam, vai augi bija veseli (ņemot vērā, ka *Agrobacterium* sp. ir augiem patogēnas baktērijas). Savukārt, *A. radiobacter* ir raksturotas kā cilvēkiem patogēnās baktērijas (Lai et al., 2004; Namdari, Hamzavi, Peairs, 2003), un ir maz ticams, ka visu šo 4 genotipu 25 celmi piederētu pie šīs *Agrobacterium* sugas.

3.2.1. Gumiņbaktēriju celmu 16S rRNS gēna konservatīvie un mainīgie reģioni

Izmantojot pētāmo gumiņbaktēriju celmu pilnas 16S rRNS gēna sekvenses, aprēķināja šī gēna konservatīvos un mainīgos reģionus. Baktēriju celmu sekvenses, kas pieder α , β -, un γ -proteobaktēriju klasēm izvērtēja atsevišķi. Fragmenti, kuros nukleotīdi konkrētajā pozīcijā visos konkrētās proteobaktēriju klases ietvaros ir identiski (nukleotīda sastopamības biežuma indekss = 1), uzskatāmi par konservatīviem reģioniem. Savukārt reģioni, kuros novērojami atšķirīgi nukleotīdi konkrētajās pozīcijās (nukleotīdu sastopamības biežuma indekss <1), uzskatāmi par mainīgiem reģioniem (3.1. att.).

16S rRNS gēna sekvenses mainīgie reģioni nav vienādi visām baktēriju ģintīm/sugām. Zinot gumiņbaktēriju mainīgo un konservatīvo reģionu atrašanās vietas 16S rRNS gēna sekvencē, varētu izvērtēt atsevišķu reģionu sekvencēšanu identifikācijas vajadzībām, nesekvēncējot pilnu 16S rRNS gēnu. Tomēr, jāņem vērā, ka, izvēloties ģenētiskās radniecības noteikšanai tikai reģionu, kurā ir ļoti augsta mainīguma pakāpe, var pārvērtēt šo baktēriju daudzveidību (Singer et al., 2016). 3.1. att. iezīmēti mainīgie reģioni, balstoties uz literatūras datiem (1.6. att., 1.3.2. apakšnodaļa). Vistuvākā atbilstība šiem mainīgajiem reģioniem ir α -proteobaktērijām. Sekvenču mainīgums β -proteobaktērijām novērojams mazāk, tomēr tas

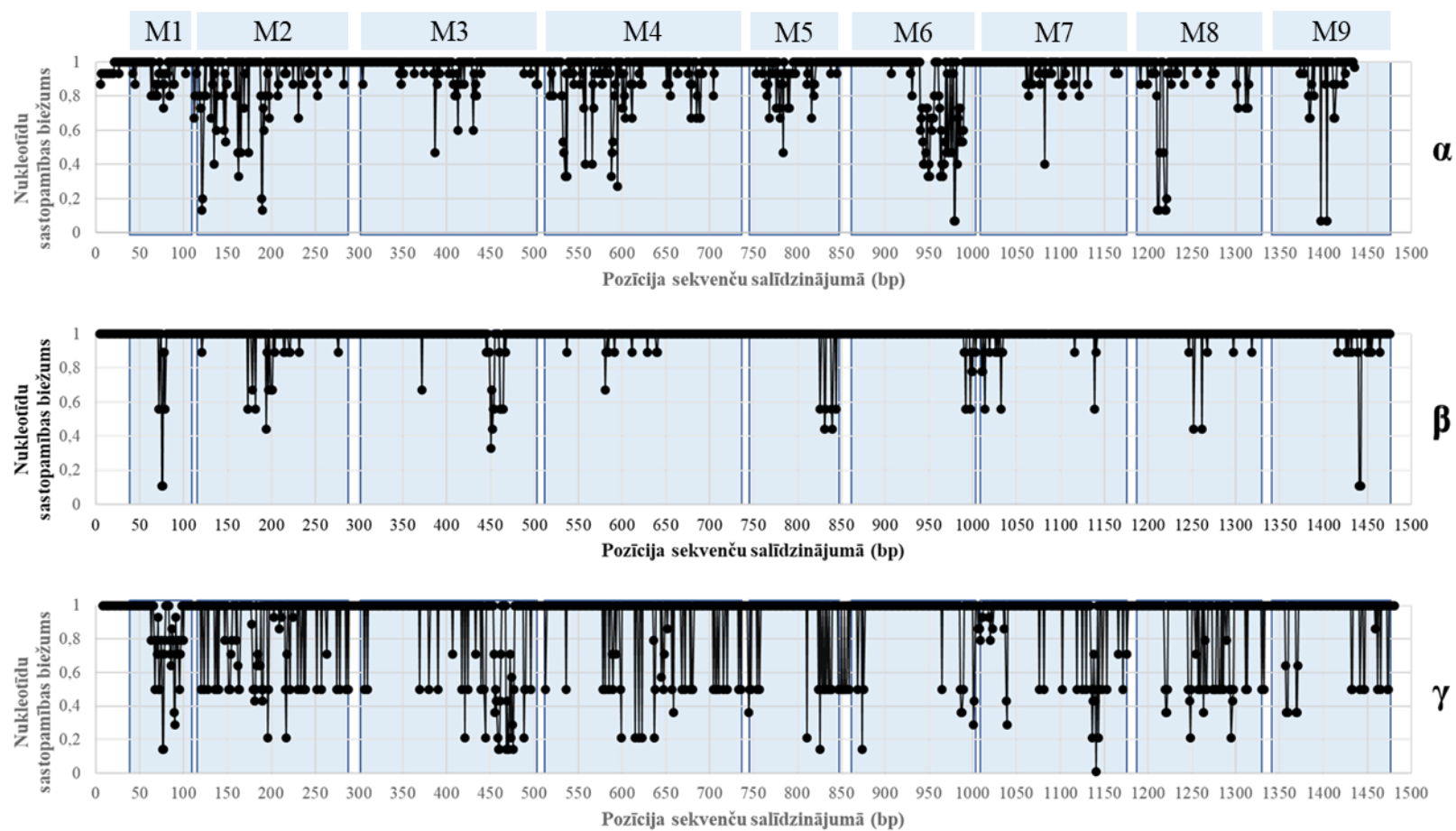
atrodas tajos pašos reģionos, kā minēts literatūras datos. Savukārt γ -proteobaktēriju mainīgie reģioni bieži pārklājas ar literatūrā minētā parauga konservatīvajiem reģioniem. Literatūras avotos līdz šim nav atrodama šāda veida informācija par gumiņbaktēriju 16S rRNS gēna konservatīvajiem un mainīgajiem reģioniem, kas apkopota šajā pētījumā (3.1. att.). Dažādos pētījumos norādīti, kuri no mainīgajiem reģioniem ir visbiežāk izmantoti identificējot baktēriju taksonomisko piederību, kā arī filoģenētiskajās analīzēs (Browman et al., 2015; Earl et al., 2018; Janda, Abbott, 2007; Pongslip, 2012; Pootakham et al., 2017; Rosselli et al., 2016; Wagner et al., 2016), bet nav pieejama informācija par ģenētiskajām atšķirībām šajos mainīgajos reģionos starp dažādām gumiņbaktēriju ģintīm.

Pēdējos gados baktēriju mainīgos reģionus aizvien plašāk izmanto mikrobiomu pētījumos. Tomēr zinātnieku vidū nav vienprātības, kurus no šiem reģioniem izmantot (Hassler et al., 2022). Viens no iemesliem varētu būt atšķirības mainīgajos reģionos starp dažādām baktēriju ģintīm (Singer et al., 2016), ko var novērot arī šī pētījuma rezultātos, salīdzinot mainīgos un konservatīvos reģionus starp dažādu klašu baktērijām. Identificējot gumiņbaktērijas, nezinot to klases piederību, kā arī ņemot vērā pretrunīgo informāciju literatūras datos (apakšnodaļa 1.3.2.), būtu riskanti izmantot konkrētus mainīgos reģionus. Šie rezultāti apstiprina 16S rRNS pilna garuma gēna sekvencēšanas nozīmi arī turpmāk veicot no gumiņiem izdalīto baktēriju celmu identifikāciju.

3.2.2. *Gumiņbaktēriju celmu daudzveidība*

Līdz šim Latvijā pētījumos, kas saistīti ar gumiņbaktērijām, apskatītas tikai pie α -proteobaktērijām piederošās gumiņbaktērijas, pārsvarā *Rhizobium* ģints. Šajā pētījumā pirmo reizi Latvijā no gumiņiem izdalītas baktērijas, kas pieder arī pie β - un γ -proteobaktēriju klasēm. Identificētos gumiņbaktēriju celmus ar identiskām 16S rRNS gēna sekvencēm apvienoja vienā filoģenētiskajā grupā (jeb genotipā), no kuras vienu reprezentatīvo paraugu izmantoja filoģenētiskajā analīzē, veidojot filoģenētiskos kokus. Rezultātā ieguva 62 unikālus genotipus (3.2. tabula). Daļa no šiem genotipiem ir unikāli atsevišķiem celmiem, savukārt daļa genotipu (piemēram, RhL01, RhL02) apvieno vairākus celmus ar identiskām 16S rRNS gēna sekvencēm. Filoģenētiskajā kokā, kurā ietverti visu genotipu reprezentatīvie paraugi (3.2. att.), kā arī atsaucēs genotipi, genotipi sagrupēti četros klasteros. Paraugu genotipi nav sagrupējušies pēc nejaušības principa, bet gan atbilstoši to taksonomiskajam iedalījumam – α -proteobacteria, β -proteobacteria, γ -proteobacteria un *Bacilli* klases piederošie genotipu klasteri.

No 96 identificētajiem baktēriju celmiem, kas pieder **α -proteobaktēriju** klasei, 88 celmi ir *Rhizobium* sp. ģints pārstāvji – 43 no tiem *R. leguminosarum* un četri *R. gallicium* savukārt atlikušo celmu piederību varēja identificēt tikai ģints līmenī. Starp identificētajiem α -proteobaktēriju celmiem, viens identificēts kā *Ensifer adhaerens*; trīs *Neorhizobium galegae*; divi *Mesorhizobium* sp.; viens *Azospirillum* sp., un viens *Bradyrhizobium japonicum* celms. 14 identificētie baktēriju celmi pieder **β -proteobaktēriju** klasei – septiņi *Paraburkholderia terricola*, viens *Paraburkholderia caledonica*, pieci *Burkholderia* sp. un viens *Achromobacter* sp. ģintij piederošs baktēriju celms. No 28 baktēriju celmiem, kas pieder **γ -proteobaktēriju** klasei: septiņi celmi ir *Enterobacter* ģints pārstāvji, no kuriem trīs *Enterobacter ludwigii* un viens *Enterobacter asburiae*; astoņi celmi ir *Pseudomonas* sp. ģints pārstāvji, no kuriem viens celms identificēts kā *Pseudomonas frederiksbergensis*; seši *Rahnella aquatilis*; četri *Serratia plymuthica* un trīs baktēriju celmi identificēti kā *Pantoea agglomerans*. Septiņi identificētie baktēriju celmi pieder ***Bacilli*** klasei, no tiem seši *Paenibacillus polymyxa* un viens *Paenibacillus peoriae*. Lai varētu veikt padziļinātāku filoģenētisko analīzi un tuvradniecīgu gumiņbaktēriju celmu ģenētisko salīdzināšanu, izveidoja filoģenētiskos kokus atsevišķi katrai no proteobaktēriju klasēm. Sazarojumu vietās norādītas bootstrapa (*bootstrap*) metodes analīzes

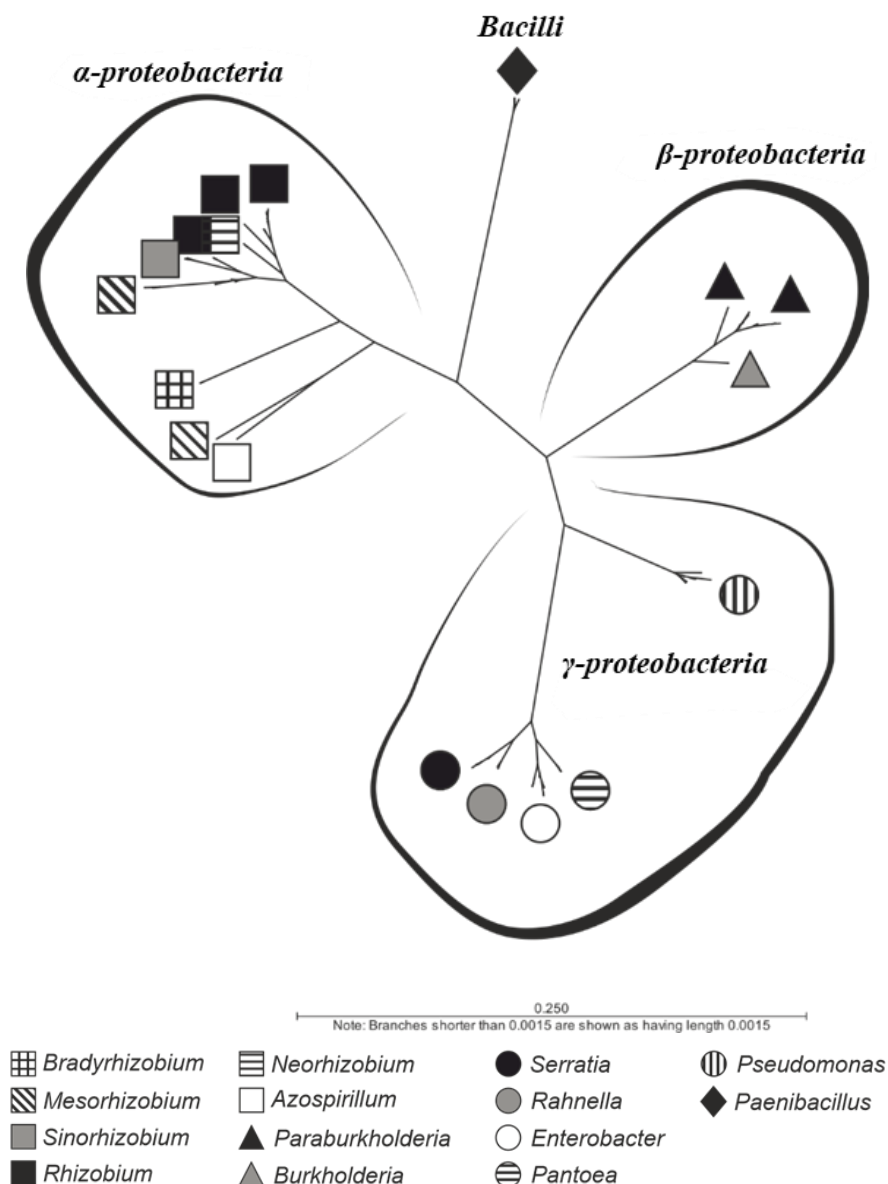


3.1. att.. Identificēto baktēriju celmu 16S rRNS gēna konservatīvie un mainīgie reģioni

Mainīgie reģioni (M1–M9) iekrāsoti gaiši zilā krāsā, balstoties uz literatūras datiem (Singer et al., 2016).

vērtības – ja vērtība lielāka par 70%, tas norāda uz to, ka klasteri ir būtiski atšķirīgi. Savukārt attālums starp zariem norāda uz celmu ģenētisko līdzību – jo tie ir īsāki, jo ģenētiski līdzīgāki ir genotipi.

Lai varētu veikt padziļinātāku filoģenētisko analīzi un tuvradniecīgu gumiņbaktēriju celmu ģenētisko salīdzināšanu, izveidoja filoģenētiskos kokus atsevišķi katrai no proteobaktēriju klasēm. Sazarojumu vietās norādītas butstrapa (*bootstrap*) metodes analīzes vērtības – ja vērtība lielāka par 70%, tas norāda uz to, ka klasteri ir būtiski atšķirīgi. Savukārt attālums starp zariem norāda uz celmu ģenētisko līdzību – jo tie ir īsāki, jo ģenētiski līdzīgāki ir genotipi.



3.2. att. Pilna 16S rRNS gēna filoģenētiskais koks

Filoģenētiskais koks norāda uz kopējo no tauriņziežu gumiņiem izdalīto un identificēto baktēriju daudzveidību Latvijā. Filoģenētiskajā analīzē izmantoti reprezentatīvi gumiņbaktēriju celmu genotipi. Filoģenētiskais koks veidots pēc *Neighbour Joining* filoģenētiskās dendrogrammas konstrukcijas metodes.

Filoģenētiskajā analīzē gumiņbaktēriju celmi, kas identificēti kā pie **α-proteobaktēriju klases** (3.3. att.) piederīgi, izveido dendrogrammu, kurā var izdalīt 11 mazākus klasterus. **Klasterī I** atrodas tikai divi gumiņbaktēriju celmi – abi izdalīti 2016. gadā

un abi identificēti kā *Rhizobium leguminosarum*: RV01401 (saimniekaugs lauka pupas, izdalīts Rēzeknes nov.) un RVi00501 (saimniekaugs vanagu vīķis, izdalīts Priekuļos). **Klasteris II** ietver trīs genotipus (RhSP06, RhSP05 un RhSP07). Visi šī klastera genotipi ietver gan vēsturiskās gumiņbaktēriju kolekcijas, gan jaunizdalītos baktēriju celmus. Šajā klasterī aptverti skaitliski visvairāk vēsturiskās gumiņbaktēriju kolekcijas celmi, salīdzinājumā ar pārējiem klasteriem. Starp šī klastera genotipiem dendrogrammas zaru garums ir salīdzinoši lielāks, kas norāda uz lielāku evolucionāro attālumu starp šiem gumiņbaktēriju celmiem. **RhSP05** genotips ietver **16** *Rhizobium* sp. gumiņbaktēriju celmus, kas izdalīti no plaša spektra tauriņziežiem, laika posmā no 1973. gada līdz 2018. gadam. Šis genotips ietver vairākus gumiņbaktēriju vēsturiskās kolekcijas celmus – “Zi-3” (RP00301, RP00303 un RP00304; izdalīti no zirņiem 2011. gadā Talsu novadā); “501” (RV50104; izdalīts no lauka pupām 1973. gadā Jelgavas novadā); “LP” (RV0001; izdalīts no lauka pupām 2009. gadā Talsu novadā); “LUP2” (RL00501; izdalīts no lupīnām), “G-1” (RG00101; izdalīts no galegas 2008. gadā Igaunijā); “S-2” (RS00201, RS00202; izdalīts no sojas 2014. gadā Talsu novadā). Šis genotips ietver arī jaunizdalītos celmus, izdalītus no lauka pupām, lupīnām, sējas lucernas, vanagnadziņa, āboliņa un baltā amoliņa 2016. un 2018. gadā – Talsu, Priekuļu un Skrīveru novados, kā arī Jelgavā un Jūrmalā. Genotips **RhSP06** ietver septiņus gumiņbaktēriju celmus, kas identificēti kā *Rhizobium* sp. – trīs no tiem ir viena vēsturiskās kolekcijas celma “407” izolāti (izdalīti 1972. gadā Jelgavas novadā no lauka pupām). Divi celmi izdalīti no sējas lucernas (2016. gads, Jelgava), viens celms izdalīts 2016. gadā no zirņiem (Jelgavas novads), savukārt viens no lupīnas 2016. gadā (Olaines nov.). **RhSP07** genotips, evolucionāri vistālākais no pārējiem abiem klastera genotipiem, ietver 13 ģenētiski identiskus *Rhizobium* sp. gumiņbaktēriju celmus, no kuriem tikai divi celmi ir no jauna izdalīti 2016. gadā no āboliņa (Jūrmala; Priekuļu novads). Atlikušie 11 celmi ir vēsturiskās kolekcijas celmi, izdalīti laika posmā no 1963. gada līdz 2015. gadam no pupiņām, lupīnas, lauka pupām, sējas lucernas, galegas, zirņiem, sojas un āboliņa Jelgavā, Talsu un Skrīveru novados. Viens celms (RM24505) iegūts 1972. gadā no “Ļeņingradas kolekcijas”, oriģināli izdalīts Kazahstānā 1960. gadā no sējas lucernas, Latvijā izmantots inokulācijā un izdalīts 1972. gadā.

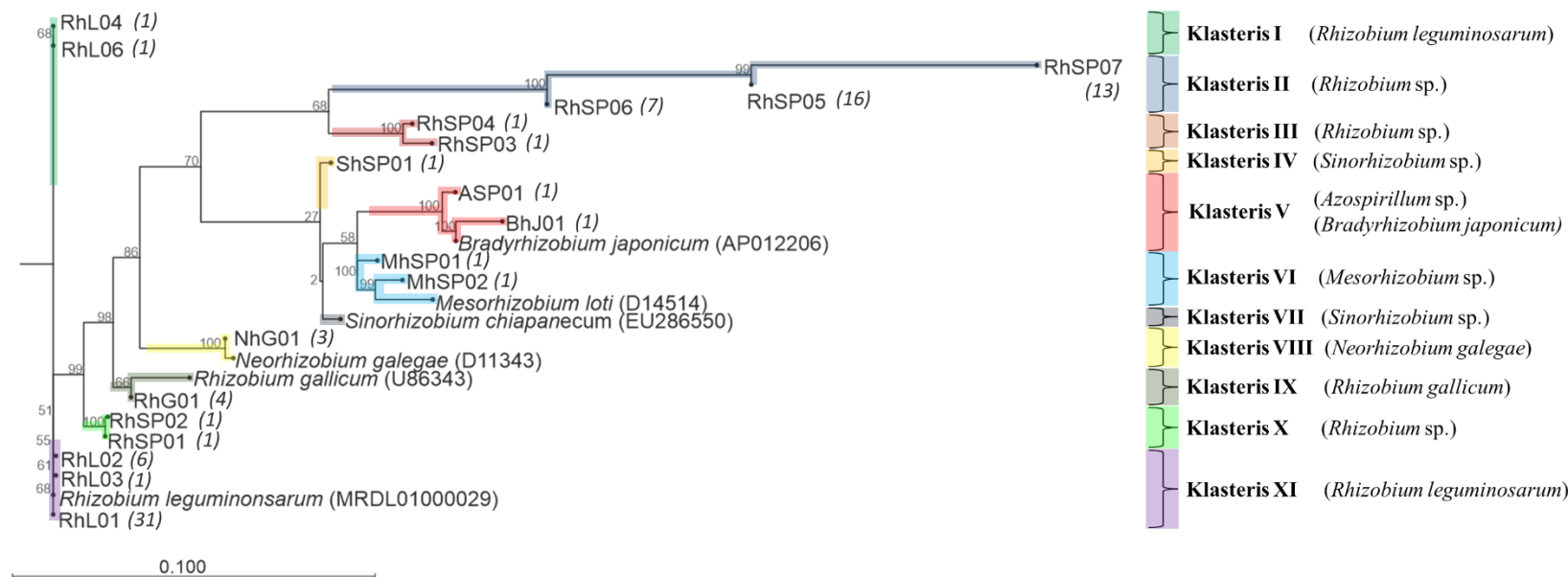
Alfa-proteobaktēriju klases filoģenētiskā koka **klasteris III** ietver divus genotipus – RhSP04 un RhSP03, kas atbilst diviem gumiņbaktēriju celmiem, kas identificēti kā *Rhizobium* sp., izdalīti no sējas lucernas (Jelgava) un pārkonamoliņa (Jūrmala), 2016. gadā. **Klasteris IV** ietver vienu genotipu – ShSP01, kas identificēts kā *Ensifer adhaerens* (100% sekvenču saderība) un *Sinorhizobium* sp. (99% sekvenču līdzība). Šis genotips ietver vienu gumiņbaktēriju celmu, kas izdalīts no vanagnadziņa 2016. gadā Priekuļu novadā. **Klasteris V** ietver divus genotipus – ASP01 un BhJ01, kā arī atsaucē genotipu *Bradyrhizobium japonicum* (AP012206). Šie abi pētījumā ietvertie genotipi, lai gan tuvradnieciski, tomēr uzrāda ģenētiskās atšķirības. ASP01 genotips atbilst vienam vēsturiskajam celmam “422a” (RM24502), kas izdalīts no sējas lucernas, 1972. gadā (“Ļeņingradas kolekcija”) identificēts kā *Azospirillum* sp. Savukārt genotips BhJ01 ietver vienu no sojas izdalītu gumiņbaktēriju celmu. Šis celms (RSBASF/S) identificēts kā *Bradyrhizobium japonicum*, izdalīts 2019. gadā Durbes novadā, no lauka izmēģinājuma, kurā sojas pupas pirms sēšanas apstrādātas ar BASF firmas *HiStick*® *Soybean* gumiņbaktēriju preparātu (Petrēvics, 2021). **Klasteris VI** ietver divus genotipus – MhSP01 un MhSP02, kā arī atsaucē gumiņbaktēriju celmu *Mesorhizobium loti* (D14514). Abi pētāmie genotipi katrs atbilst vienam gumiņbaktēriju celmam – abi šie celmi izdalīti no sojas 2018. gadā Priekuļu un Skrīveru novados. **Klasteris VIII** ietver atsaucē celmu *Neorhizobium galegae* (D11343) un **NhG01** genotipu. NhG01 ietver trīs gumiņbaktēriju celmus, kas identificēti kā *Neorhizobium galegae*, visi izdalīti no galegas, 2016. Rēzeknes novadā un 2018. gadā Skrīveru novadā. **Klasteris IX** ietver divus genotipus – **RhG01** un atsaucē paraugu *Rhizobium gallicum* (U86343). RhG01 genotips atbilst četriem gumiņbaktēriju celmiem, kas identificēti kā *Rhizobium gallicum*, atbilstoši filoģenētiskajai radniecībai ar atsaucē celmu.

Divi no celmiem izdalīti no āboliņa (*Trifolium* sp; 2016. g. un 2018. gads, Tukuma un Skrīveru novadi), viens celms izdalīts no lupīnas (*Lupinus angustifolius*; 2016. g., Talsu novads) un viens – no sojas (*Glycine max*; 2018. g., Skrīveru novads).

Klastera X genotips **RhSP01** atbilst vienam gumiņbaktēriju celmam, kas identificēts gan kā *Rhizobium* sp., gan *Bradyrhizobium* sp., kā arī kā *Rhizobium leguminosarum* – ar vienādu ticamību (99% sekvenču līdzība). Šis celms izdalīts 2016. gadā no lupīnām Olaines novadā. Arī **RhSP02** genotips atbilst vienam paraugam, kas, lai gan ģenētiski atšķiras no RhSP01, arī identificēts kā *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., gan kā *R. leguminosarum* ar 99% sekvenču līdzību. Šis gumiņbaktēriju paraugs izdalīts Talsu novadā no lauka pupām arī 2016. gadā.

Klasteris XI apvieno trīs pētāmos genotipus – RhL01, RhL02, RhL03, kā arī atsaucis paraugu *Rhizobium leguminosarum* (MRDL01000029). Visi šī klastera paraugi identificēti kā *R. leguminosarum*, balstoties uz 16S rRNS pilna gēna sekvenci. **RhL01** ir visvairāk pārstāvētais genotips – tas ietver 31 gumiņbaktēriju celmu, izdalīti no plaša spektra saimniekaugiem. Šis genotips NCBI GenBank datubāzē identificēts kā *R. leguminosarum* bv. *trifolii* un *R. leguminosarum* bv. *viciae* ar vienlīdz lielu ticamību – 100% sekvenču līdzība. Šī genotipa celmi izdalīti 2016., 2018. un 2019. gadā (saimniekaugi – zirņi, lauka pupas, pļavas dedestīna, vanagnadziņš, dārza pupiņas, sējas lucerna, lopbarības pupas, āboliņš un lauku blaktene). Šie gumiņbaktēriju celmi izdalīti no dažādām teritorijām Latvijā – Tukuma nov., Rēzeknes nov., Priekuļu nov., Talsu nov., Jelgava, Jūrmala, Grobiņas nov., Krustpils nov., Skrīveru nov., kā arī Lietuvā, kur sēklu apstrādē izmantoti LBTU kolekcijas baktēriju celmi. Genotips **RhL02** apvieno sešus gumiņbaktēriju celmus, visi identificēti kā *R. leguminosarum* bv. *viciae* (100% sekvenču sakritība) un *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (99% sekvenču sakritība). Atšķirībā no RhL01 genotipa, kurš aptvert tikai jaunizdalītos celmus, šo genotipu pārstāv gan vēsturiskās kolekcijas celma “23” izolāti (RP023Y, RP02301 un RP023Z; saimniekaugs – zirņi; Dobeles nov., 1964. gads), gan 2016. gadā izdalītie celmi – izdalīti Rēzeknes novadā (*Pisum sativum*) un Jūrmalā (saimniekaugs – āboliņš). Trešais **XI** klastera genotips **RhL03** atbilst vienam gumiņbaktēriju celmam, kas identificēts kā *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, izdalīts no sējas vīķa, 2016. gadā Tukuma novadā.

Gumiņbaktēriju celmi, kas filoģenētiskajā analīzē identificēti kā **β-proteobaktēriju klasei** (3.4. att.) piederīgi, veido dendrogrammu, kuru var izdalīt 5 dažādos klasteros. Kopumā 14 baktēriju celmi identificēti kā β-proteobaktēriju klasei piederīgi (*Burkholderia* sp. un *Paraburkholderia* sp.), izdalīti no sojas (8 celmi), lauka pupām (5 celmi), kā arī viens celms izdalīts no lucernas, laika posmā no 2016. līdz 2019. gadam. **Klasteris I** iekļauj vienu genotipu **Pb03**, kurš atbilst diviem gumiņbaktēriju celmiem – abi izdalīti no sojas gumiņiem 2018. un 2019. gadā. **Klasteris II** ietver atsaucis celmu *Paraburkholderia nodosa* (AM284971) un genotipu **BSP07**, kas identificēts kā *Burkholderia* sp. Šis gumiņbaktēriju celms RS2030/19 izdalīts 2019. gadā veģetācijas trauku izmēģinājumā, kurā sojas sēklu apstrādei izmantots celms RS2030, kas savukārt identificēts kā *Mesorhizobium* sp. (3.2. tabula). **Klasteris III** ietver atsaucis baktēriju celmu *Paraburkholderia caledonica* (BAYE01000050) un genotipu **PbC01**, kas arī identificēts kā *Paraburkholderia caledonica*. PbC01 genotips atbilst vienam gumiņbaktēriju celmam, kas izdalīts no lauka pupu gumiņiem 2019. gadā. **Klasteris IV** ietver trīs ģenētiski atšķirīgus genotipus, kuri visi identificēti kā *Burkholderia* sp.: **BSP06** un **BSP05** genotipi katrs atbilst vienam gumiņbaktēriju celmam, kas izdalīts no sojas 2018. gadā Priekuļos; **BSP04** genotips atbilst trīs gumiņbaktēriju celmiem – visi izdalīti viena lauka izmēģinājuma ietvaros no lauka pupām 2019. gadā Grobiņas novadā. **Klasteris V** atbilst atsaucis celmam *Paraburkholderia terricola* (AY040362) un trīs genotipiem, kas arī identificēti kā *Paraburkholderia terricola*: **PbT01** genotips ietver trīs gumiņbaktēriju celmus, kas izdalīti no sojas. Divi no šiem celmiem izdalīti 2018. gadā Priekuļu novadā. Viens no šiem gumiņbaktēriju celmiem (RS2041) izmantots sojas sēklu apstrādei veģetācijas trauku



3.3. att. Alfa-proteobaktēriju pilna 16S rRNS gēna filoģenētiskais koks

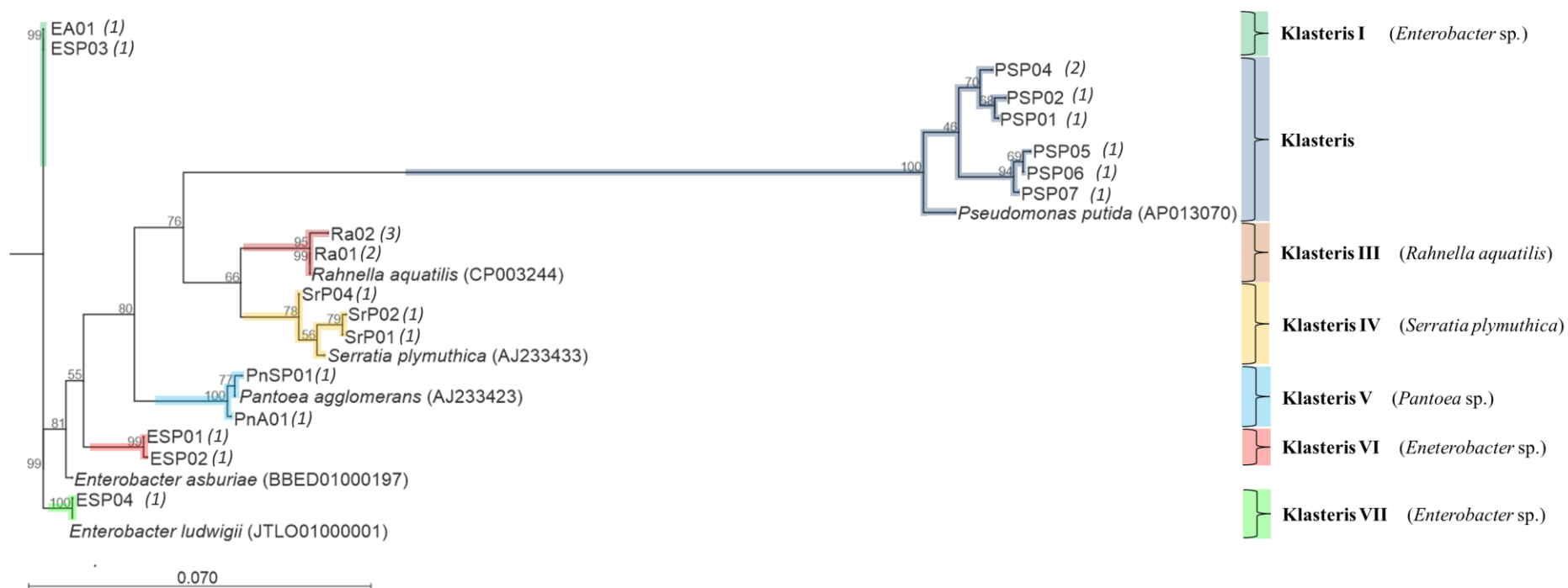
Filoģenētiskais koks veidots, izmantojot *Neighbour Joining* filoģenētiskās dendrogrammas konstrukcijas metodi. Butstrapa (*bootstrap*) metodes analīzes vērtības, kas $\geq 70\%$, norādītas mezglos, un uzrāda filoģenētiskā koka zarojuma ticamību. Atsauces paraugu genotipu GenBank piešķirtie kodi norādīti iekavās. Iekavās kursīvā norādīts genotipa identisko celmu skaits. Mēroga skala norāda nukleotīdu substitūciju skaitu pozīcijā.

izmēģinājumā 2019. gadā Jelgavā. Šajā izmēģinājumā izdalītā sojas gumiņbaktēriju celma RS2041/19 un inokulācijai izmantotā celma RS2041 16S rRNS gēnu sekvences ir identiskas. Genotips **PbT02** atbilst vienam gumiņbaktēriju celmam, kas izdalīts 2016. gadā no lucernas. Savukārt genotips **PbT04** atbilst vienam gumiņbaktēriju celmam, kas izdalīts no lauka pupām 2016. gadā Talsu novadā.

Baktēriju celmi, kas identificēti kā **γ -proteobaktēriju** klasei piederoši, izveidotajā filoģenētiskajā kokā (3.5. att.) izkārtoti septiņos klasteros. Kopumā 28 baktēriju celmi identificēti kā *Enterobacter* sp. (t.sk. *E. asburiae* un *E. ludwigii*), *Pseudomonas* sp. (t.sk. *P. frederiksbergensis*), *Rahnella aquatillis*, *Serratia plymuthica* un *Pantoea agglomerans*. Visi šīs klases pārstāvētie celmi ir izdalīti laika posmā no 2016. līdz 2019. gadam. Šie celmi izdalīti no plaša saimniekaugu spektra, tomēr visbiežāk pārstāvētais saimniekaugs ir soja, no kuras kopumā izdalīti astoņi γ -proteobaktēriju klases celmi. **Klasteris I** ietver divus genotipus – **EA01**, kas identificēts kā *Enterobacter asburiae*, un **ESP03**, kas identificēti kā *Enterobacter* sp. Katrs no šiem genotipiem atbilst vienam gumiņbaktēriju celmam, kas izdalīti no sojas 2019. gadā. **Klasteris II** apvieno sešus dažādus genotipus, un ietver vienu atsaucē celmu *Pseudomonas putida* (AP013070). Šajā klasterī var izšķirt divus apakšklasterus, kuri katrs ietver 3 tuvradnieciskus (bet ne identiskus) genotipus. Viens apakšklasteris apvieno genotipus **PSP04**, **PSP02** un **PSP01**. Genotips PSP04 ietver divus gumiņbaktēriju celmus, abi identificēti kā *Pseudomonas* sp; viens izdalīts no āboliņa 2016. gadā, Priekuļu novadā, otrs – no sojas 2018. gadā, Skrīveru novadā. Genotips PSP02 atbilst gumiņbaktēriju celmam, kas izdalīts no amoliņa 2018. gadā, Skrīveru novadā, identificēts kā *Pseudomonas frederiksbergensis*. Savukārt PSP01 genotips atbilst gumiņbaktēriju celmam, kas identificēts kā *Pseudomonas* sp., izdalīts 2018. gadā no sējas lucernas Skrīveru novadā. Otrs apakšklasteris ietver trīs genotipus – **PSP05**, **PSP06** un **PSP07**, visi identificēti kā *Pseudomonas* sp. Katrs no šiem genotipiem atbilst vienam gumiņbaktēriju celmam, kuri izdalīti no āboliņa (2016. g., Rēzeknes nov.), vanagu vīķa (2016. g., Rēzeknes nov.) un sojas (2016. g., Tukuma novads).

Gamma-proteobaktēriju filoģenētiskā koka **klasteris III** ietver atsaucē celmu *Rahnella aquatillis* (CP003244) un genotipus **Ra02** un **Ra01**. Genotips Ra02 atbilst trīs baktēriju celmiem – divi no tiem izdalīti no viena izmēģinājuma lauka Jelgavas novadā 2018. gadā no zirņiem (*Pisum sativum*), savukārt viens – no lucernas (*Medicago sativa*) 2018. gadā Skrīveru novadā. Genotips Ra01 ietver divus gumiņbaktēriju celmus, kas izdalīti no lauka pupām – 2016. gadā Rēzeknes novadā un 2019. gadā Grobiņas novadā. **Klasteris IV** apvienoti trīs genotipi un atsaucē celms *Serratia plymuthica* (AJ233433). Klastera IV genotipi **SrP04** un **SrP02** atbilst gumiņbaktēriju celmiem RL00701/2 un RL00801, kas izdalīti no lupīnām 2016. gadā Talsu novadā. Genotips **SrP01** atbilst baktēriju celmam, kas izdalīts no lauka pupām 2019. gadā Grobiņas novadā. **Klasteris V** ietver atsaucē celmu *Pantoea agglomerans* (AJ233423) un divus genotipus – **PnSP01** un **PnA01**. PnSP01 atbilst baktēriju celmam, kas identificēts kā *Pantoea agglomerans*, izdalīts no amoliņa 2018. gadā Skrīveru novadā. PnA01 genotips atbilst vienam celmam, kas izdalīts no sojas 2019. gadā Priekuļu novadā. **Klasteris VI** ietver divus genotipus, kas identificēti kā *Enterobacter* sp. – **ESP01** un **ESP02**. Katrs no šiem genotipiem atbilst vienam baktēriju celmam. Abi šie celmi izdalīti no sojas 2019. gadā Olaines novadā. **Klasteris VII** ietver atsaucē celmu *Enterobacter ludwigii* (JTLO01000001) un vienu genotipu – **ESP04**, kas izdalīts no sojas 2019. gadā Durbes novadā.

Vēl nesen tikai gumiņbaktērijas, kas identificētas, kā α -proteobaktēriju klasei piederošas, tika uzskatītas par simbiotiskajām baktērijām, kas veido gumiņus uz tauriņziežu saknēm un saista slāpekli. Arī šajā pētījumā 65% no visiem identificētajiem baktēriju celmiem pieder α -proteobaktēriju klasei. Tomēr kopējā baktēriju daudzveidība ir lielāka, nekā sākotnēji gaidīts – identificētie baktēriju celmi pieder pie α -, β -, un γ -proteobacteria, kā arī *Bacilli* klasēm (3.2. tabula). Aizvien vairāk pētījumos, kuros nosaka gumiņbaktēriju daudzveidību, novēro līdzīgu daudzveidību, kāda identificēta šajā pētījumā. Bieži šādos gadījumos baktērijas iedala



3.5. att. Gamma-proteobaktēriju pilna 16S rRNS gēna filoģenētiskais koks

Filoģenētiskais koks veidots izmantojot *Neighbour Joining* filoģenētiskās dendrogrammas konstrukcijas metodi. Butstrapa (*bootstrap*) metodes analīzes vērtības, kas ≥ 70 , norādītas mezglos, uzrāda filoģenētiskā koka zarojuma ticamību. Atsauces paraugu genotipu GenBank piešķirtie kodi norādīti iekavās. Iekavās kursīvā norādīts genotipa identisko celmu skaits. Mēroga skala norāda nukleotīdu substitūciju skaitu pozīcijā.

gumiņbaktērijās un endofītiskajās baktērijās, kas netiek pieskaitītas pie gumiņbaktērijām (“*non-rhizobia endophytes*”) (Rahal, Chekireb, 2021). Tas savukārt liecina par to, ka baktēriju un tauriņziežu simbiotiskās attiecības ir plašāks fenomens, kā uzskatīts iepriekš (Moulin et al., 2001). Gumiņbaktēriju grupas papildināšana ar β -proteobaktēriju klases celmiem ir salīdzinoši jauns atklājums (kopš 2000. gadu sākuma), salīdzinājumā ar vairāk nekā simts gadus ilgiem gumiņbaktēriju pētījumiem. Šie atklājumi apgāza ilgi pastāvošo pārliecību, ka tikai α -proteobaktēriju klases gumiņbaktērijas spēj veidot gumiņus uz tauriņziežu saknēm (Chen et al., 2003). Turklāt līdz 2000. gadam *Burkholderia* ģints baktērijas (β -proteobaktēriju klase) uzskatīja par patogēnām ne tikai par augiem, bet arī dzīvniekiem un cilvēkiem. Tāpēc atklājums, ka šīs ģints baktērijas ir potenciālas gumiņbaktērijas, bija pārsteidzošs (Bontemps et al., 2010; Chen et al., 2003; Moulin et al., 2001), izvirzot nākamo jautājumu – vai simbiotiskās attiecības starp tauriņziežiem un β -proteobaktērijām ir ārkārtīgi reta, vai arī līdz šim neievērota salīdzinoši bieža parādība (Chen et al., 2003). Šie atklājumi izmainīja zinātnieku skatījumu uz tauriņziežu-gumiņbaktēriju simbiotiskajām attiecībām, paplašinot izpratni par šīm augu augšanu uzlabojošajām baktēriju sugām, un veicot aizvien jaunus pētījumus, lai uzlabotu slāpekļa saistīšanas efektivitāti un uzlabotu tauriņziežu augšanu (Angus, Hirsch, 2010). Tomēr fakts, ka salīdzinoši nesenā pārskata publikācijā (Chen et al., 2020) par gumiņbaktēriju klasifikāciju, baktērijas no β -proteobaktēriju klases tika minētas kā **potenciālas** slāpekli-saistošas baktērijas, atsaucoties uz **2010.** gada pētījumu (Shiraishi, Matsushita, Hougetsu, 2010), norāda uz pētījumu trūkumu par šo tēmu.

Zināms, ka spēja pārveidot atmosfēras slāpekli (N_2) amonjakā (NH_3), kā arī veidot simbiotiskas attiecības ar tauriņziežiem, piemīt ne tikai gumiņbaktērijām, bet arī citām endofītiskajām baktērijām, piemēram, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Burkholderia* un *Azospirillum* (Mora et al., 2014; Naveed et al., 2015; Perez-Montano et al., 2014; Zahran, 1999). Baktērijas, kas pieder *Pantoea* (tajā skaitā *P. agglomerans*, identificēts arī šajā pētījumā), *Enterobacter*, *Paenibacillus* un *Pseudomonas* ģintīm, iepriekš ir izdalītas no tauriņziežu gumiņiem (Lorenzi et al., 2022; Martinez-Hidalgo, 2017). Pētījumā novērots, ka *Serratia* sp. kopā ar gumiņbaktērijām uzlabo spējas veidot gumiņus uz tauriņziežu saknēm, uzrādot lielāku gumiņu skaitu, kā arī palielinātu gumiņu izmēru, uzlabojot tauriņziežu biomasu un sakņu sistēmu (Naveed et al., 2015). Iepriekšminētās baktēriju ģintis identificētas arī starp šī pētījuma kolekcijas baktēriju celmiem – *Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus peoriae*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter asburiae*, *Pseudomonas frederiksbergensis*, *Serratia plymuthica* un *Azospirillum* sp. (3.2. tabula).

Daudzas no šīm baktērijām pētījumos uzrādījušas augu augšanu un attīstību uzlabojošas īpašības, šķīdinot augsnē esošā fosforā rezerves, pārvēršot fosforā savienojumus augam uzņemamā formā. Baktērijas no *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Rahnella* (ieskaitot *R. aquatilis*), *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Enterobacter* ģintīm un īpaši *Pseudomonas* spp. ir iepriekš uzrādījušas augsnē esošo fosforā savienojumu šķīdinošas īpašības (Kim, Jordan, Krishnan, 1997; Saidi et al., 2013; Shoenitz et al., 2009; Timofeeva, Sedykh, 2022; Zineb et al., 2019). Baktēriju celmi no šīm ģintīm, kas uzrāda fosforā savienojumu šķīdinošas īpašības, identificētas arī šajā pētījumā (3.2. tabula). Novērots, ka papildinot gumiņbaktēriju ar kādu no *Pseudomonas* ģints celmiem (*P. striata*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. trivialis*, *P. maltophilia*, *P. jessenii*), tiek uzlabota gumiņu veidošanās efektivitāte, palielinot sakņu/virszemes daļas augšanu un ražu, kā arī uzlabojot nitrogenāzes aktivitāti un slāpekļa saistīšanas efektivitāti (Naveed et al., 2015). Šajā pētījumā lielākā daļa baktēriju celmi, kas identificēti kā *Pseudomonas* sp., identificēti ģints līmenī, izņemot *P. frederiksbergensis*, kas izdalīts no *Melilotus officinalis* (3.1., 3.2. tabulas).

Enterobacter ludwigii (γ -proteobaktērijas) baktēriju suga, kas šajā pētījumā izdalīta no sojas (3.2. tabula), iepriekš uzrādījusi spējas šķīdināt kalcija trifosfātu, uzlabojot *Lolium perenne* virszemes daļas masu un augu augstumu, kā arī palielinot sakņu sistēmu par 50%

(Shoebitz et al., 2009). Inokulācijas preparāts, kurā gumiņbaktērijas papildinātas ar *Enterobacter* sp., uzlabo gumiņu veidošanos, kā arī palielina ražu (Naveed et al., 2015). Turklāt *in vitro* izmēģinājumos *E. ludwigii* celms uzrādījis spēju inhibēt *Fusarium solani*, kas var ierosināt dīgstu un sakņu puvi, micēlija augšanu arī bez tieša kontakta, norādot uz to, ka inhibējošo efektu nodrošina baktēriju celma vielmaiņas produkti, norādot uz šī celma potenciālu izmantošanu ne tikai augu augšanu uzlabošanā, bet arī augu aizsardzībā (Shoebitz et al., 2009).

Gumiņbaktēriju grupas papildināšana ar γ -proteobaktēriju, un daudzos gadījumos arī β -proteobaktēriju celmiem, vēl joprojām nav viennozīmīga. Baktēriju celmi, kas identificēti kā γ -proteobaktērijas, ir iepriekš izdalīti no tauriņziežu gumiņiem (Benhizia et al., 2004). Pētījumā, kurā pārbaudīja gan β - gan γ -proteobaktēriju spēja veidot gumiņus uz baltās robīnijas (*Robina pseudoacacia*) saknēm, no gumiņiem izdalīti *Burkholderia* sp. (β -proteobaktērijas), *Pseudomonas* sp. (γ -proteobaktērijas), kā arī *Paenibacillus* sp. (*Bacilli*) celmi. Novērots, ka *Paenibacillus* sp. celms, kas izdalīts no virsmas sterilizētiem gumiņiem, nespēj veidot gumiņus, norādot uz to, ka šis ir endofītisks celms, kas atradies citu gumiņbaktēriju izveidotajā gumiņā (Shiraishi, Matsushita, Hougetsu, 2010). Arī šajā pētījumā izdalītie septiņi *Paenibacillus* sp. celmi varētu būt endofītiskie celmi, izdalīti no gumiņiem, kurus izveidojuši baktēriju celmi no α -, β -, vai iespējams γ -proteobaktēriju klasēm. Visi celmi, kas identificēti kā *Paenibacillus* sp. bija LBTU vēsturiskās gumiņbaktēriju kolekcijas celmi. Lai gan šo celmu taksonomiskā piederība, izmantojot molekulārās bioloģijas metodes, līdz šim brīdim nebija veikta, visu šo kolekcijas celmu slāpekļa saistīšanas spējas ir iepriekš pārbaudītas, novērtējot to ietekmi uz ražas kvalitāti un kvantitāti. Turklāt pat, ja šie *Paenibacillus* sp. celmi nespēj paši veidot gumiņus uz tauriņziežu saknēm, ir pamats uzskatīt, ka šiem celmiem piemīt augu augšanu uzlabojošas īpašības, balstoties uz citu zinātnieku pētījumu rezultātiem, kuros pierādīta šīs ģints labvēlīgā ietekme uz augu augšanu (Goel, Sindhu, Dadarwal, 2002; Vessey, 2003; Timmusk, Grantcharova, Wagner, 2005), tajā skaitā spēja saistīt atmosfēras slāpekli (Perez-Montano et al., 2014). Tāpēc nākotnē jāveic izmēģinājumi, kuros novērtētu *Paenibacillus* sp. ietekmi uz tauriņziežu augšanu mijiedarbībā ar gumiņbaktērijām. Pretstatā *Paenibacillus* sp., iepriekšminētajā Shiraishi et al. (2010) pētījumā *Burkholderia* sp. un *Pseudomonas* sp. spēja veidot gumiņus uz *R. pseudoacacia* saknēm. DNS sekvencēšanas rezultātā atklāts, ka *Burkholderia* sp. un *Pseudomonas* sp. celmu genomi satur simbiotiskos gēnus, kas nepieciešami, lai izveidotu gumiņus un saistītu atmosfēras slāpekli – *nodA*, *nodC*, *nifH* un *nifHD*. Turklāt novērota šo gēnu ģenētiskā līdzība ar α -proteobaktēriju celmu simbiotiskajiem gēniem (Chen et al., 2003; Minamisawa et al., 2002; Moulin et al., 2001; Shiraishi, Matsushita, Hougetsu, 2010). Pārsteidzošs ir fakts, ka ģenētiskais attālums starp α - un β -proteobaktēriju celmu nodulācijas gēniem ir mazāks nekā ģenētiskais attālums starp šo pašu baktēriju celmu 16S rRNS gēniem. Papildus nodulācijas gēniem, kas nepieciešami gumiņu veidošanās procesam, β -proteobaktērijas satur arī slāpekļa saistīšanas (*nif*) gēnus. Novērots, ka šie gēni ir ģenētiski līdzīgi α -proteobaktēriju *nif* gēniem, norādot uz horizontālo gēnu pārnesi starp šīm baktēriju klasēm. Filoģenētiskās analīzes, kuras uzrāda β -proteobaktēriju dendrogrammas dziļu sazarojumu, norāda drīzāk uz ilgu un neatkarīgu šo gēnu evolūcijas attīstību, nekā nesenu gēnu pārnesi no α -proteobaktēriju klases. Tiek lēsts, ka šī gēnu pārnese notikusi apmēram pirms 70 miljoniem gadu (Bontemps et al., 2010; Chen et al., 2003; Moulin et al., 2001).

Pateicoties baktēriju daudzveidībai (α -, β -, γ -proteobacteria, *Bacilli*), gumiņus var uzskatīt par unikālu ekoloģisko nišu, kas dod “mājvietu” plašam spektram saderīgu mikroorganismu (De Meyer et al., 2015; Saidi et al., 2013). Tas norāda uz to, ka tauriņziežu inokulācijā būtu jāizmanto ne tikai α -proteobaktērijas, bet būtu jāiekļauj arī baktēriju celmi no dažādām, savstarpēji saderīgām, baktēriju klasēm (Kawaka et al., 2018). Tomēr vēl joprojām trūkst zinātniskās vienprātības šajā sakarā. Daļa zinātnieku baktērijas, kas nav α -

proteobaktēriju klases gumiņbaktērijas, uzskata par kontamināciju (Koskey et al., 2018; Simon et al., 2014). Tāpēc nepieciešama turpmāka izpēte, lai pārbaudītu šāda veida preparātu efektivitāti. Turpmākajos pētījumos būtu jāveic tauriņziežu inokulācija ar identificētajiem baktēriju celmiem, lai noteiktu, vai šie celmi paši spēj veidot gumiņus, vai arī tie bijuši endofītiski celmi gumiņos, kurus izveidojušas kādas citas gumiņbaktērijas. Gumiņu veidošanas potenciālu tālākos pētījumos varētu noteikt arī veicot *nod* un *nif* gēnu amplifikāciju, un veikt šo gēnu sekvenču salīdzināšana ar α -proteobaktēriju celmu *nod* un *nif* gēniem, lai pārbaudītu horizontālo gēnu pārnesei rizosfērā starp šo klašu celmiem.

3.2.3. *Izmaiņas gumiņbaktēriju daudzveidībā laika gaitā*

Šajā pētījumā baktēriju celmi, kas izdalīti no dažādu tauriņziežu gumiņiem, pieder pie četrām klasēm – α -, β - un γ -proteobacteria, kā arī *Bacilli*. Tā kā baktēriju celmi, kurus iekļāva šajā pētījumā, bija gan no jauna izdalīti celmi, gan vēsturiskās gumiņbaktēriju kolekcijas celmi, tika pārbaudīts, vai starp šiem celmiem, kas izdalīti laika posmā no 1962. līdz 2019. gadam, varētu novērot daudzveidības atšķirības. Uz šādām iespējamām izmaiņām, kas var veidoties laika gaitā – klimata pārmaiņu, kā arī dažādu lauksaimniecībā pielietoto metožu izmaiņu rezultātā, norāda dažādi literatūras avoti (Pongslip, 2012; Sessitsch et al., 2002). Rezultāti, kas iegūti α -proteobaktēriju klases gadījumā, neuzrāda pārliecinošus pierādījumus šādām daudzveidības atšķirībām starp vēsturiskajiem un jaunizdalītajiem baktēriju celmiem. Novērots, ka lielākā daļa α -proteobaktēriju filoģenētiskā koka klasteri satur gan vēsturiskās kolekcijas celmus, gan jaunizdalītos celmus (3.3. att.). Piemēram, α -proteobaktēriju klasteris II ietver visvairāk vēsturiskās kolekcijas celmu, tomēr šī klastera genotipi apvieno gan vēsturiskās kolekcijas, gan jaunizdalītos celmus. Tomēr, skatoties genotipu līmenī, ir atsevišķi genotipi, kas atbilst tikai vēsturiskās kolekcijas celmiem, piemēram, RhSP09 un ASP01.

Visi septiņi *Paenibacillus* sp. celmi ir vēsturiskās gumiņbaktēriju kolekcijas celmi. Savukārt neviens no vēsturiskās kolekcijas celmiem netika identificēts kā β - vai γ -proteobaktēriju klasei piederošs. Šo proteobaktēriju klašu celmu neesamība vēsturiskajā kolekcijā varētu būt saistīta ar baktēriju fenotipiskajām īpašībām, ņemot vērā, ka šajā laika periodā baktēriju celmus identificēja tikai pēc to fenotipa, un kolekcijā ir tikai tie celmi, kas izturējuši veģetācijas trauku un/vai lauka izmēģinājumus, pierādot tajos savu efektivitāti gumiņu veidošanā un slāpekļa saistīšanā. Arī izmantotajām barotnēm, baktēriju kultivēšanai, varētu būtu selektīva ietekme. Vēsturiskās kolekcijas baktērijas sākotnēji izdalītas un uzglabātas, izmantojot balto pupiņu un pelēko zirņu barotnes, nevis YMA barotnes, kuras izmantoja šajā pētījumā. Šie varētu būt iespējamie iemesli tam, ka baktēriju celmi, kas izdalīti Latvijā laika posmā no 2016. līdz 2019. gadam, uzrāda lielāku daudzveidību visās trīs – α -, β - un γ -proteobaktēriju klasēs.

3.2.4. *Saimniekaugi un identificēto baktēriju specifiskums*

Lai noteiktu saimniekaugu un identificēto baktēriju specifiskumu, izvērtēta no konkrētā saimniekauga gumiņiem izdalīto baktēriju daudzveidība (3.3. tabula; 3.6. att.; 3.7. att.). No lauka pupām (*Vicia faba*) izdalīto baktēriju celmu skaits, kas identificēts ar molekulārās ģenētikas metodēm: 35 (3.3. tabula), no kuriem 20 celmus identificēja kā *Rhizobium* sp. ģintij piederoši. No šiem celmiem 10 pieder pie genotipa RhL01 (*Rhizobium leguminosarum*; 3.2. tabula) – visi šie celmi ir no jauna izdalītie (2016. – 2019.) kolekcijas gumiņbaktēriju celmi. Viens no celmiem (RV00701), kas identificēts kā *Rhizobium leguminosarum*, ar tik pat lielu ticamību identificēts kā *Bradyrhizobium* sp. ģintij piederošs. Divas no filoģenētiskajām grupām

(RhSP06 un RhSP07) ietver tikai vēsturiskos gumiņbaktēriju celmus, izdalītus 1972. un 1973. gadā. Visi vēsturiskās kolekcijas celmi “407” (RV40703, RV40704 un RV40705) uzrāda identiskas 16S rRNS gēna sekvences. Savukārt, filoģenētiskā grupa RhSP05 apvieno gumiņbaktēriju celmus, kas izdalīti laika posmā no 1973. – 2016. gadam. No *V. faba* izdalītie celmi identificēti arī kā *Rahnella aquatilis* (2 celmi), *Serratia plymuthica* (2 celmi), *Pantoea agglomerans* (1 celms), *Achromobacter* sp. (1 celms), *Paenibacillus* sp. (2 celmi), *Paraburkholderia* sp. (2 celmi) un *Burkholderia* sp. (3 celmi). Visi baktēriju celmi, kas identificēti kā *Burkholderia* sp., izdalīti no viena izmēģinājuma lauka. Visi baktēriju celmi, kas nepieder pie α -proteobaktēriju klases ģintīm, ir baktēriju celmi, kas izdalīti laika posmā no 2016. – 2019. gadam. Izņēmums ir viens celms (RV06902), kas izdalīts 1970. gadā un ticis identificēts kā *Paenibacillus polymyxa*.

No sojas (*Glycine max*) izdalīto baktēriju celmu skaits, kas identificēti ar molekulārās ģenētikas metodēm: 26 (3.3. tabula). Deviņi no šiem identificētajiem celmiem pieder α -proteobaktēriju klasei. 2014. gadā no sojas izdalītie gumiņbaktēriju celmi [S-2] un [S-3] identificēti kā *Rhizobium* sp. No [S-2] celma izdalītie izolāti uzrādīja ģenētiski atšķirīgas 16S rRNS gēna sekvences – RS00201 un RS00202 pieder pie RhSP05 filoģenētiskās grupas, savukārt RS00203 un RS00204 – pie RhSP07 grupas. Viens no sojas gumiņbaktēriju celmiem identificēts kā *Rhizobium gallicum*, divi kā *Mesorhizobium* sp. (ar ģenētiski atšķirīgiem 16S rRNS gēniem), un tikai viens celms identificēts kā *Bradyrhizobium japonicum*. Šis celms (RSBASF/S) izdalīts no sojas saknēm lauka izmēģinājumā Durbes novadā. Šajā izmēģinājumā sojas sēklas pirms sēšanas apstrādātas ar BASF firmas *HiStick*[®] Soybean gumiņbaktēriju preparātu. Septiņi no sojas sakņu gumiņiem izdalītie celmi pieder pie β -proteobaktēriju klases. Divi no šiem celmiem identificēti kā *Burkholderia* sp. (abi ģenētiski atšķirīgi viens no otra), savukārt atlikušie četri celmi – *Paraburkholderia terricola*. Vienu no celmiem, kas identificēts

3.3. tabula

Baktēriju daudzveidība biežāk sastopamo saimniekaugu gumiņos

Identificētās baktēriju ģintis	Identificēto baktēriju celmu skaits				
	<i>Vicia faba</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>Trifolium</i> spp.	<i>Medicago</i> spp.
<i>Rhizobium</i> sp.	20	6	15	13	7
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	1	1	0	0	0
<i>Mesorhizobium</i> sp.	0	2	0	0	0
<i>Azospirillum</i> sp.	0	0	0	0	1
<i>Paraburkholderia</i> sp.	2	5	0	0	1
<i>Burkholderia</i> sp.	3	2	0	0	0
<i>Achromobacter</i> sp.	1	0	0	0	0
<i>Rahnella</i> sp.	2	0	2	0	1
<i>Serratia</i> sp.	2	0	0	1	0
<i>Pantoea</i> sp.	1	1	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	2	0	3	1
<i>Enterobacter</i> sp.	0	7	0	0	0
<i>Paenibacillus</i> sp.	2	0	1	0	1
	35	26	18	17	12
0	1–5	6–10	11–15	16–20	

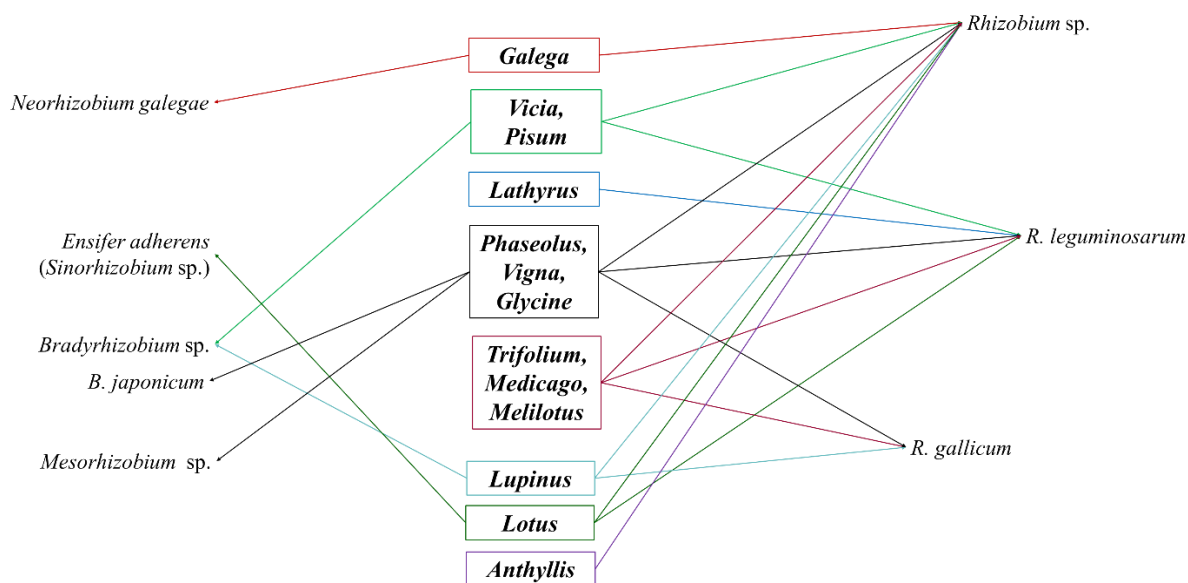
Krāsas spilgtums norāda uz konkrētās baktēriju ģints sastopamības biežumu

kā *Burkholderia* sp. (RS2081), izdalīts 2018. gadā Priekuļos, izmantoja sojas sēklu apstrādei veģetācijas trauku izmēģinājumā 2019. gadā Jelgavā. Šis 2019. gadā izdalītais celms

(RS2081/19) identificēts kā *Paraburkholderia terricola*. Savukārt celms RS2041, izdalīts 2018. gadā Priekuļos, identificēts kā *P. terricola*, izmantots sojas sēklu apstrādei 2019. gadā veģetācijas izmēģinājumā. Arī šis celms (RS2041/19) identificēts kā *P. terricola*. Turklāt abu šo celmu 16S rRNS gēni ir ģenētiski identiski. Atlikušie 10 sojas gumiņbaktēriju celmi pieder pie γ -proteobaktēriju klases. Divi celmi identificēti kā *Pseudomonas* sp. (ģenētiski atšķirīgi), viens kā *Pantoea agglomerans*, un septiņi celmi – *Enterobacter* sp. Visi identificētie *Enterobacter* sp. celmi izdalīti 2019. gadā un ir ģenētiski atšķirīgi.

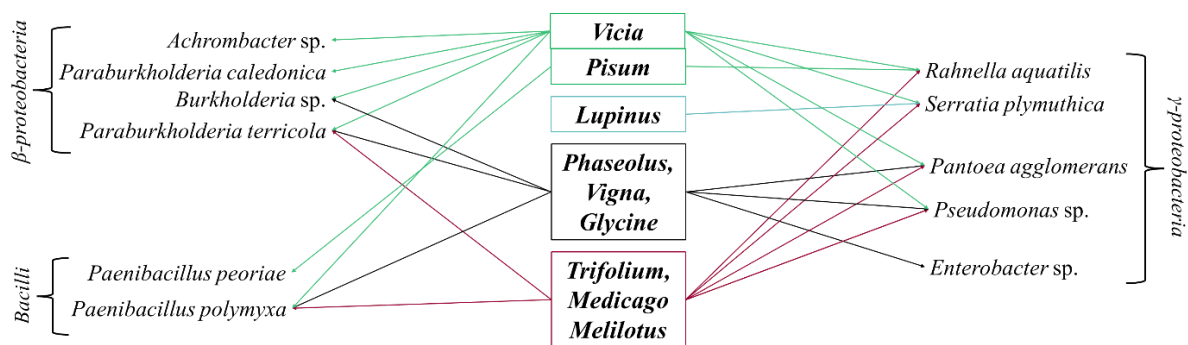
No zirņiem (*Pisum sativum*) izdalīto baktēriju celmu skaits, kas identificēti ar molekulārās ģenētikas metodēm – 18 celmi (3.3. tabula), no kuriem 15 pieder pie *Rhizobium* sp., 2 identificēti kā *Rahnella aquatilis* un viens celms *Paenibacillus peoriae*. Visi vēsturiskās kolekcijas celmi [23] (RP023Y, RP02301 un RP023Z) identificēti kā ģenētiski identiski. Celmi, kas inventarizācijas procesā no oriģinālā celma [Zi-3] sadalīti vairākos celmos, identificēti kā *Rhizobium* sp. Tomēr, lai gan daļa no celmiem uzrāda ģenētiski identiskas 16S rRNS gēna sekvences (RP00301, RP00303 un RP00304), viens no celmiem (RP00302) ir ģenētiski atšķirīgs no pārējiem. Kā *Paenibacillus peoriae* identificēja kolekcijas celmu, kas izdalīts 1964. gadā.

No āboliņa (*Trifolium* sp.) izdalīto baktēriju celmu skaits, kas identificēti ar molekulārās ģenētikas metodēm: 17, no kuriem 13 celmi identificēti kā *Rhizobium* ģintij piederoši. Salīdzinoši daudzi no šiem celmiem uzrāda identiskas 16S rRNS gēna sekvences. Piemēram, RT32603 (vienīgais āboliņa celms no vēsturiskās gumiņbaktēriju kolekcijas, izdalīts 2006. gadā), RT01101 un RT02001 – visi celmi pieder genotipam RhSP07. Genotipam RhL01 (*Rhizobium leguminosarum*) pieder celmi RT00901, RT00501, RT2010 un RT2020 – pēdējie divi izdalīti no viena un tā paša izmēģinājuma lauka (Skrīveru novads). Divi celmi ar identiskām 16S rRNS sekvencēm identificēti kā *Rhizobium gallicum* (RT00801 un RT2050).



3.6. att. Saimniekaugi un to atbilstošie α -proteobacteria baktēriju celmi

Attēla vidū ierāmētas dažādu tauriņziežu ģintis, kuras pārstāv pētījumā iekļautos saimniekaugus. Ar bultām norādītas no saimniekaugiem izdalītās baktēriju sugas.



3.7. att. Saimniekaugi un to atbilstošie β -, γ -proteobacteria un Bacilli baktēriju celmi

Attēla vidū ierāmētas ir dažādu tauriņziežu ģintis, kuras pārstāv pētījumā iekļautos saimniekaugus. Ar bultām norādītas no saimniekaugiem izdalītās baktēriju sugas.

Trīs celmi identificēti kā *Pseudomonas* sp. (visi ģenētiski atšķirīgi). Savukārt viens celms – kā *Serratia plymuthica*.

No lucernas (*Medicago* sp.) izdalīto baktēriju celmu skaits, kas identificēti ar molekulārās ģenētikas metodēm: 12, no kuriem 7 celmi identificēti kā *Rhizobium* sp. Lielākoties šie ir jaunizdalīti celmi, un tikai viens 1962. gadā no lucernas izdalīts celms identificēts kā *Rhizobium* ģintij piederošs. Visi *Rhizobium* sp. celmi ir ģenētiski atšķirīgi, izņemot RM00901 un RM01101, kuru 16S rRNS gēnu sekvences ir identiskas. Atlikušie celmi tika identificēti kā – *Azospirillum* sp., *Paraburkholderia* sp., *Pseudomonas* sp., *Rahnella* sp., *Paenibacillus* sp. – pa vienam celmam no katras ģints.

No vanagu vīķa (*Vicia cracca*) izdalīto baktēriju celmu skaits, kas identificēti ar molekulārās ģenētikas metodēm: 5, no kuriem 4 celmi identificēti kā *Rhizobium leguminosarum*, savukārt viens celms – *Pseudomonas* sp. ģintij piederošs. No sējas vīķa (*Vicia sativa*) un pļavas dedestijas (*Lathyrus pratensis*) izdalīto baktēriju celmu skaits, kas identificēts ar molekulārās ģenētikas metodēm – 4 (2 no katra) – visi identificēti kā *Rhizobium leguminosarum*. No austrumu galegas (*Galega orientalis*) izdalīto baktēriju celmu skaits, kas identificēti ar molekulārās ģenētikas metodēm: 5, no kuriem 2 identificēti kā *Rhizobium* sp – RG00101 (izdalīts 1982. gadā) un RG00201 (izdalīts 2008. gadā). Abu šo celmu izcelsme ir Saku, Igaunija. Savukārt atlikušie trīs celmi identificēti kā *Neorhizobium galegae*. Visi *Neorhizobium galegae* celmi izdalīti 2016. un 2018. gadā, divās dažādās teritorijās Latvijā (Rēzekne un Skrīveri).

No lupīnām (*Lupinus* sp.) izdalīto baktēriju celmu skaits, kas identificēti ar molekulārās ģenētikas metodēm: 9. Viens no šiem celmiem (RL01001) identificēts ar vienlīdzīgu sekvenču sadarbību (99%) gan kā *Rhizobium* sp. ģintij piederošs, gan kā *Bradyrhizobium* sp. Viens no celmiem (RL00701) identificēts kā *Rhizobium gallicum*. Savukārt pieci celmi identificēti kā *Rhizobium* sp. – divi no tiem (RL00501 un RL00901) uzrāda identiskas 16S rRNS gēna sekvences, pārējie trīs celmi ir ģenētiski atšķirīgi. Viens no lupīnām izdalītais baktēriju celms (RL00801) identificēts kā *Serratia plymuthica*.

No vanagnadziņiem (*Lotus* sp.) izdalīto baktēriju celmu skaits, kas identificēti ar molekulārās ģenētikas metodēm: 4, no kuriem 3 identificēti kā *Rhizobium* ģintij piederoši (divi *R. leguminosarum* celmi) un viens – *Ensifer adhaerens* (*Sinorhizobium* sp.). Tikai viens celms, kas izdalīts no pārkonamoliņa (*Anthyllis* sp.) identificēts ar molekulārās ģenētikas metodēm – kā *Rhizobium* sp. ģintij piederošs.

No pupiņām (*Phaseolus vulgaris*) izdalīto baktēriju celms skaits, kas identificēti ar molekulārās ģenētikas metodēm: 5. Divi no šiem celmiem (RPh00501 un RPh00601) izdalīti 2016. gadā un identificēti kā *Rhizobium leguminosarum*. Šo celmu 16S rRNS gēna sekvences ir ģenētiski atšķirīgas. Trīs atlikušie identificētie celmi ir vēsturiskās gumiņbaktēriju kolekcijas "116" celmi, izdalīti 1963. gadā. Viens no šiem celmiem (RPh11603) identificēts kā *Rhizobium*

sp., divi (RPh11601 un RPh11602) – kā *Paenibacillus polymyxa* (ģenētiski identiskas 16S rRNS gēna sekvences).

No vignas (*Vigna* sp.) izdalīto baktēriju celmu skaits, kas identificēti ar molekulārās ģenētikas metodēm: 2, no kuriem viens izdalīts 2018. gadā un identificēts kā *Rhizobium leguminosarum*, otrs izdalīts 2013. gadā un identificēts kā *Paenibacillus polymyxa*. Vēsturiskajā Gumiņbaktēriju kolekcijā iepriekš nebija no amoliņa (*Melilotus* sp.) izdalītu baktēriju celmu. Visi četri celmi, kuri identificēti ar molekulārās ģenētikas metodēm, izdalīti 2018. gadā un identificēti kā – *Rhizobium* sp., *Pantoea* sp., *Rahnella* sp., *Pseudomonas* sp. – pa vienam celmam no katras ģints. No blaktenes (*Ononis arvensis*) izdalītais baktēriju celms, kas identificēts kā *Rhizobium leguminosarum*, pieder pie visplašākās filoģenētiskās grupas – genotipa RhL01.

Baktēriju celmu un saimniekaugu specifiskums atšķiras starp **α -proteobaktēriju** klasteriem (3.2. tabula; 3.3. att.). II un IX klasteris (katrs apvieno trīs genotipus), kas identificēti kā *Rhizobium* sp un *Rhizobium leguminosarum*, izdalīti no visplašākā saimniekaugu klāsta, kas liecina par šo genotipu zemo saimniekaugu specifiskumu. Visaugstāko saimniekaugu specifiskumu uzrāda celmi no sekojošajiem α -proteobaktēriju filoģenētiskā koka klasteriem: IV klasteris (*Sinorhizobium* sp., saimniekaugs *Lotus* sp.); VI klasteris (*Mesorhizobium* sp., saimniekaugs *Glycine max*); VIII klasteris (*Neorhizobium galegae*, saimniekaugs *Galega* sp.). *N. galegae* gumiņbaktērijas ir uzrādījušas augstu saimniekauga specifiskumu, un atsevišķi šīs sugas celmi veido gumiņus tikai uz galegas saknēm (Österman et al., 2014). Pretēji baktēriju celmiem, kas pieder pie α -proteobaktēriju klases, **β -proteobaktēriju** klasei piederošie celmi uzrādīja lielāku saimniekaugu specifiskumu (3.2. tabula; 3.4. att.). Septiņi no 14 celmiem, kas identificēti kā β -proteobaktērijas, izdalīti no *Glycine max*, seši – no *Vicia faba* un viens no *Medicago sativa* sakņu gumiņiem. Turklāt soja bija vienīgais saimniekaugs baktēriju celmiem, kas pieder β -proteobaktēriju filoģenētiskā koka klasteriem I un II, savukārt lauka pupas bija vienīgais saimniekaugs III klastera celmiem. Klasteri VI un V uzrādīja mazāku saimniekaugu specifiskumu. Līdzīgi kā Latvijā, arī Venecuēlā soja ir salīdzinoši jauns kultūraugs. Izmēģinājumos Venecuēlā secināts, ka *Burkholderia* ir dominējošā ģints baktēriju celmiem, kas veido gumiņus uz sojas saknēm, uzrādot augstu slāpekļa saistīšanas efektivitāti augsnē ar zemu pH (pH 4.5) (Ramireze et al., 2019). **Gamma-proteobaktēriju** filoģenētiskās analīzes neuzrādīja lielu saimniekaugu specifiskumu atsevišķiem klasteriem (3.2. tabula; 3.5. att.), ņemot vērā, ka šajā proteobaktēriju klasē novērota lielāka genotipiskā fragmentācija – lielākā daļa šīs klases genotipu iekļāva tikai vienu baktēriju celmu. Tomēr visi baktēriju celmi, kas identificēti kā *Enterobacter* sp., izdalīti no *Glycine max* sakņu gumiņiem. Citi γ -proteobaktēriju celmi neuzrādīja tik lielu saimniekaugu specifiskumu. Kādā pētījumā veikta *Vigna unguiculata* sakņu gumiņos esošo baktēriju daudzveidības identifikācija, veicot 16S rRNS gēna sekvencēšanu, kur novēroja lielu baktēriju daudzveidību – α -proteobaktērijas (t.sk. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*) un β -proteobaktērijas (t.sk. *Burkholderia*), kā arī *Enterobacter* ģints baktērijas (γ -proteobaktērijas). Šajā pētījumā secināja, ka lielāka ietekme uz baktēriju daudzveidību ir nevis saimniekaugam, bet gan augsnes tipam. Novēroja, ka daļa no identificētajām baktērijām (α - un β -proteobaktērijas) spēja veidot gumiņus un saistīt atmosfēras slāpekli, tikmēr citi baktēriju celmi nespēja paši veidot gumiņus uz tauriņziežu saknēm. Tomēr arī celmi, kas nespēja paši izveidot gumiņus, piedalījās slāpekļa saistīšanā, uzlabojot augu augšanu (Leite et al., 2017), atbalstot ideju par β - un γ -proteobaktēriju celmu iekļaušanu tauriņziežu inokulācijas preparāta sastāvā.

3.3. Identificēto gumiņbaktēriju izplatība Latvijas augsnēs

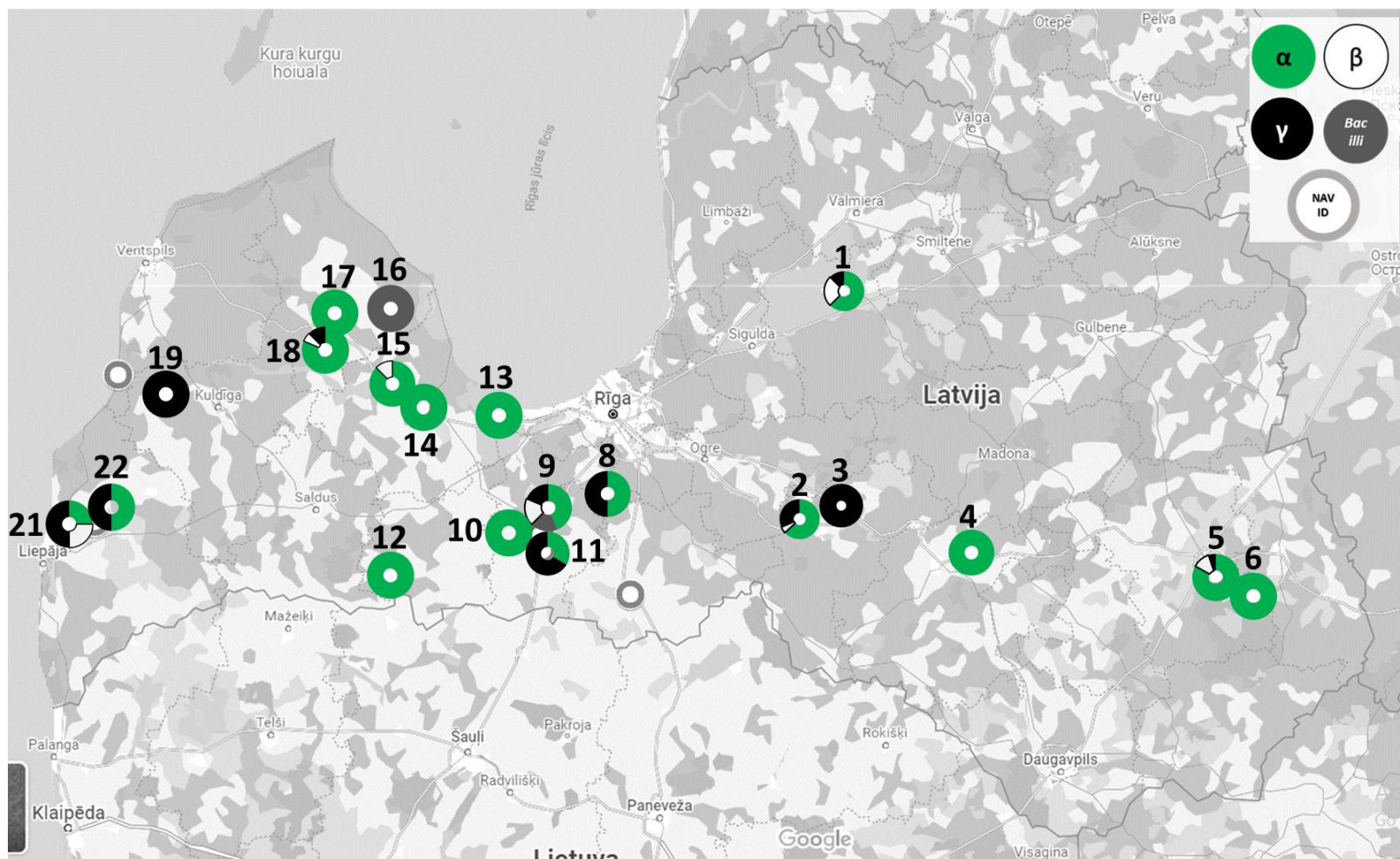
3.3.1. *No tauriņziežiem izdalīto baktēriju daudzveidība Latvijas novados*

Gumiņbaktēriju daudzveidība un efektivitāte ir plaši pētīta, novērojot būtisku ietekmi apkārtējās vides apstākļiem, pamatojot nepieciešamību veikt izmēģinājumus ar vietējiem baktēriju celmiem. Celmi, kas izdalīti no vietējiem tauriņziežiem, ir atbilstošāki esošajiem vides apstākļiem, kā arī piemērotāki izmantošanai vietējo selekcionēto tauriņziežu šķirņu inokulācijai (Gillert, Herridge, Sprent, 2016). Ņemot vērā gumiņbaktēriju daudzveidības atšķirības dažādos vides apstākļos, tajā skaitā augšņu tipos (Kalniņš, 1957; Leite et al., 2017; Slattery, Pearce, Slattery, 2004; Šenberga et al., 2017), izvērtēts, vai novērojamas no tauriņziežiem izdalīto baktēriju daudzveidības atšķirības dažādās teritorijās Latvijā.

Kolekcijā esošās gumiņbaktērijas lielākoties izdalītas no teritorijām, kur konkrētajā laika periodā ierīkoti izmēģinājumi ar tauriņziežiem. Baktēriju celmi ar vēsturisku nozīmi, kas izdalīti laika posmā no 1962. gada līdz 1973. gadam, izdalīti vai nu Jelgavas un Dobeles novadā (piem., Dimzas, Pēterlauki un Vecauce), vai Talsu novadā (3.1. tabula, 2.2. att.). Vēsturiskās kolekcijas gumiņbaktēriju celmi, kas izdalīti laika posmā no 2006. līdz 2015. gadam, lielākoties izdalīti Stendes lauka izmēģinājumos (no zirņiem, lauka pupām, sojas). Atsevišķi celmi izdalīti arī Jelgavā, Augsnēs un augu zinātņu institūta lauka un veģetācijas trauku izmēģinājumu ietvaros (no vignas, lucernas un āboliņa), kā arī Skrīveru lauka izmēģinājumā no āboliņa saknēm. Kolekcijā atrodas arī gumiņbaktēriju celmi, kas nav izdalīti no Latvijas augsnēm – 1982. un 2008. gadā iegūti gumiņbaktēriju celmi, izdalīti no galegas saknēm (RG00201 un RG00101) Igaunijā, Saku, kā arī gumiņbaktēriju celms [422a] (pēc inventarizācijas – RM24502, RM24503, RM24505), kas iegūts 1972. gadā no “Ļeņingradas kolekcijas”. Vairāki gumiņbaktēriju celmi izdalīti Lietuvā (Senie Traķi) 2019. gadā sadarbības pētījuma (“Experimental agrotechnical study of sandy field site with *Scarabeus* tillage machine technology”; Nr.3.2.2.-9/TPK-69) ietvaros no lauka pupu saknēm – RVLTSKR un RVL60. Šajā izmēģinājumā tauriņziežu inokulācijai izmantoti LBTU Augsnēs un augu zinātņu Gumiņbaktēriju kolekcijas celmi.

Kolekcija papildināta ar jauniem gumiņbaktēriju celmiem vadoties pēc dažādu apsvērumu kopuma – gumiņbaktērijas izdalītas no esošiem izmēģinājumiem ar tauriņziežiem – galvenokārt no lauka pupām, zirņiem un sojas. Savukārt pārējās tauriņziežu sugas izvēlētas, lai paplašinātu kolekcijā esošo gumiņbaktēriju celmu ģenētisko daudzveidību, izdalot tos gan no lauka, veģetācijas trauku izmēģinājumiem, kā arī citām ražošanas platībām. Ņemot vērā, ka visi pieejamie izmēģinājuma lauki, kur audzē tauriņziežus, atrodas Zemgalē, Kurzēmē un Latgalē, tad gumiņbaktēriju celmi lielākoties izdalīti no šiem Latvijas reģioniem (3.8. att.).

Vērtējot identificēto gumiņbaktēriju kolekcijas celmu izplatību pēc to piederības pie konkrētās proteobaktēriju klases, var novērot, ka α -proteobaktērijas ir iegūtas gandrīz visās paraugu ievākšanas vietās (17 no 20), savukārt β -proteobaktērijas identificētas 7 no 20 paraugu ievākšanas vietām. Šajās atradnes vietās β -proteobaktērijas bijušas proporcionāli mazāk nekā pārējo baktēriju klašu pārstāvji. Savukārt γ -proteobaktērijas identificētas 11 no 20 paraugu ievākšanas vietām. Jāņem vērā, ka, lai gan 3.8. att. norādīts procentuāls sadalījums konkrētās baktēriju klases pārstāvniecībai, ievāktu paraugu skaits izdalīšanas vietās ir atšķirīgs, tāpēc šie rezultāti jāvērtē kontekstā ar saimniekaugiem, no kuriem šīs baktērijas ir izdalītas.



3.8. att.. No tauriņziežu gumiņiem izdalīto baktēriju daudzveidība Latvijas teritorijā

Kartē ar cipariem atzīmētas paraugu ievākšanas vietas: 1. Priekulī; 2. Skrīveri; 3. Kokneses nov.; 4. Kūkas pag.; 5. Griškānu pag.; 6. Stojerovas pag.; 7. Bauska; 8. Olaines nov.; 9. Jelgava; 10. Dimzas; 11. Pēterlauki; 12. Vecauce; 13. Jūrmala; 14. Tumes pag.; 15. Pūre; 16. Pļavas; 17. Talsi; 18. Stende; 19. Ēdoles pag.; 20. Jūrkalnes pag.; 21. Medzes pag.; 22. Tadaikšu pag. Aplī proporcionāli norādīta identificēto proteobaktēriju klase konkrētajā paraugu ievākšanas vietā (zaļa – α -, balta – β -, melna – γ -proteobaktērijas; pelēka – *Bacilli* sp.; gaiši pelēka krāsa – nav paraugu, kas identificēti ar molekulārās ģenētikas metodēm).

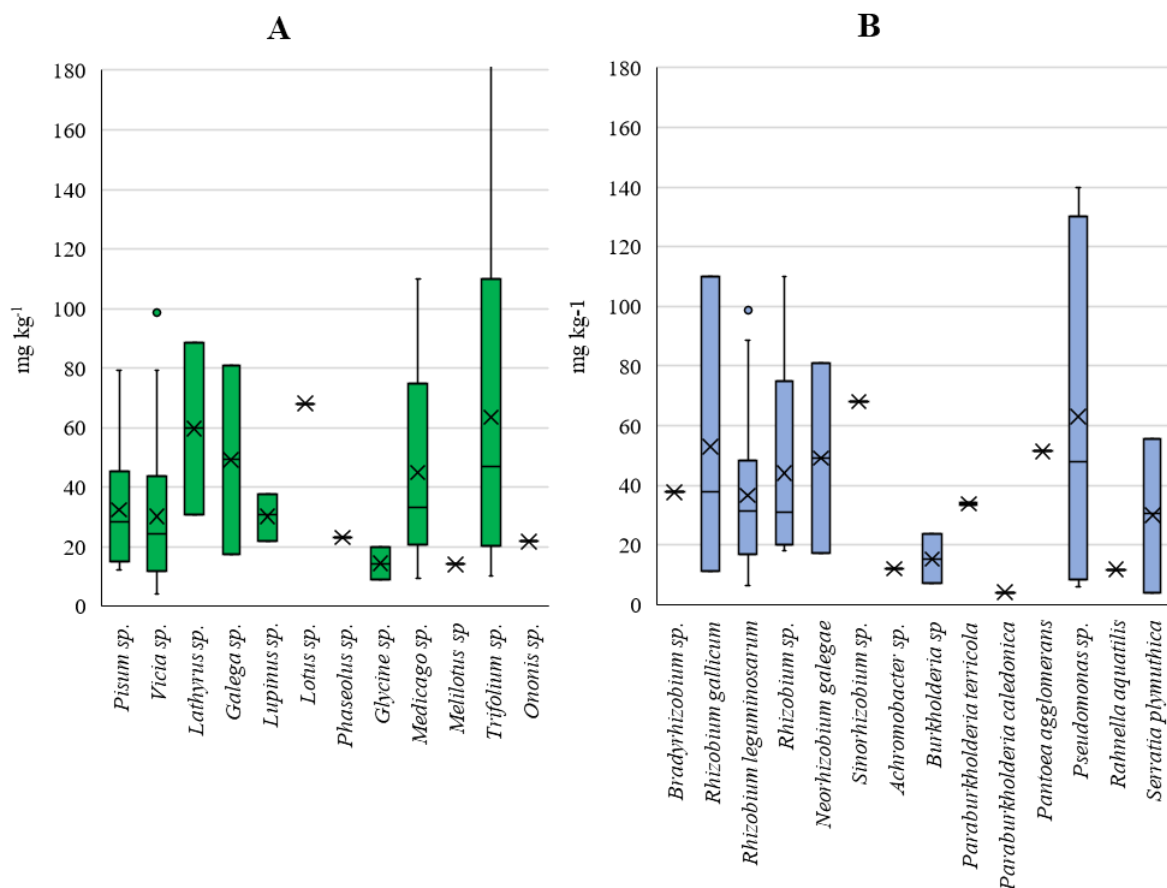
3.3.2. Augsnes agroķīmiskie apstākļi gumiņbaktēriju izdalīšanas vietās

Apkārtējās vides apstākļiem, kā šķīstošo sāļu koncentrācija augsnē, pH un minerālvielu satur, ietekmē ne tikai tauriņziežu augšanu un attīstību, bet arī uz gumiņbaktērijas – ietekmējot gumiņu veidošanos un slāpekļa saistīšanas efektivitāti, līdz ar to šādā veidā arī izraisot izmaiņas tauriņziežu augšanā (O'Hara, 2001). Minerālvielu ietekmei novērots būtisks ietekmes mainīgums starp gumiņbaktēriju ģintīm, sugām, kā arī vienas sugas celmiem. Īpaši liela ietekme novērota gumiņbaktērijām, kas viedo simbiotiskas attiecības ar soju un dārza pupiņām (Wang et al., 2019a). Turklāt ir novērota sāncensība starp gumiņbaktērijām un to saimniekaugiem par augsnē pieejamajām minerālvielām, īpaši ja tās augsnē ir nepietiekošā daudzumā, kā piemēram, fosfors un dzelzs (Bonilla, Bolaños, 2009).

Šajā pētījumā analizēja augsnes paraugus, kas ievākti kopā ar tauriņziežu saknēm ar gumiņiem (2016.–2019. gads). Novērtēja augsnes paraugos esošo kālija, kalcija, nitrātu (NO_3^-), fosfora, nātrija saturu, pH, kā arī augsnes elektrovadītspēju. Fosfora (P_2O_5) saturu augsnē analizēja pēc Egnera-Rīma metodes, šķīdinot augsnes paraugus kalcija laktāta buferšķīdumā. Savukārt pārējos augsnes agroķīmiskos rādītājus noteica ūdens izvilkumā, izmantojot LAQUAtwin augsnes parametru mērītājus. Mērījumus visiem šiem augsnes paraugiem veica vienlaicīgi. Datus analizēja sagrupējot tos pēc 1) saimniekaugiem, kas atradušies konkrētajā augsnes paraugā, un 2) identificētajām baktēriju sugām/ģintīm, kuras izdalītas no šiem saimniekaugiem, novērtējot un salīdzinot datu izkliedi katrā no šīm grupām. Jāņem vērā, ka, ievācot jaunus gumiņbaktēriju celmus, mērķis bija papildināt jau esošo gumiņbaktēriju kolekciju ar celmiem, kas izdalīti no plašāka spektra saimniekaugiem, kā arī pārklāt plašāku Latvijas teritoriju, tāpēc katra grupa (saimniekaugi un identificētās baktērijas) nesatur vienādu paraugu skaitu. Neskatoties uz to, var novērtēt kopējās augsnes prasības gan saimniekaugiem, no kuriem baktērijas izdalītas, gan pašu baktēriju celmu augšanas vides kvalitāti, kā arī – veikt augsnes parametru salīdzinājumu starp pētāmajām gumiņbaktēriju ģintīm.

Ievāktajos augsnes paraugos, analizējot pēc baktēriju saimniekaugiem, vismazākā datu izkliede **kālija** saturam augsnes paraugā (3.9. att., 2. pielikums) novērojama *Lupinus* sp. un *Glycine* max (līdz 40 mg kg^{-1}), kā arī salīdzinoši maza izkliede novērojama *Lathyrus* sp., *Galega* sp., *Pisum sativum* un *Vicia* ģints saimniekaugiem (līdz 90 mg kg^{-1}). Vislielāko K daudzuma izkliedi uzrāda *Trifolium* ģints saimniekaugu augsnes paraugi – no 10 mg kg^{-1} līdz pat 180 mg kg^{-1} . Vērtējot rezultātus pēc identificētajām baktērijām, vismazāko datu izkliedi uzrāda *Burkholderia* sp. augsnes paraugi ($7\text{--}23 \text{ mg kg}^{-1}$), savukārt lielāko izkliedi uzrāda *Pseudomonas* sp. paraugi ($6\text{--}126 \text{ mg kg}^{-1}$). Lielākā daļa paraugu identificēti kā *Rhizobium leguminosarum* (27 no 57). Vairāk kā puse augsnes paraugu (59%), kas atbilst *R. leguminosarum*, saturēja $15\text{--}48 \text{ mg kg}^{-1}$ K. Kopumā iegūtie augsnes paraugu rezultāti uzrāda nepietiekošu (ļoti zems $\leq 50 \text{ mg kg}^{-1}$ vai zems $50\text{--}100 \text{ mg kg}^{-1}$) kālija saturu augsnē (Espinoza, Slaton, Mozaffari, 2021), izņēmums bija atsevišķi paraugi ar salīdzinoši pietiekošu K saturu (110 un 183 mg kg^{-1}), kur baktērijas izdalītas no *Medicago* sp. un *Trifolium* sp., savukārt baktērijas identificētas kā *Rhizobium leguminosarum* un *Pseudomonas* sp.

Kalcija saturs augsnes paraugos (3.10. att., 2. pielikums), analizējot tos pēc saimniekaugu iedalījuma, variēja no 61 mg kg^{-1} līdz 2700 mg kg^{-1} . Vismazākā rezultātu izkliede novērojama *Lathyrus* sp. paraugiem, kuri uzrādīja Ca saturu 2033 un 2200 mg kg^{-1} un *Glycine* max paraugi, kuru Ca saturs bija 89 mg kg^{-1} un 663 mg kg^{-1} . Vērtējot augsnes paraugu rezultātus pēc identificētajiem baktēriju celmiem, viszemākais Ca saturs (līdz 1000 mg kg^{-1}) bija visos *Burkholderia* sp., *Serratia plymuthica*, *Rhizobium gallicum* paraugos. Visaugstāko Ca saturu uzrādīja augsnes paraugs variantā, kur *Pseudomonas* sp. celms izdalīts no *Trifolium* sp.



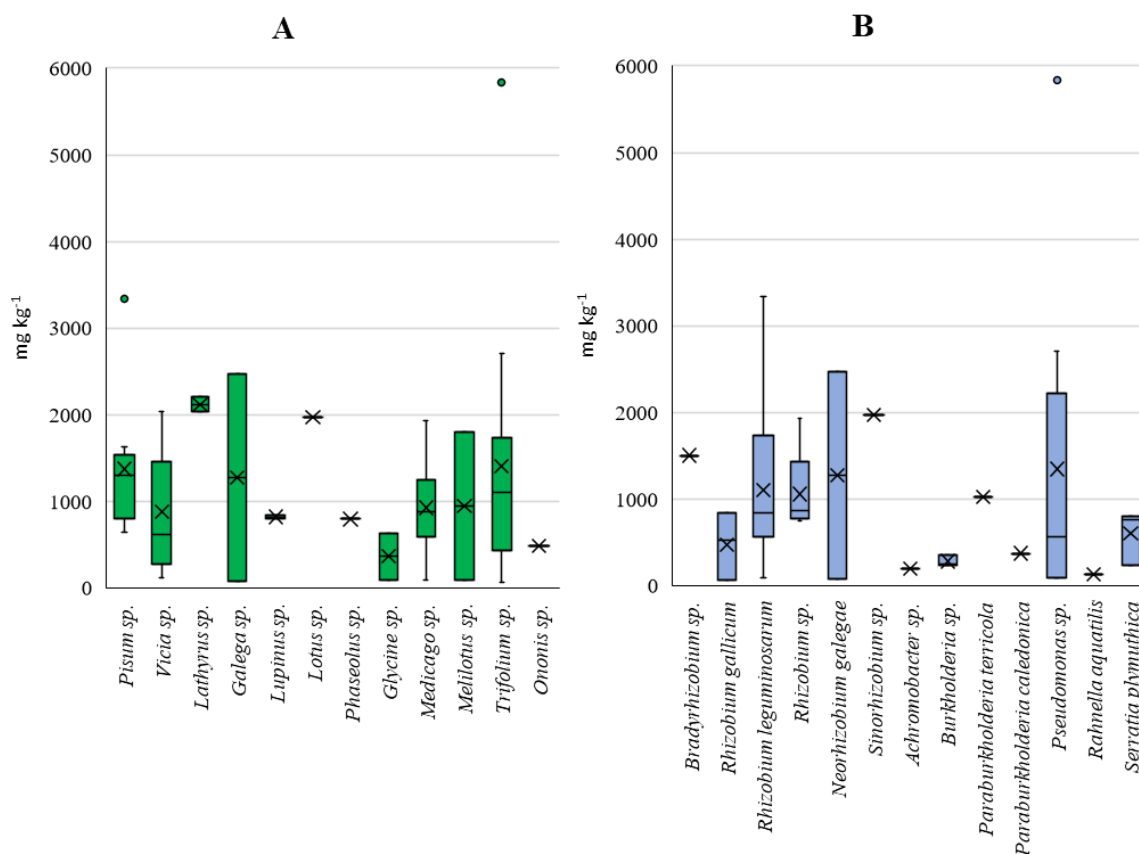
3.9. att. Kālija saturs augsnes paraugos (mg kg⁻¹)

Iekrāsotais rezultātu stabiņš uzrāda rezultātu datu izkliedi augsnes paraugiem konkrētā saimniekauga (A) un baktēriju ģints/sugas (B) ietvaros. Līnija (-) stabiņā norāda datu mediānas vērtību; krustiņš (x) norāda datu vidējo rādītāju; stabiņu nogriežņi apzīmē maksimālos un minimālos datus; izteikti neiederīgie dati (“outlier”) tiek atzīmēti ar atbilstošās krāsas aplīti.

Pietiekošs Ca saturs augsnē¹⁹ (>1000 mg kg⁻¹) ir mazāk nekā pusei (44.5%) no augsnes paraugiem. Pietiekošs Ca saturs ir ļoti būtisks normālai gumiņbaktēriju funkcionēšanai, ieskaitot nitrogenāzes aktivitātes nodrošināšanā, īpaši stresa apstākļos (Bonilla, Bolaños, 2009). Kritiski zems lauksaimniecības augsnes Ca saturs ir ≤400 mg kg⁻¹ (Espinoza, Slaton, Mozaffari, 2021). Šāds Ca saturs konstatēts augsnes paraugos, kas ievākti kopā ar daļu no *Vicia sp.*, *Galega sp.*, *Glycine max*, *Melilotus sp.* saimniekaugiem, un daļu no *Rhizobium gallicum*, *Neorhizobium galegae*, *Pseudomonas sp.*, *Serratia plymuthica*, kā arī visiem *Burkholderia sp.*, *Achromobacter sp.*, *Paraburkholderia caledonica*, kā arī *Rahnella aquatilis* baktēriju celmiem.

Nitrātu (NO₃⁻) daudzums augsnē norāda uz augiem pieejamo slāpekli. To noteica augsnes paraugos aptuveni trīs mēnešus pēc paraugu ievākšanas, izmantojot LAQUAtwin mērītāju, ūdens izvilkumā. Literatūrā minēts, ka pietiekošs augsnes nitrātu daudzums ir 20–40 mg kg⁻¹, savukārt NO₃⁻, kas ir zemāks par 10 mg kg⁻¹, vai pārsniedz 50 mg kg⁻¹ ir augu augšanai neatbilstošs. Savukārt vietās, kuras netiek izmantotas lauksaimniecības vajadzībām un, kurās netiek izmantoti slāpekļa mēslojumi, novēro nelielu nitrātu daudzumu – 5–10 mg kg⁻¹. (Espinoza, Slaton, Mozaffari, 2021; Nollendorfs, Āboliņa, 2023). Šajā pētījumā ievāktos augsnes paraugu NO₃⁻ daudzums variēja no 1.8–56 mg kg⁻¹ (3.11. att., 2. pielikums). No

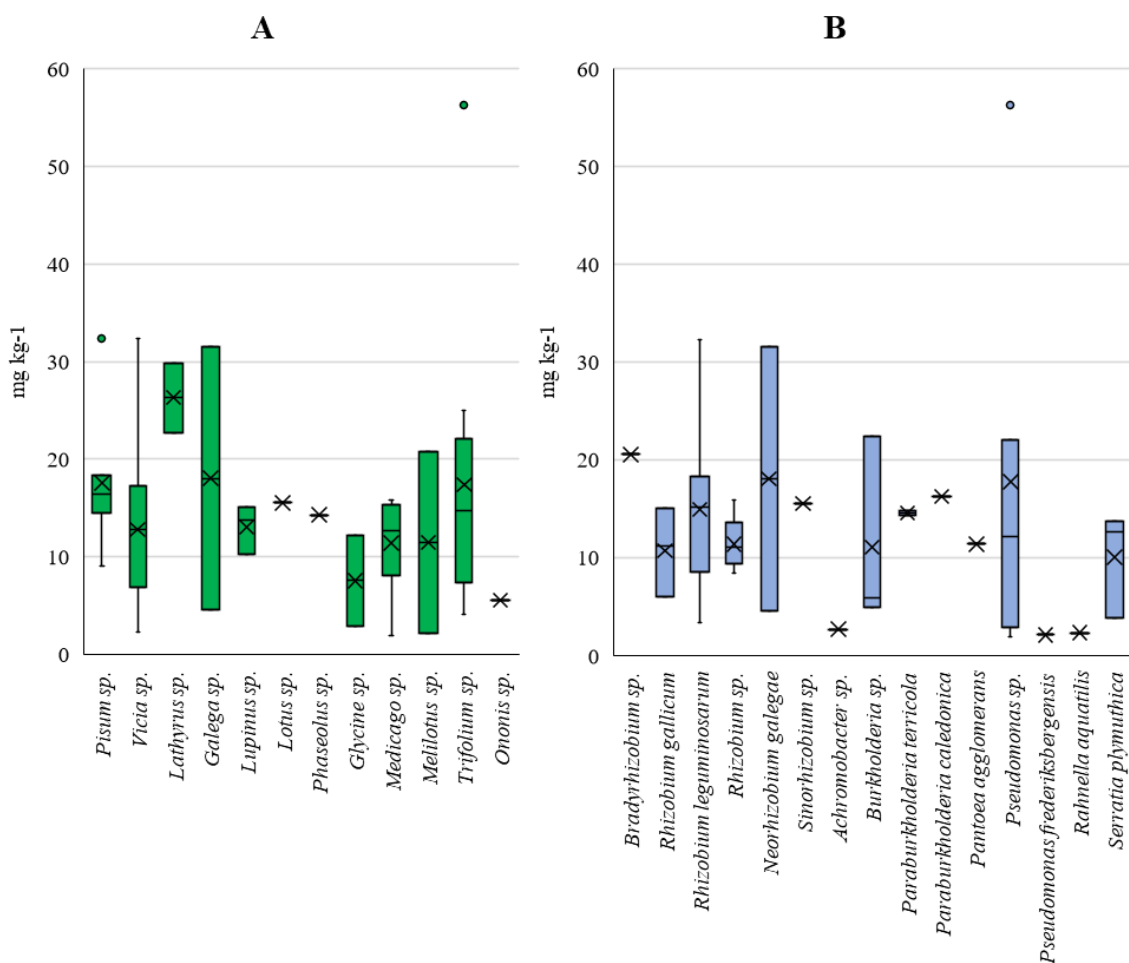
¹⁹ Augšņu agroķīmiskās izpētes un izpētes rezultātu novērtēšanas kārtība. Zemkopības ministrija, 04.01.2020. [Tiešsaiste] [skatīts 29.05.2023.]. Pieejams: <https://www.vaad.gov.lv/lv/media/3010/download?attachment>



3.10. att. **Kalcija saturs augsnes paraugos (mg kg⁻¹)**

Iekrāsotais rezultātu stabiņš uzrāda rezultātu datu izkliedi augsnes paraugiem konkrētā saimniekauga (A) un baktēriju ģints/sugas (B) ietvaros. Līnija (-) stabiņā norāda z datu mediānas vērtību; krustiņš (x) norāda datu vidējo vērtību; stabiņu nogriežņi apzīmē maksimālos un minimālos konkrētā stabiņa datus; izteikti neiederīgie dati (“outlier”) tiek atzīmēti ar atbilstošās krāsas aplīti.

vienīgā augsnes parauga, kas uzrādīja paaugstinātu NO₃⁻ saturu (>50 mg kg⁻¹), izdalīja gumiņbaktēriju celmu RV01001 (saimniekaugs *Vicia faba*). Šo augsnes paraugu ievāca Priekuļos, bioloģiskā lauka izmēģinājumā. No visiem augsnes paraugiem, 30% augsnes paraugi uzrādīja nepietiekošu NO₃⁻ saturu (<10 mg kg⁻¹). Daļa no šiem paraugiem ievākti no teritorijām, kuras nebija izmantotas lauksaimniecības vajadzībām (ceļmalas vai lauksaimniecības platībām piegulošas, neizmantotas teritorijas). Savukārt lielākā daļa augsnes paraugu ar samazinātu NO₃⁻ daudzumu ievākti lauksaimniecības teritorijās, lauka izmēģinājumos – Priekuļos, Jūrmalā, Grobiņas novadā, Skrīveros, kā arī Senajos Traķos (Lietuvā). Vairāk nekā puse no baktēriju celmiem, izdalītiem no šajās augsnēs augošajiem tauriņziežiem, identificēti kā α -proteobaktēriju klasei piederoši (*Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium gallicum*, *Neorhizobium galegae*), kā arī izdalīti atsevišķi β - un γ -proteobaktēriju klases celmi. Lielākā daļa augsnes paraugu saturēja apmierinošu (49% paraugu; 10–20 mg kg⁻¹) vai pietiekošu (20% paraugu; 20–40 mg kg⁻¹) NO₃⁻ daudzumu. Vērtējot nitrātu daudzuma rezultātus pēc saimniekaugiem un identificētajiem baktēriju celmiem, visos variantos var novērot datu izkliedi. Vislielākā rezultātu izkliede novērojama *Galega* sp. un no tiem izdalīto *Neorhizobium galegae* celmu variantos (4.5–31.5 mg kg⁻¹), kā arī *Vicia* sp. un *Rhizobium leguminosarum* datu grupās. Lielāko daļu *Glycine max* baktēriju celmus izdalīja no augsnēm ar samazinātu NO₃⁻ daudzumu (<10 mg kg⁻¹).

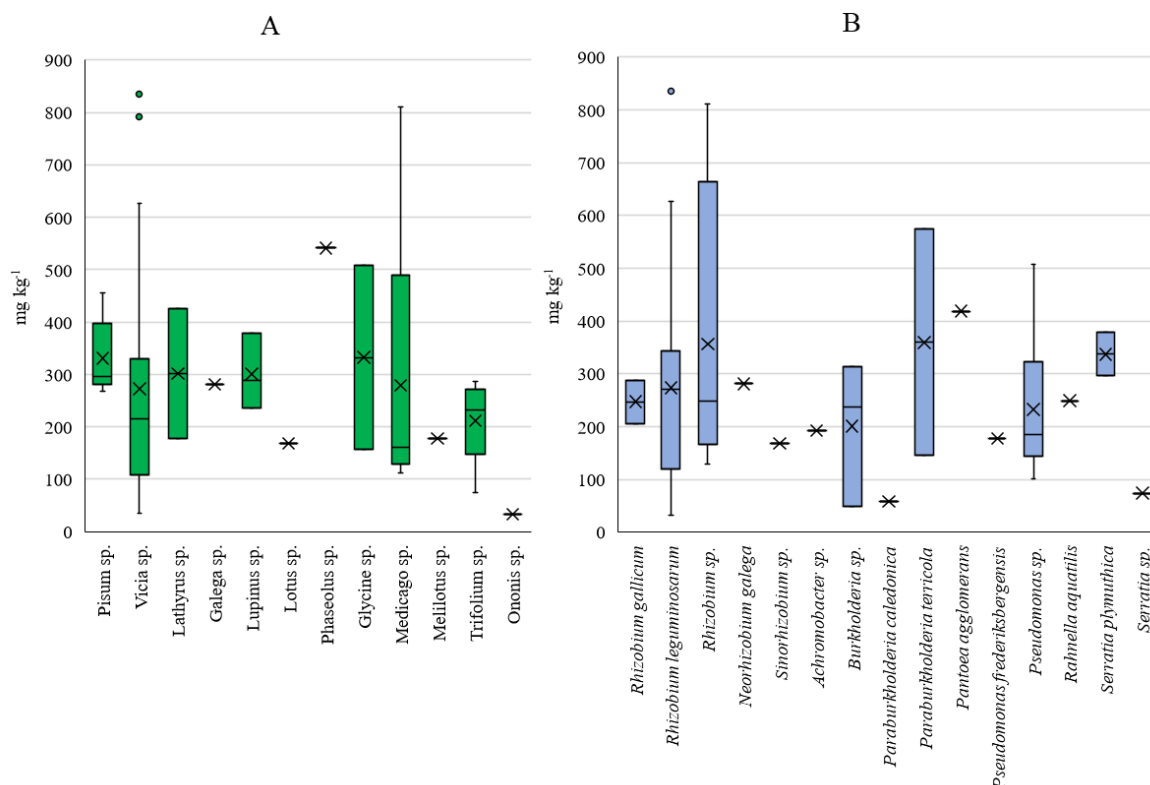


3.11. att. Nitrātu saturs augsnes paraugos (mg kg⁻¹)

Iekrāsotais rezultātu stabiņš uzrāda nitrātu (NO₃⁻) satura rezultātu datu izkliedi augsnes paraugiem konkrētā saimniekauga (A) un baktēriju ģints/sugas (B) ietvaros. Līnija (-) stabiņā norāda uz datu mediānas vērtību; krustiņš (x) norāda datu vidējo vērtību; stabiņu nogriežņi apzīmē maksimālos un minimālos konkrētā stabiņa datus; izteikti neiederīgie dati ("outlier") tiek atzīmēti ar atbilstošās krāsas aplīti.

Vidējais kopējais **fosfora** savienojumu daudzums augsnē, kas atrodams literatūras avotos²⁰, ir 200–1500 mg kg⁻¹. Jāpiebilst, ka lielākā daļa ir augiem neuzņemamā formā. Fosfora savienojumus šķīdinošie mikroorganismi palielina augsnes nešķīstošā fosfora biopieejamību augiem, šķīdinot neorganisko (minerālo) augsnes fosforu un mineralizējot nešķīstošo organisko fosforu, padarot to pieejamu ne tikai pašiem mikroorganismiem, bet arī augiem (Alori, Glick, Babalola, 2017). Šajā pētījumā fosfora (P₂O₅) daudzums augsnes paraugos variēja sākot no 33 mg kg⁻¹ līdz 835 mg kg⁻¹ (3.12. att., 2. pielikums). Kopumā novēroja lielu datu izkliedi, rezultātus grupējot gan pēc saimniekaugiem, gan identificētajām baktērijām. Augsnes paraugi, kas ņemti kopā ar *Vicia* ģints augu, un konkrētāk – *Vicia faba*, saknēm, uzrāda gan vismazākos, gan visaugstākos fosfora savienojuma rādītājus. Fosfora saturs rezultātus iedalot pēc identificētajām baktērijām, vismazāko izkliedi var novērot *Rhizobium gallicum* un *Serratia plymuthica* variantiem. Vislielākā datu izkliede novērojama *Rhizobium* sp. grupā. Zināms, ka atsevišķas augsnes baktērijas spēj šķīdināt augsnē esošos fosfora savienojumus, padarot fosforu augam pieejamā formā. Šis varētu būt viens no iemesliem, kāpēc novērojama tik liela fosfora saturs rezultātu izkliede – paraugos, kur baktērijas veikušas

veiksmīgu fosfora savienojumu šķīdināšanu, un tas ir bijis pieejams augiem, varētu novērot mazāku fosfora daudzumu (piemēram, *R. gallicum*, *Sinorhizobium* sp., kā arī daļa no *R. leguminosarum* celmiem), nekā paraugos, kuros baktērijas nav spējīgas šķīdināt fosfora savienojumus – piemēram, daļa no *R. leguminosarum* celmiem.



3.12. att. Fosfora saturs augsnes paraugos (mg kg⁻¹)

Iekrāsotais rezultātu stabiņš uzrāda fosfora (P₂O₅) satura rezultātu datu izkliedi augsnes paraugiem konkrētā saimniekauga (A) un baktēriju ģints/sugas (B) ietvaros. Līnija (-) stabiņā norāda uz datu mediānas vērtību; krustiņš (x) norāda datu vidējo vērtību; stabiņu nogriežņi apzīmē maksimālos un minimālos konkrētā stabiņa datus; izteikti neiederīgie dati (“outlier”) tiek atzīmēti ar atbilstošās krāsas aplīti.

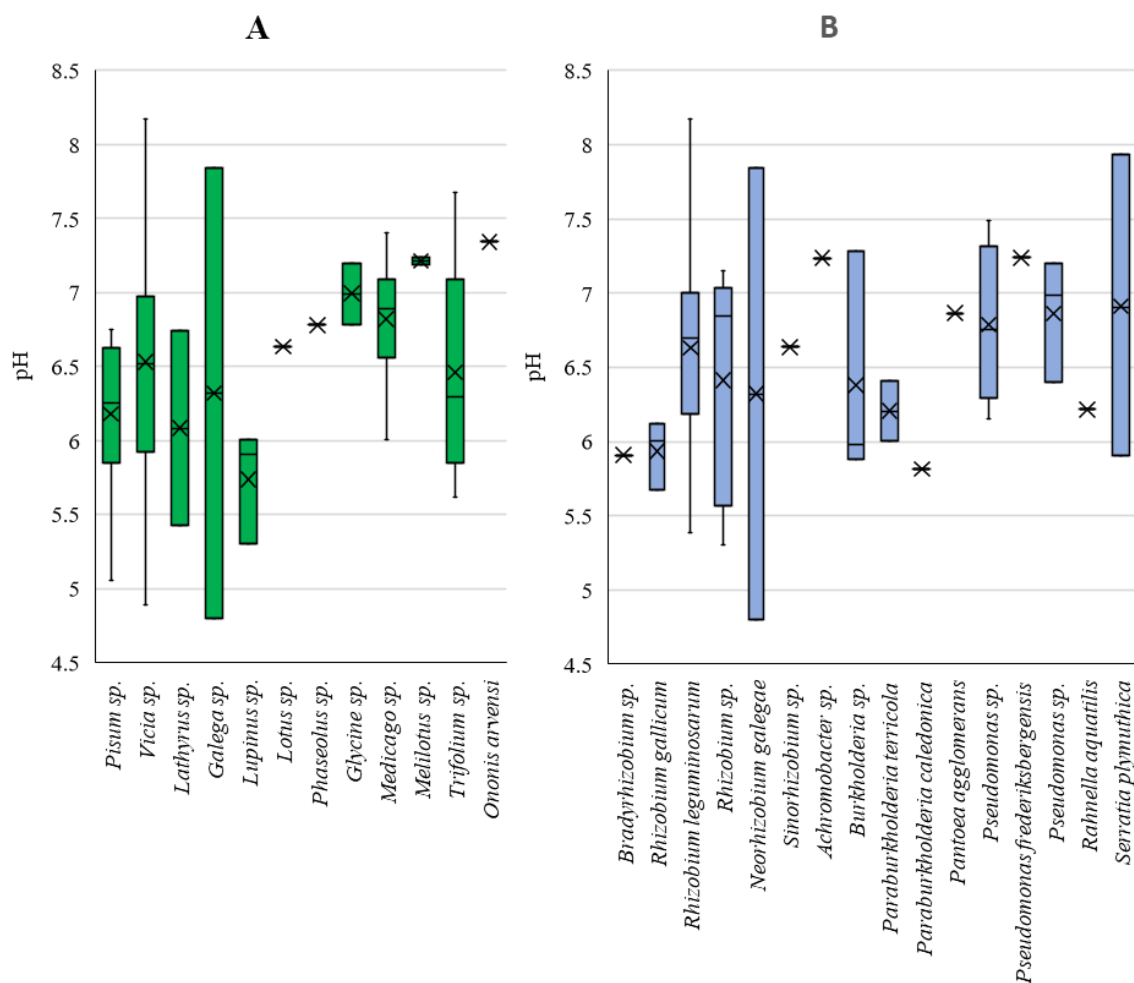
Palielinātas fosfora savienojumu šķīdinošo baktēriju aktivitātes rezultātā, augsnē atrodas augstāks līmenis fosfora augiem uzņemamā formā, kas rezultējas paaugstinātā tā uzņemšanā gan augos, gan pašās baktērijās. Šādā gadījumā augi spēj uzņemt vairāk augsnes fosfora, kas tika apstiprināts, nosakot paaugstinātu fosfora saturu auga audos (Sundara, Natarajan, Hari, 2002). Rezultātā augsnes fosfora savienojumu saturs tiek samazināts pateicoties šīm baktērijām, kas pārvērš nešķīstošos fosfora savienojumus augiem pieejamā formā. Literatūrā kā potenciālās fosfora savienojumu šķīdinātājas α -proteobaktērijas ir minētas – *R. leguminosarum* un *Bradyrhizobium japonicum*; β -proteobaktērijas – *Burkholderia* sp.; savukārt γ -proteobaktērijas – *Serratia*, *Rahnella*, *Pantoaea* sp., kā arī *Pseudomonas* sp. (Fernandez et al., 2007; Ibrahim et al., 2020; Kim, Jordan, Krishnan, 1997; Naveed et al., 2015; de Oliveira, 2004; Rodriguez et al., 2006; Saidi et al., 2013; Shoebitz et al., 2009; Zineb et al., 2019). Arī šajā pētījumā daļa celmu, kurus identificēja kā *Burkholderia* sp. un viens *Paraburkholderia* celms, izdalīti no augsnēm ar zemu (zem 200 mg kg⁻¹) P₂O₅ daudzumu (3.12. att.). *Pseudomonas* sp. literatūrā minētas kā baktērijas ar vienu no augstākajiem fosfora savienojumu šķīdināšanas potenciāliem (Timofeeva, Sedykh, 2022; Zineb et al., 2019). Šajā pētījumā daļa *Pseudomonas* sp. celmu ir izdalīti no augiem, kas auguši augsnē ar salīdzinoši zemu (zem 200 mg kg⁻¹) fosfora saturu. Konkrētos baktēriju celmus varētu izmantot baktēriju preparātos, ar mērķi šķīdināt augsnē esošos fosfora savienojumus. Analizējot augsnes fosfora

satura rezultātus pēc paraugu ievākšanas vietām (2. pielikums, 3.2. tabula), var pārlicināties par atsevišķu baktēriju celmu fosfora savienojumu šķīdināšanas potenciālu. Piemēram, paraugi, kurus ievāca no lauka izmēģinājuma (Medzes pag., Grobiņas nov., 2019. gads, *Vicia faba*), uzrāda atšķirības P_2O_5 daudzumā starp paraugiem. Trīs paraugi, kas izdalīti no *Vicia faba* sakņu gumiņiem – RV19/P5, RV19/P4 un RV19/P6, identificēti attiecīgi kā *Burkholderia* sp., *Paraburkholderia caledonica* un *Rhizobium leguminosarum*, uzrāda salīdzinoši zemu P_2O_5 ($34.50\text{--}49.83\text{ mg kg}^{-1}$) saturu augsnēs. Savukārt atlikušie četri identificētie paraugi – RV19/K5 (*Burkholderia* sp.), RV19/K12 (*Achromobacter* sp.), RV19.3/5 (*Rahnella aquatillis*) un RV19/K10 (*Pantoea agglomerans*), izdalīti no augsnes paraugiem, kas satur salīdzinoši vairāk P_2O_5 ($192.50\text{--}419.00\text{ mg kg}^{-1}$). Abi identificētie *Burkholderia* sp. celmi, pēc filoģenētiskās analīzes, izmantojot 16S rRNS gēnu, identificēti kā vienam genotipam (BSP04; 3.2. tabula) piederoši celmi, norādot uz to, ka baktēriju celmu fosfora savienojumu šķīdināšanas kapacitāte var atšķirties viena genotipa ietvaros.

Ir novērots, ka tieši **pH** ir visnozīmīgākais rādītājs augsnes mikroorganismu daudzveidības noteikšanai, salīdzinājumā ar citiem augsnes rādītājiem, piemēram, augsnes tipu. Visaugstākā mikroorganismu daudzveidība novērota augsnēs ar neitrālu pH, savukārt vismazākā – augsnēs ar zemu ($\text{pH} < 4.5$) vai augstu ($\text{pH} > 8.0$) pH līmeni (Lauber et al., 2009; Rousk et al., 2010). Optimālais pH, kas ir nepieciešama ne tikai tauriņziežu augšanai, bet arī tauriņziežu-gumiņbaktēriju efektīvas simbiozes izveidošanai, ir $\text{pH } 6.0\text{--}7.0$ (Graham et al., 1994; Somasegaran, Hoben, 1994). Šo apstiprina augsnes pH rezultāti (3.13. att., 2. pielikums), jo lielāko daļu gumiņbaktēriju celmu izdalīja no augsnēm ar $\text{pH } 6.0\text{--}7.5$, turklāt nevienam no augsnes paraugiem pH nebija < 4.5 vai > 8.0 .

Vislielākā pH izkliede novērojama *Galega* sp., kur paraugi ievākti no augsnes ar $\text{pH } 4.8$ un 7.8 , un *Vicia* sp. ($\text{pH } 4.8\text{--}8.2$). Liela daļa baktēriju, kuras izdalīja no saimniekaugu saknēm no augsnēm ar zemu pH ($\text{pH} < 6$), netika veiksmīgi kultivētas, norādot uz pH kā limitējošu faktoru optimālai gumiņbaktēriju augšanai. Arī literatūrā norādīts, ka zems augsnes pH (> 5.5) negatīvi ietekmē augsnes gumiņbaktēriju populācijas, kā arī gumiņu veidošanos uz tauriņziežu saknēm, samazinot kalcija, fosfora, kā arī molibdēna pieejamību (Slattery, Pearce, Slattery, 2004; Yamal et al., 2016; Zahran, 1999). Tomēr eksistē baktēriju celmi, piemēram, *Rhizobium* un *Bradyrhizobium* spp., kas ir pielāgojušies un spēj veidot simbiotiskas attiecības ar tauriņziežiem arī zema pH vides apstākļos (Graham et al., 1994; Zahran, 1999). Arī šajā pētījumā atsevišķus baktēriju celmus (*Rhizobium* sp., *R. leguminosarum* un *Neorhizobium galegae*) izdalīja no augsnēm ar zemu pH. Baktēriju celms RG00401 (*Neorhizobium galegae*) būtu tālāk izmantojams izmēģinājumos ar *Galega* sp. augsnēs ar zemu pH.

Augsnes **sālūmam** ir būtiska nozīme efektīvas tauriņziežu-gumiņbaktēriju simbiozes izveidošanā. Paaugstināta sāls koncentrācija augsnē var izraisīt osmotisko stresu, izraisot traucētu gumiņu izveidošanos uz tauriņziežu saknēm (Andrés et al., 2012; Zahran, 1999). **Augsnes elektrovadītspēju** mēra, lai varētu noteikt kopējo šķīstošo sāļu daudzumu augsnē un līdz ar to, identificētu iespējamo sāls stresa risku. Visi ievāktie augsnes paraugi uzrāda augiem un gumiņbaktērijām atbilstošu elektrovadītspēju ($150\text{--}3000\text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$), izņemot vienu paraugu, kas izdalīts no *Vicia faba* un identificēts kā *Rhizobium leguminosarum* (RVLT60). Šo gumiņbaktēriju celmu varētu potenciāli tālāk izmantot izmēģinājumos augsnēs ar paaugstinātu kopējo šķīstošo sāļu daudzumu. Analizējot datu izkliedi, augsnes paraugi, kas ievākti kopā ar *Vicia* sp., *Galega* sp., kā arī *Trifolium* sp. sakņu daļu un gumiņiem, uzrāda vislielāko elektrovadītspējas rezultātu izkliedi. Mazāku datu izkliedi uzrāda *Lotus* sp., *Lathyrus* sp. un *Glycine* sp. paraugi, kā arī augsnes paraugi, no kuriem izdalīti *Rhizobium gallicum* celmi (3.14. att., 2. pielikums). Literatūrā minēts, ka ir gumiņbaktēriju celmi – *Rhizobium* un īpaši *Sinorhizobium* ģintij piederoši, kas var būt tolerantī pret sāļuma stresu, savukārt *Bradyrhizobium* un *Mesorhizobium* ģints celmi uzrādījuši mazāku izturību pret sāls stresu, uzrādot aizkavētu gumiņu veidošanos (Andrés et al., 2012; Dogra et al., 2013; Elsheikh, Wood,

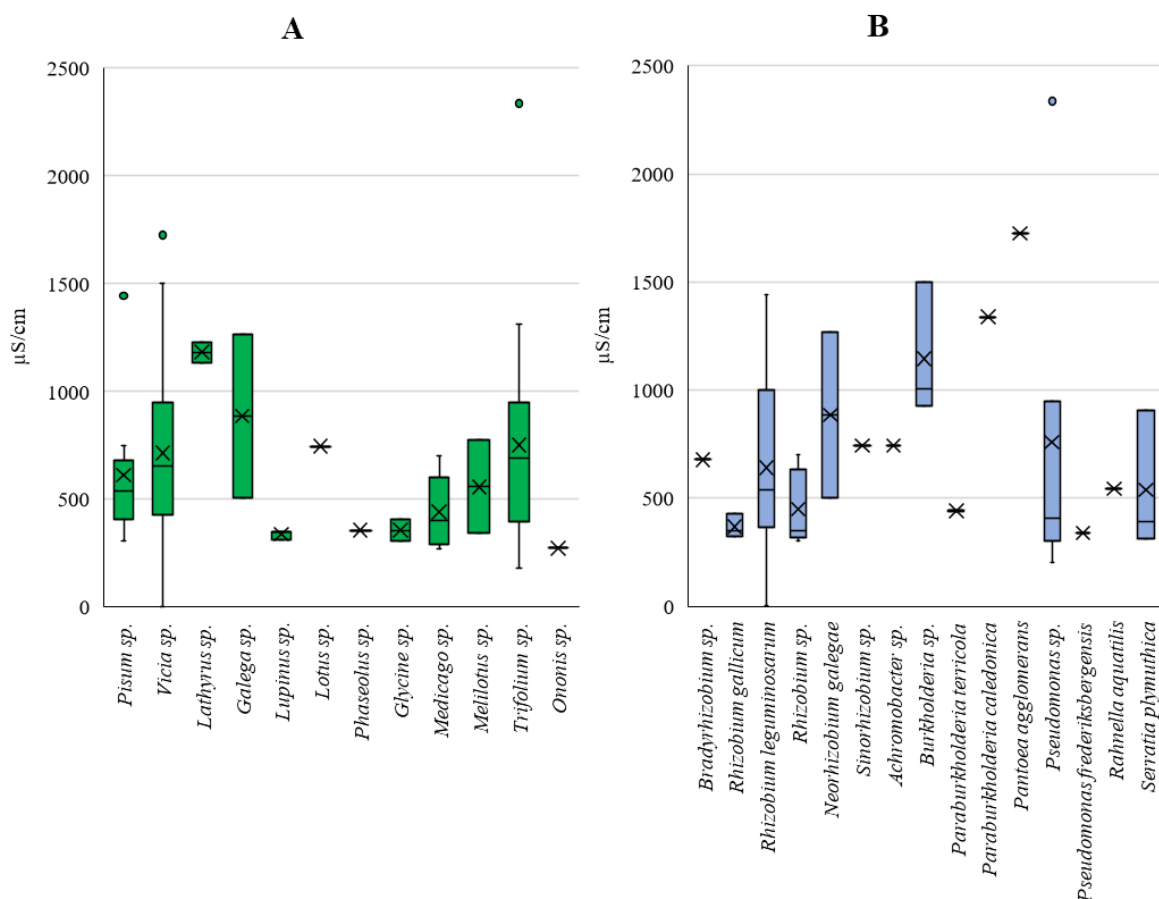


3.13. att. Augsnes paraugu pH līmenis

Iekrāsotais rezultātu stabiņš uzrāda datu izkliedi augsnē paraugiem konkrētā saimniekauga (A) un baktēriju ģints/sugas (B) ietvaros. Līnija (-) stabiņā norāda uz datu mediānas vērtību; krustiņš (x) norāda datu vidējo vērtību; stabiņu nogriežņi apzīmē maksimālos un minimālos konkrētā stabiņa datus.”

1995; Rejili et al., 2012). Starp identificētajiem gumiņbaktēriju celmiem ir novērojama savā ziņā līdzīga tendence. Vienīgais identificētais *Bradyrhizobium sp.* celma augsnē paraugs un *Rhizobium gallicum* paraugi uzrāda salīdzinoši zemu augsnē elektrovadītspējas rezultātus. Tomēr iepriekš novērots, ka lielāka ietekme uz potenciālo celma izturību pret sāls stresu ir nevis piederībai baktēriju ģintij, bet gan tā var atšķirties celmiem vienas ģints ietvaros (Amarger, Macheret, Laguerre, 1997). To arī uzrāda iegūto rezultātu izklīde ģints vai sugas ietvaros. Vislielākā datu izklīde novērojama augsnē paraugiem, no kuriem izdalīti *Pseudomonas* ģints celmi.

Kopumā augsnē analīžu rezultāti nenorāda uz kādu būtisku augsnē apkārtējās vides ietekmi, kas ierobežotu rizosfēras baktēriju daudzveidību. Lielākoties novērojama liela datu izklīde vienas baktēriju ģints vai pat sugas ietvaros. Augsnē reakcija ir vienīgais rādītājs ar salīdzinoši mazāko datu izklīdi. Arī literatūrā minēts, ka tieši augsnē pH ir noteicošais faktors augsnē mikroorganismu daudzveidībā (Andrés et al., 2012; Graham et al., 1994; Lauber et al., 2009; Rousk et al., 2010; Zahran, 1999). Augsnē paraugu agroķīmisko rādītāju analīžu rezultāti norāda uz vairāku baktēriju celmu potenciālu augsnē fosforā šķīdināšanā, tomēr par šo baktēriju celmu īpašību nepieciešams pārliecināties tālākos pētījumos.



3.14. att. Augsnes paraugu elektrovadītspēja ($\mu\text{S cm}^{-1}$)

Iekrāsotais rezultātu stabiņš uzrāda datu izkliedi augsnes paraugiem konkrētā saimniekauga (A) un baktēriju ģints/sugas (B) ietvaros. Līnija (-) stabiņā norāda uz datu mediānas vērtību; krustiņš (x) norāda datu vidējo vērtību; stabiņu nogriežņi apzīmē maksimālos un minimālos konkrētā stabiņa datus; izteikti neiederīgi dati ("outlier") tiek atzīmēti ar atbilstošās krāsas aplīti; viena mērijuma gadījumā, rezultāts apzīmēts ar "✱."

3.3.3. Augsnes agroķīmisko rādītāju korelatīvās sakarības

Lai noteiktu augsnes agroķīmisko rādītāju savstarpējās sakarības, veica Pīrsona korelācijas analīzi. Rezultāti (3.4. tabula) uzrādīja vidēji ciešu sakarību starp sekojošajiem rādītājiem – augsnes elektrovadītspēju un K , NO_3^- , kā arī Ca saturu; K un Ca , kā arī augsnes sāļumu; NO_3^- un Ca , kā arī augsnes sāļumu. Savukārt ciešu korelatīvo sakarību varēja novērot starp augsnes elektrovadītspēju un augsnes sāļumu un starp Ca un augsnes sāļumu. Gumiņbaktēriju genotipam nenovēro korelāciju ar kādu no augsnes agroķīmiskajiem rādītājiem. Augsnes agroķīmisko rādītāju ietekmi savā starpā noteica, veicot galveno komponentu analīzi (PCA analīze; 3. pielikums), kā arī rādītāju savstarpējās ietekmes sakarību slodzes analīzi (3.15. att.). Leņķis starp grafika līnijām norāda uz sakarības ciešumu starp rādītājiem – jo mazāks leņķis, jo ciešāka saistība. Vislielākā ietekme uz galvenajiem komponentiem (F1 un F2) novērota genotipam, NO_3^- , augsnes elektrovadītspējai, augsnes sāļumam, kā arī augsnes Ca saturam. Korelāciju rādītāju starpā uzrāda kosinusa leņķis starp rādītāju vektoriem (3.15. att.) (Kohler, Luniak, 2005). Visciešāko saistību uzrāda augsnes P_2O_5 daudzums paraugos un augsnes elektrovadītspēja; augsnes sāļums un K saturs augsnē; K un Ca saturs augsnē. Augsnes agroķīmisko rādītāju slodzes analīzes rezultāti neuzrāda citu rādītāju būtisku ietekmi uz gumiņbaktēriju genotipu. Tomēr var novērot augsnes pH līmeņa un augsnes

nitratu (NO_3^-) ietekmi uz baktēriju celmu genotipu, salīdzinājumā ar pārējiem pētāmajiem rādītājiem.

3.4. tabula

Augsnes paraugu agroķīmisko analīžu rādītāju Pīrsona analīzes korelācijas matrica

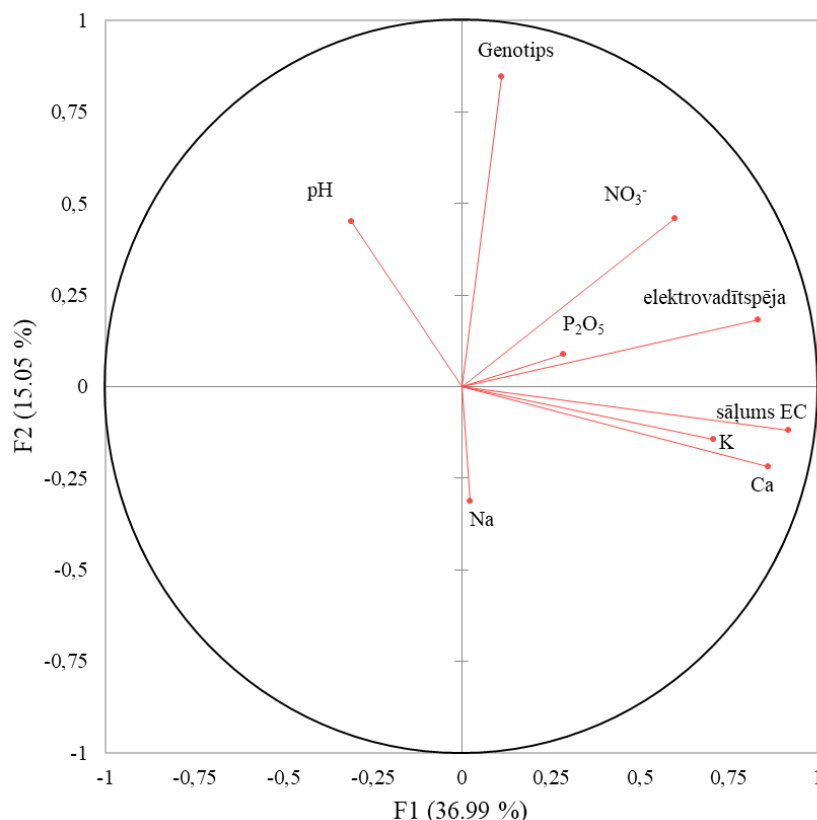
Rādītāji	Genotips	pH	Elektro- vadīt- spēja	Na	K	NO_3^-	Ca	Augsnes sāļums EC	P
Genotips	1.000	0.201	0.240	-0.127	0.006	0.270	-0.027	-0.003	-0.446
pH	0.201	1.000	-0.202	0.100	-0.190	-0.096	-0.244	-0.188	-0.016
Elektro- vadītspēj a	0.240	-0.202	1.000	0.063	0.414	0.525	0.579	0.774	0.116
Na	-0.127	0.100	0.063	1.000	-0.043	-0.058	0.053	0.123	-0.153
K	0.006	-0.190	0.414	-0.043	1.000	0.268	0.601	0.563	0.177
NO_3^-	0.270	-0.096	0.525	-0.058	0.268	1.000	0.301	0.422	0.211
Ca	-0.027	-0.244	0.579	0.053	0.601	0.301	1.000	0.856	0.204
Augsnes sāļums EC	-0.003	-0.188	0.774	0.123	0.563	0.422	0.856	1.000	0.160
P	-0.046	-0.016	0.116	-0.153	0.177	0.211	0.204	0.160	1.000
vāja sakarība = 0–0.299				vidēji cieša sakarība = 0.300–0.699			cieša sakarība = 0.700– 1.000		

3.4. Gumiņbaktēriju un endofītisko baktēriju daudzveidība, efektivitāte un potenciālais pielietojums tauriņziežu inokulācijā

3.4.1. Iepriekšējo gumiņbaktēriju pētījumu rezultāti ģenētisko analīžu kontekstā

Līdz šim Latvijā salīdzinoši daudz pētījumos pārbaudīta dažādu gumiņbaktēriju celmu efektivitāte, veicot plaša spektra tauriņziežu sēklu inokulāciju. Gumiņbaktēriju celmu identifikācija lielākoties veikta, pamatojoties uz saimniekaugu, no kura sakņu gumiņiem celms izdalīts (piem., *Rhizobium leguminosarum* – zirņi, vīķi un pupas; *R. trifolii* – āboliņš, u.t.t.) (1.2.4. apakšnodaļa, 1.1. tabula). Tomēr šāds iedalījums ir novecojis, kā arī nesniedz pilnvērtīgu informāciju par konkrētā gumiņbaktēriju celma saimniekauga specifiskumu (Pongslip, 2012). Šajā pētījumā izvirzīta tēze, ka gumiņbaktēriju taksonomiskās piederības noteikšana, izmantojot pilna 16S rRNS gēna sekvencēšanu, sniegtu precīzāku skaidrojumu iepriekš veikto pētījumu rezultātiem. Piemēram, ja pētījumā sēklu inokulācijai izmantoti divi atšķirīgi baktēriju celmi, bet netiek novērotas efektivitātes atšķirības, tiek secināts, ka apkārtējās vides apstākļu ietekmē efektivitātes atšķirības nevar novērot. Izmantojot pētījumā iegūtos 16S rRNS sekvenču datus, var noteikt vai šie celmi genotipiski ir identiski, vai nē. Diemžēl, īpaši senākos pētījumos, izmantoti celmu apzīmējumi, kuri laika gaitā mainījušies, bet nav saglabājusies pietiekoši daudz informācija, lai identificētu šos celmus pēc esošajiem celmu kodiem. Daļa no vēsturiskajiem celmiem nav saglabāti, īpaši, ja tie nav uzrādījuši augstu slāpekļa saistīšanas efektivitāti.

Šajā pētījumā iegūtie rezultāti palīdzēs interpretēt pētījumu rezultātus, kuros tauriņziežu sēklu inokulācijai izmantotas gumiņbaktēriju celmu tīrkultūras (nevis vairāku



3.15. att. Augsnes agroķīmisko analīžu rādītāju slodze (*factor loading*) uz galvenajiem komponentiem, un rādītāju savstarpējās sakarības

Sarkanās līnijas norāda rādītāju ietekmes slodzi uz citu attiecīgā komponenta rādītāju izkliedi. Jo tuvāk sarkanā līnija atrodas riņķa līnijai, jo lielāka ir attiecīgā rādītāja ietekme uz citu komponentu rādītāju izkliedi. Leņķis starp līnijām norāda uz sakarības ciešumu starp rādītājiem – jo mazāks leņķis, jo ciešāka ir šī saistība.

celmu asociācija). Piemēram, zinātniskajā darbā, kurā veikta sojas sēklu inokulācija (Petrēvics, 2021), salīdzināta celmu RS2081 un RS00301 efektivitāte. Šajos izmēģinājumos iekļauts arī BASF firmas *HiStick® Soybean* gumiņbaktēriju inokulācijas preparāts. Izmēģinājuma rezultātos nenovēroja būtisku ietekmi uz sojas augšanu kādam no izmantotajiem LBTU kolekcijas celmiem. Nedaudz augstāku efektivitāti uzrādīja BASF inokulācijas preparāts *HiStick® Soybean*. Veicot celmu taksonomiskās piederības identifikāciju, tagad zināms, ka RS00301 celms atbilst *Rhizobium* ģintij, savukārt RS2081 celms – *Paraburkholderia terricola* (3.2. tabula). Zināms, ka sojas inokulācijai efektīvāki celmi ir *Mesorhizobium* sp., piemēram, celmi RS2030 un RS2011, un *Bradyrhizobium japonicum* (Pongslip, 2012) – piemēram, celms RSBASF/S, kurš arī izdalīja no augiem, kuri inokulēti ar BASF *HiStick® Soybean* gumiņbaktēriju preparātu.

Salīdzinoši daudz gumiņbaktēriju efektivitātes pētījumos inokulētas lauka pupas un soja ar sekojošajiem gumiņbaktēriju celmiem: RP023, RV407, RV408, RV501 un RV505. Šie gumiņbaktēriju celmi šajā pētījumā identificēti kā attiecīgie genotipi: RhL02; RhSP06; RhSP07; RhSP05; RhSP07 (3.2. tabula). Tātad, pēc 16S rRNS gēna sekvenču, celmi RV408 un RV505 ir identiski, kas varētu skaidrot pētījumus, kuros šie celmi neuzrāda būtiski atšķirīgu efektivitāti. Tuvradniecisks šiem celmiem ir arī celms RV501, kā arī RV408. Salīdzinājumā ar šiem genotipiem, celma RP023 genotips RhL02 ir ģenētiski visattālākais (3.3. att.). Pētījumos, kuros iekļauti RP023 un RV407 celmi, kas ģenētiski ir būtiski atšķirīgi, skatoties pēc pilna 16S rRNS gēna sekvenču salīdzinājumu rezultātiem, visbiežāk novērotas celmu ietekmes atšķirības (Dubova, Šenberga, Alsina, 2015; Dubova et al., 2015; Dubova, 2020; Šenberga et al., 2017). Savukārt atsevišķos pētījumos (piemēram, Dubova et al., 2016), kur veikta dažādu celmu

efektivitātes salīdzināšana, nav novērotas atšķirības starp celmiem RV407 un RV505, kas pēc veiktajām filoģenētiskajām analīzēm ir identificēti kā tuvradnieciski.

3.4.2. Tauriņziežu sēklu inokulācijas preparāta izveide

Optimālā tauriņziežu sēklu inokulācijas preparāta sastāvā būtu jābūt 1) α -proteobaktēriju gumiņbaktēriju celmam, atbilstoši saimniekaugam; 2) β -proteobaktēriju gumiņbaktēriju celmam; 3) endofītisko baktēriju celmam. Alfa-proteobaktēriju gumiņbaktēriju celms sēklu inokulācijas preparāta sastāvā iekļauts galvenokārt, lai tas izveidotu uz tauriņzieža saknēm gumiņus, kuros būtu iespēja iekļauties arī citām baktērijām, kas netiek klasificētas kā gumiņbaktērijas. Arī primāro slāpekļa saistīšanas funkciju veic α -proteobaktēriju celmi, nodrošinot augu ar nepieciešamo slāpekļa daudzumu. Pētījumos arī β -proteobaktērijas uzrādījušas spēju izveidot gumiņus uz tauriņziežu saknēm, kā arī spēju uzlabot slāpekļa saistīšanas kapacitāti, inokulējot augus kopā ar α -proteobaktēriju gumiņbaktēriju celmiem (Chen et al., 2003; Moulin et al., 2001; Shiraishi, Matsushita, Hougetsu, 2010). Atsevišķi β -proteobaktēriju celmi uzrādījuši spēju šķīdināt rizosfērā esošos fosfora savienojumus, padarot to augam pieejamā formā. Savukārt preparāta papildināšana ar endofītisko baktēriju celmiem no γ -proteobaktēriju klases, kas pētījumos vēl nav uzrādījuši pārlicinošu spēju izveidot gumiņus, nodrošinātu augsnē esošo fosfora savienojumu šķīdināšanu, uzlabotu gumiņu veidošanās procesu, kā rezultātā uzlabojot saimniekauga augšanu un attīstību (Naveed et al., 2015; Shiraishi, Matsushita, Hougetsu, 2010). Ņemot vērā kolekcijā esošo baktēriju saimniekaugus, kā arī saimniekaugu specifiskumu, izveidota potenciāla preparāta sastāva shēma, pēc kuras vadīties, izvēloties baktēriju celmus no LBTU Augsnes un augu zinātņu institūta Gumiņbaktēriju kolekcijas, audzējot kādu no Latvijā populārajiem lauksaimniecības tauriņziežiem (lauka pupas, zirņi, lucerna, soja, galega, lupīna, dārza pupiņas) (3.5. tabula). Lielākā daļa pētījumā identificētie baktēriju celmi izdalīti no augsnēm ar simbiozei atbilstošu augsnes reakciju – pH 6.0–7.0 (atsevišķos pētījumos pH 6.0–7.5 (skatīt 1.2.3. un 3.3.2.apakšnodaļas). Tomēr ņemot vērā to, ka atsevišķi celmi izdalīti gan no skābākām, gan sārmainākām augsnēm, tiek dotas papildus rekomendācijas, kādus gumiņbaktēriju celmus izmantot, ja zināms, ka augsnes pH ir <6.0 vai >7.5 (3.6. tabula). Veidojot tauriņziežu inokulācijas preparātu, izmantojot dažādus gumiņbaktēriju un citus endofītiskos baktēriju celmus, tiek palielināta veiksmīgas un efektīvas simbiozes iespējamība. Baktēriju celmu izvēle balstās gan uz saimniekaugu informāciju, no kuriem šie baktēriju celmi izdalīti, kā arī literatūrā pieejamo informāciju, kas norāda, kādas gumiņbaktēriju sugas ir visefektīvākās konkrētiem tauriņziežiem (1.5., 3.6. un 3.7.att.).

Papildus α -, β - un γ -proteobaktērijām, jāapsver gumiņbaktēriju preparāta papildināšana ar kādu no *Paenibacillus polymyxa* celmiem (genotipi PaSP01–PaSP05), balstoties uz pētījumiem, kas uzrāda šīs baktēriju sugas spēju uzlabot augu augšanu, ieskaitot atmosfēras slāpekļa saistīšanu (Goel, Sindhu, Dadarwal, 2002; Perez-Montan et al., 2014; Timmusk, Grantcharova, Wagner, 2005; Vessey, 2003).

Daļa no α -, β - un γ -proteobaktēriju klases celmiem iekļauti potenciālā tauriņziežu sēklu inokulācijas preparāta sastāvā, balstoties uz informāciju par šo baktēriju spēju šķīdināt augsnes fosfora rezerves (Alori, Glick, Babalola, 2017). Baktēriju preparātu izmantošana augsnes fosfora savienojumu šķīdināšanai pašlaik ir vienīgais iespējamais veids, neskaitot ķīmiskos fosfora mēslojumus, kā uzlabot fosfora pieejamību augiem (Timofeeva, Sedykh, 2022). Turklāt, ir novērots, ka šīs baktērijas ne tikai šķīdina augsnes fosfora savienojumus, bet arī izdala rizosfērā fitohormonus, kā arī sintezē augu augšanai un attīstībai noderīgus vitamīnus (Ibrahim, Iqbal, Tang, 2022). Papildus augsnes fosfora savienojumu šķīdināšanai, šīs baktērijas

uzlabo gan ķīmiskā fosfora mēslojuma pieejamību augiem, kā arī uzlabo fosfora uzņemšanu no tādiem avotiem kā komposts, digestāts un notekūdeņu dūņas (Raymond et al., 2021).

3.5. tabula

Baktēriju celmi tauriņziežu sēklu inokulācijas preparātu izveidošanai

Saimniekaugs	α -proteobaktēriju genotips (I)	α -proteobaktēriju genotips (II)	β -proteobaktēriju genotips	γ -proteobaktēriju genotips
<i>Vicia faba</i>	RhL01 RhL04	RhSP02; RhSP05 RhSP07; RhSP06	PbT04; PbC01 BSP04; BSP07	RA01; SrP01 SrP03; PnA02
<i>Galega</i> sp.	NhG01	RhSP05; RhSP07	BSP07	—
<i>Pisum sativum</i>	RhL01 RhL02	RhSP05 RhSP07 RhSP09	—	RA02
<i>Phaseolus</i> sp.	RhL01 RhL05	RhSP07	—	—
<i>Glycine max</i>	BhJ01 MhSP01 MhSP02	RhG01 RhSP05 RhSP07	PbT01 PbT03 BSP06	ESP01; ESP02 ESP03; ESP04 EA01 PSP04; PSP07 PnA01
<i>Trifolium</i> sp.	RhL01; RhL02 RhG01	RhSP05 RhSP07	—	PSP04; PSP05 PSP08; SrP05
<i>Medicago</i> sp.	RhL01	RhSP04; RhSP05 RhSP07; RhSP06 RhSP10	PbT02	RA02 PSP01
<i>Lupinus</i> sp.	RhSP01; RhG01; RhSP05; RhSP07 RhSP08; RhSP06		—	SrP02

3.6. tabula

Baktēriju celmi tauriņziežu sēklu inokulācijai augsnēm ar pH <6.0 un pH >7.5

Genotips	Genotipa celmi augsnēm ar pH <6.0	Genotipa celmi, augsnēm ar pH >7.5
RhL01	RV00901; RLa00301; RT00501; RT00901	RVLT60; RVLTSCR
RhL02	—	RT01901
RhSP05	RV00501; RV01101; RL00901	—
RhG01	RT2050	—
BSP04	RV19/P5	—
NhG01	—	RG2010
NhG02	RG00401	—

Atšķirībā no ilgtermiņā pētītajām gumiņbaktērijām un to spēju saistīt atmosfēras slāpekli, nodrošinot augus ar nepieciešamo slāpekļa daudzumu, mehānisms, kā tiek veikta augsnes fosfora savienojumu šķīdināšana un to loma augu augšanas uzlabošanā, vēl nav plaši izpētīts fenomens (Dai et al., 2020). Īpaši svarīga ir ne tikai atsevišķu mikroorganismu darbības

mehānismu izpēte, bet pētījumi, kuros apskatīti visas lauksaimniecības sistēmas iekļauto mainīgo mijiedarbība. Piemēram, novērots, ka ilgtermiņa minerālā slāpekļa mēslošanas izmantošana būtiski samazina augsnes pH līmeni, kas savukārt samazina rizosfēras mikroorganismu augšanu, kā arī izmaina augiem labvēlīgo baktēriju (ieskaitot α -, β - un γ -proteobaktēriju) gēnu ekspresiju, kas regulē sārmaino fosfatāzi, kurai savukārt ir nozīme fosfora savienojumu šķīdināšanā. Rezultātā samazinot mikroorganismu fosfora savienojumu šķīdināšanas kapacitāti (Dai et al., 2020; Ibrahim et al., 2022). Plānojot tauriņziežu sēklu inokulācijas preparāta papildināšanu ar fosfora savienojumu šķīdinošajām baktērijām, jāņem vērā, ka šķīdināšanas efektivitāte, tajā skaitā spēja šķīdināt dažādus fosfora avotus, var atšķirties starp baktēriju celmiem. Šo atšķirību pamatā ir rizosfērā izdalītie baktēriju ģinšu specifiskie organiskie savienojumi, piemēram, laktāti, oksalāti, citrāti un glikonāti, kas veic fosfora savienojumu šķīdināšanu (Ibrahim et al., 2022; Timofeeva, Sedykh, 2022). Piemēram, *Pseudomonas* sp. rizosfērā izdala pienskābi un ābolskābi, bet *Enterobacter agglomerans* – skābeņskābi un citronskābi (Timofeeva, Sedykh, 2022). Pētnieku vidū gan vēl nav vienprātības par baktēriju izmantošanu rizosfēras fosfora savienojumu šķīdināšanā. Lielākā daļa pētījumu, kur tiek pierādīta šo baktēriju efektīva darbība, ir veikti kontrolētos apstākļos, nevis lauka izmēģinājumos. Turklāt pastāv risks, ka fosfora savienojumus šķīdinošās baktērijas spēj mobilizēt tikai tik lielu fosfora daudzumu, lai nodrošinātu savas vajadzības, bet nepietiekoši auga apgādei ar fosforu (Ibrahim et al., 2022; Raymond et al., 2021). Tomēr arī lauka izmēģinājumos baktērijas, kas pieder arī pie šajā pētījumā identificētās *Pseudomonas* ģints, uzrādījušas spēju uzlabot augu augšanu un ražu (Raymond et al., 2021).

Tauriņziežu preparāts, kas apvienotu ne tikai gumiņbaktērijas, kas izveido gumiņus un veic atmosfēras slāpekļa saistīšanu, bet arī baktēriju celmus, kas veic rizosfērā esošā, bet augiem nepieejamā fosfora rezervju šķīdināšanu, būtu vērtīgs ieguldījums ilgtspējīgā lauksaimniecībā. Pateicoties šādam preparātam, varētu ierobežot ne tikai pārlietu lielo minerālā slāpekļa mēslojuma izmantošanu, bet arī samazināt nepieciešamību pēc ķīmiskā fosfora mēslojuma pielietošanas. Rezultātā atstājot pozitīvu ietekmi uz apkārtējo vidi. Šī pētījuma rezultāti sniedz būtisku ieguldījumu šāda preparāta izveidē, nosakot no gumiņiem izdalīto celmu taksonomisko piederību un daudzveidību.

SECINĀJUMI

1. Inventarizācijas rezultātā iegūti 46 vēsturiskās kolekcijas gumiņbaktēriju celmi, izdalīti laika posmā no 1962.–2015. gadam.
2. LBTU Augsnes un augu zinātņu institūta Gumiņbaktēriju kolekcija papildināta ar 143 jauniem baktēriju celmiem, kas izdalīti laika posmā no 2016.–2019. gadam. Atjaunotā Gumiņbaktēriju kolekcija satur 189 baktēriju celmus, izdalītus no 14 dažādām tauriņziežu ģintīm.
3. Pētījums apstiprināja, ka 16S rRNS pilna garuma gēns ir atbilstošs marķieris, lai veiktu no tauriņziežu gumiņiem izdalīto baktēriju tīrkultūru ģenētisko identifikāciju un veiktu filoģenētiskās analīzes. Īpaši noderīgs šis marķieris ir pētījumos, kur tiek identificēti nezināmas rizosfēras baktērijas, lai noteiktu rizosfēras baktēriju daudzveidību. (1. tēze)
4. Noteikta 146 baktēriju celmu taksonomiskā piederība. Šajā pētījumā identificēta plaša baktēriju daudzveidība kolekcijas ietvaros: α -, β - un γ -proteobacteria, kā arī *Bacillus* klasei piederoši celmi. (2. tēze)
5. Alfa-proteobaktēriju klases ietvaros nenovēroja būtiskas baktēriju genotipu daudzveidības atšķirības starp vēsturiskās kolekcijas un jaunizdalītajiem celmiem. Savukārt visi identificētie β - un γ -proteobaktēriju celmi ir no jauna izdalīti celmi, 2016.–2019. g. Kopumā lielāka baktēriju daudzveidība novērojama starp jaunizdalītajiem baktēriju celmiem, kas izdalīti no tauriņziežu gumiņiem, salīdzinājumā ar vēsturiskās kolekcijas celmiem. (3. tēze)
6. Analizējot identificēto gumiņbaktēriju celmu izplatību pēc to piederības pie proteobaktēriju klases, novēroja, ka baktēriju daudzveidību ietekmē nevis paraugu ievākšanas ģeogrāfiskā atrašanās vieta, bet gan saimniekaugi, no kuriem tika izolēti baktēriju celmi. (4. tēze)
7. Vienīgais apkārtējās vides faktors, kas būtiski ierobežo gumiņbaktēriju daudzveidību, ir augsnes pH. Pārējie pētītie augsnes agroķīmisko rādītāju rezultāti (augsnas elektrovadītspēja, augsnes kālija, kalcija, nitrātu un fosfātu saturs) uzrādīja lielu datu izkliedi gan vērtējot pēc saimniekaugiem, gan pēc izdalītajām baktērijām. (5. tēze)
8. Veidojot tauriņziežu sēklu inokulācijas preparātu, jāvadās pēc šajā darbā izstrādātajām rekomendācijām, preparātā iekļaujot ne tikai saimniekaugam atbilstošus α -proteobaktēriju klases celmus (gumiņu veidošanai un slāpekļa saistīšanai), bet arī β - un γ -proteobaktēriju celmus – uzlabotai slāpekļa saistīšanai, kā arī augsnes fosfora savienojumu šķīdināšanai. (6. tēze)

PATEICĪBAS

Pētījums veikts projektu EUROLEGUME (“Tauriņziežu audzēšanas veicināšana Eiropā proteīna nodrošināšanai pārtikā un lopbarībā ilgtspējīgas lauksaimniecības apstākļos”), LegumeGap (“Augu olbaltumvielu ražošanas produktivitātes un ilgtspējības palielināšana Eiropā”) un ESF projekta ES29 (“LLU akadēmiskā personāla pilnveidošana”, Nr. 8.2.2.0/18/A/014) ietvaros.

Izsaku pateicību LBTU Augsnes un augu zinātņu institūta Augu bioloģijas nodaļas kolēģēm, īpaši Dr. agr. Lailai Dubovai par palīdzību izmēģinājumu veikšanā.

Paldies Lauksaimniecības fakultātes studentiem un citiem sadarbības partneriem par pretimnākšanu un atļaujas došanu paraugu ievākšanai izmēģinājuma laukos.

Paldies Dr. biol. Vilhelmīnei Šteinbergai par palīdzību un apmācību darbam ar gumiņbaktēriju kolekciju, kā arī liels paldies Dr. biol. Vizmai Nikolajevai par konsultēšanu mikrobioloģijas jautājumos.

Izsaku pateicību Dr. agr. Zintai Gailei, Dr. biol. Birutai Bankinai un Dr. agr. Līgai Lepsei par noderīgajiem ieteikumiem un labojumiem promocijas darba tapšanā

Paldies ģimenei un īpaši vīram Mārim par morālo atbalstu darba rakstīšanas procesā, kā arī meitiņai par pacietību un izturību darba tapšanas laikā.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Abolhasani M., Lakzian A., Tajabadipour A., Haghnia G. (2010). The study salt and drought tolerance of *Sinorhizobium* bacteria to the adaptation to alkaline condition. *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, Vol. 4, p. 882–886.
2. Abreu I., Cerda M.E., de Nanclares M.P., Baena I., Lloret J., Bonilla I., Bolanos L., Reguera M. (2012). Boron deficiency affects rhizobia cell surface polysaccharides important for suppression of plant defense mechanisms during legume recognition and for development of nitrogen-fixing symbiosis. *Plant Soil*, Vol. 361, p. 385–395.
3. Adamovičs A., Klāsens V. (2003). Simbiotiski saistītais slāpekļis Latvijas augsnēs: iespējas un problēmas. **No:** *Vide. Tehnoloģija. Resursi*. IV Starptautiskās zinātniski praktiskās konferences materiāli (2003. gada 26. –28. jūnijs). Rēzekne: Rēzeknes augstskola. 13. – 17. lpp.
4. Ahemad M., Kibret M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University – Science*, Vol. 26, p. 1–20.
5. Ahlawat A., Jain V., Nainawatee H.S. (1998). Effect of Low Temperature and Rhizospheric Application of Naringenin on Pea-Rhizobium *leguminosarum* biovar *viciae* Symbiosis. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 7, No. 1, p. 35–38.
6. Ahmed R., Solaiman A.R.M., Halder N.K., Siddiky M.A., Islam M.S. (2007). Effect of inoculation methods of *Rhizobium* on yield attributes, yield and protein content in seed of pea. *Journal of Soil and Nature*, Vol. 1, No. 3, p. 30–35.
7. Aiking H. (2011). Future Protein Supply. *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 22, No. 2–3, p. 112–120.
8. Akmentiņa Z. (2000). *Nitragīna gumiņbaktēriju iedzīvošanās un efektivitāte dārza pupiņās*: zinātniskais darbs bakalaurā grāda ieguvei. Latvijas Lauksaimniecības universitāte. Jelgava. 42 lpp.
9. Allen O.N., Hamatova E. (1973). USSR-4. **In:** *IBP World Catalogue of Rhizobium Collections*. Ed. by F.A. Skinner. Knapp, Drewett & Sons Ltd., Great Britain, p. 248–255.
10. Alexandre A., Oliveira S. (2013). Response to temperature stress in rhizobia. *Critical Reviews in Microbiology*, Vol. 39, No. 3, p. 219–228.
11. Alori E.T., Glick B.R., Babalola O.O. (2017). Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 8, 971.
12. Alsina I., Dubova L., Karlovska A., Steinberga V., Strauta L. (2016). Evaluation of effectiveness of *Rhizobium leguminosarum* strains on broad beans. *Acta Horticulturae*, Vol. 1142, p. 417–422.
13. Amarger N., Macheret V., Laguerre G. (1997). *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Vol. 47, p. 996–1006.
14. Andrés J.A., Rovera G., Guiñazú L.B., Pastor N.A., Rosas S.B. (2012). Interactions between legumes and rhizobia under stress conditions. **In:** *Bacteria in agrobiolgy: stress management*. Ed. by Maheshwari D.K. Springer, Berlin, p. 77–94.
15. Angus A.A., Hirsch A.M. (2010). Insights into the history of the legume-betaproteobacterial symbiosis. *Molecular Ecology*, Vol. 19, No. 1, p. 28–30.
16. Annan H., Golding A.L., Zhao Y., Dong Z. (2012). Choice of hydrogen uptake (Hup) status in legume-rhizobia symbioses. *Ecology and Evolution*, Vol. 2, No. 9, p. 2285–2290.

17. Ansevica A., Alsina I., Steinberga V. (2009). The evaluation of *Rhizobium leguminosarum* strains effectiveness in field beans (*Vicia faba* L.) at different soil microbiological activity. **In:** *Research for Rural Development 2009*, Annual 15th International Scientific Conference Proceedings, Jelgava, LLU, May 20–22, 2009. p. 71–75.
18. Anševica A., Alsina I., Šteinberga V., Dubova L. (2009). *Rhizobium leguminosarum* celmu ieviešanās novērtējums lauka pupu saknēs. **No:** *Ražas svētki "Vecauce – 2009" zinātniskā semināra rakstu krājums* (2009. gada 5. novembris). Vecauce: LLU. 7. – 8. lpp.
19. Antoun H., Beuchamp C.J., Goussard N., Chabot R., Lalande R. (1998). Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant Soil*, Vol. 204, p. 57–67.
20. Apenītis C. (1992). *Lucernas simbiotiskā slāpekļa saistīšana*: diplomdarbs, agronomijas specialitātē. Latvijas Lauksaimniecības universitāte. Jelgava. 95 lpp.
21. Arora N.K., Kang S.C., Maheshwari D.K. (2001). Isolation of siderophore producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *Curr. Sci.*, Vol. 81, p. 673–677.
22. Aserse A.A., Räsänen L.A., Aseffa F., Hailemariam A., Lindström K. (2012). Phylogenetically diverse groups of *Bradyrhizobium* isolated from nodules of *Crotalaria spp.*, *Indigofera spp.*, *Erythrina brucei* and *Glycine max* growing in Ethiopia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 65, No. 2, p. 595–602.
23. Baginsky C., Brito B., Scherson R., Pertuzé R., Seguel O., Cañete A., Araneda C., Johnson W.E. (2015). Genetic diversity of *Rhizobium* from nodulating beans grown in a variety of Mediterranean climate soils of Chile. *Archives of Microbiology*, Vol. 197, No. 3, p. 419–429.
24. Beattie G.A., Handelsman J. (1989). A rapid method for the isolation and identification of *Rhizobium* from root nodules. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 9, p. 29–33.
25. Beck D.P., Munns D.N. (1985). Effect of calcium on the phosphorus nutrition of *Rhizobium meliloti*. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, Vol. 49, p. 334–337.
26. Becker A., Puhler A. (1998). Production of exopolysaccharides. **In:** *Rhizobiaceae: molecular biology of plant-associated bacteria*. Ed. by. H.P. Spaink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas. Kluwer, Boston, p. 97–118.
27. Belicka I. (1968). *Rhizobium meliloti* Dangeard izplatība Latvijas PSR augsnēs un to simbiotiskā aktivitāte: disertācijas darbs bioloģijas zinātņu kandidāta grāda iegūšanai. Latvijas Lauksaimniecības akadēmija. Jelgava. 169 lpp.
28. Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A., Squartini A. (2004). Gammaproteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst. Appl. Microbiol.*, Vol. 27, p. 462–468.
29. Bertrand D., de Wolf A. (1967). Nickel, a dynamic trace element for higher plants. *C R Academic Sci.*, Vol. 265, p. 1053–1055.
30. Better M., Helinski D.R. (1983). Isolation and characterization of the recA gene of *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 155, No. 1, p. 155–156.
31. Bishop P.E., Guevara J.G., Engelke J.A., Evans H.J. (1976). Relation between Glutamine Synthetase and Nitrogenase Activities in the Symbiotic Association between *Rhizobium japonicum* and *Glycine max*. *Plant Physiology*, Vol. 57, No. 4, p. 542–546.
32. Bladergroen M.R., Spaink H.P. (1998). Genes and signal molecules involved in the rhizobia-leguminosae symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 1, No. 4, p. 353–359.
33. Blair M.W., Wu J., Wang S. (2016). Food Legume Diversity and Legume Research Policies. *Crop Journal*, Vol 4, No. 5m p. 339–343.

34. Bonilla I., Bolaños L. (2009). Mineral Nutrition for Legume-Rhizobia Symbiosis: B, Ca, N, P, S, K, Fe, Mo, Co and Ni: A Review. *In: Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants. Sustainable Agriculture Reviews*. Ed. by Lichtfouse E. Springer, Dodrecht. p. 253–274.
35. Bontemps C., Elliott G.N., Simon M.F., Dos Reis Junior F.B., Gross E., Lawton R.C., Neto N.E., de Fatima Loureiro M., de Faria S.M., Sprent J.I., James E.K., Young J.P.W. (2010). *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. *Molecular Ecology*, Vol. 19, No. 1, p. 44–52.
36. Borges W.L., Prin Y., Ducousso M., Le Roux C., de Faria S.M. (2016). Rhizobial characterization in revegetated areas after bauxite mining. *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 47, p. 314–321.
37. Bosworth A.H., Williams M.K., Albrecht K.A., Kwiatkowski R., Beynon J., Hankinson T.R., Ronson C.W., Cannon F., Wacek T.J., Triplett E.W. (1994). Alfalfa yield response to inoculation with recombinant strains of *Rhizobium meliloti* with an extra copy of *dctABD* and/or modified *nifA* expression. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 60, No. 10, p. 3815–3832.
38. Bottomley P.J. (1992). Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. *In: Biological Nitrogen Fixation*. Ed. by G. Stacey, R.H. Burris, H.J. Evans. Chapman and Hall, New York, p. 293–348.
39. Bourion V., Laguerre G., Depret G., Voisin A.S., Salon C., Duc G. (2007). Genetic variability in nodulation and root growth affects nitrogen fixation and accumulation in pea. *Annals of Botany*, Vol. 100, No. 3, p. 589–598.
40. Brkic S., Milakovic Z., Kristek A., Antunovic M. (2004). Pea yield and its quality depending on inoculation nitrogen and molybdenum fertilization. *Plant, Soil and Environment*, Vol. 50, No. 1, p. 39–45.
41. Brodrick S.J., Giller K.E. (1991). Genotypic difference in molybdenum accumulation affects N₂-fixation in tropical *Pharsalus vulgaris*. *J. Exp. Bot.*, Vol. 42, p. 1339–1343.
42. Broughton W.J., Jabbouri S., Perret X. (2000). Keys to Symbiotic Harmony. *Journal of Bacteriology*, Vol. 182, No. 20, p. 5641–5652.
43. Browman B., Kim B., Cho Y.J., Korlach J. (2015). Long-Read, Single-Molecule, Real-time (SMRT) DNA Sequencing for Metagenomic Applications. *In: Metagenomics for Microbiology*. Ed. by J. Izard, M.C. Rivera. Academic Press, p. 25–38.
44. Brown J.R., Masuchi Y., Robb F.T., Doolittle W.F. (1994). Evolutionary relationships of bacterial and archaeal glutamine synthetase genes. *Journal of Molecular Evolution*, Vol. 38, No. 6, p. 566–576.
45. Buerkert A., Cassman K.G., de la Piedra R., Munns D.N. (1990). Soil acidity and liming effects on stand, nodulation, and yield of common bean. *Agronomy Journal*, Vol. 82, p. 749–754.
46. Caballero-Mellado J., Martinez-Romero (1999). Soil fertilization limits the genetic diversity of *Rhizobium* in bean nodules. *Symbiosis*, Vol. 26, p. 111–121.
47. Callahan B.J., Wong J., Heiner C., Oh S., Theriot C.M., Gulati A.S., McGill S.K., Dougherty M.K., (2019). High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *Nucleic Acids Research*, Vol. 47. No. 18, p. e103.
48. Carlsson-Kanyama, A., González, A. D. (2009). Potential contributions of food consumption patterns to climate change. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89, 1704S–1709S.
49. Chen W.F., Wang E.T., Ji Z.J., Zhang J.J. (2020), Recent development and new insight of diversification and symbiosis specificity of legume rhizobia: mechanism and application. *AMI*, Vol. 131. No. 2, p. 553–563.

50. Chen W.M., Moulin L., Bontemps C., Vandamme P., Béna G., Boivin-Masson C. (2003). Legume symbiotic nitrogen fixation by β -proteobacteria is widespread in nature. *J. Bacteriol.*, Vol. 185, No. 24, p. 7266–7272.
51. Chen X.W., Yan G.H., Li J.L. (1988). Numerical Taxonomic Study of Fast-Growing Soybean Rhizobia and a Proposal that *Rhizobium fredii* Be Assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 38, No. 4, p. 392–397.
52. Christensen H., Kuhnert P., Olsen J.E., Bisgaard M. (2004). Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol., No. 5, p. 1601–1609.
53. Chu H., Fierer N., Lauber C.L., Caporaso J.G., Knight R., Grogan P. (2010). Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environ. Microbiol.*, Vol. 12, p. 2998–3006.
54. Coutinho H.L.C., De Oliveira V.M., Moreira F.M. (2000). Systematics of Legume Nodule Nitrogen Fixing Bacteria. *In: Applied Microbial Systematics*. Ed. by F.G. Priest, M. Goodfellow. Springer, Dodrecht, p. 107–134.
55. Crepon K., Marget P., Peyronnet C., Carrouee B., Arese P., Duc G. (2010). Nutritional value of faba bean (*Vicia faba* L.) seeds for feed and food. *Field Crops Research*, Vol. 115, p. 329–339.
56. Dai Z., Liu G., Chen H., Chen C., Wang J., Ai S., Wei D., Li D., Ma B., Tang C., Brookes P.C., Xu J. (2020). Long-term nutrient inputs shift soil microbial function profiles of phosphorus cycling in diverse agroecosystems. *The ISME Journal*, Vol. 14, p. 757–770.
57. Dakora F.D., Keya S.O. (1997). Contribution of legume nitrogen fixation to sustainable agriculture in Sub-Saharan Africa. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 29, No. 5-6, p. 809–817.
58. Dalton D.A., Evans H.J., Hanus F.J. (1985). Stimulation by nickel of soil microbial urease activity and urease and hydrogenase activities in soybeans grown in a low-nickel soil. *Plant and Soil*, Vol. 88, No. 2, p. 245–258.
59. Dash S., Gupta N. (2011). Microbial bioinoculants and their role in plant growth and development. *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research*, Vol. 2, p. 232–251.
60. de Castro Pires R., dos Reis Junior F.B., Zilli J.E., Fischer D., Hofmann A., James E.K., Simon M.F. (2018). Soil characteristics determine the rhizobia in association with different species of *Mimosa* in central Brazil. *Plant and Soil*, Vol. 423, No. 1–2, p. 411–428.
61. De Meyer S., De Beuf K., Vekeman B., Willems A. (2015). A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biol. And Biochem.*, Vol. 83, p. 1–11.
62. de Oliveria-Longatti S.M., de Sousa P.M., Marra L.M., Avelar Ferreira P.A., de Souza Moreira F.M. (2015). *Burkholderia fungorum* promotes common bean growth in dystrophic oxisol. *Annals of Microbiology*, Vol. 65, No. 4, p. 1825–1832.
63. Delgado M.J., Bedmar E.J., Downie J.A. (1998). Genes involved in the formation and assembly of rhizobial cytochromes and their role in symbiotic nitrogen fixation. *Adv. Microb. Physiol.*, Vol. 40, p. 191–231.
64. Denison R.F., Kiers E.T. (2011). Life histories of symbiotic rhizobia and mycorrhizal fungi. *Current Biology*, Vol. 21, No. 18, p. R775–785.
65. Denton M.D., Reeve W., Howieson J.G., Coventry D.R. (2003). Competitive abilities of common field isolates and a commercial strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* for clover nodule occupancy. *Soil biology and Biochemistry*, Vol. 35, No. 8, p. 1039–1048.

66. Dequiedt S., Thioulouse J., Jolivet C., Saby N.P.A., Lelievre M., Maron P.A., Martin M.P.m Prevost-Boure N.C., Toutain B., Arrouays D., Lemanceau P., Ranjard L. (2009). Biogeographical patterns of soil bacterial communities. *Environ.*
67. Deshpande U.S., Deshpande S.S. (1991). Legumes. *In: Foods of plant origin: production, technology, and human nutrition*. Ed. by D.K. Salunkhe, S.S. Deshpande. Springer Science & Business Media, Van Nostrand Reinhold, p. 137–300.
68. Dethlefsen L., Schmidt T.M. (2007). Performance of the Translational Apparatus Varies with the Ecological Strategies of Bacteria. *Journal of Bacteriology*, Vol. 189, No. 8, p. 3237–3245.
69. Dogra T., Priyadarshini A., Kumar K.A., Singh N.K. (2013). Identification of genes involved in salt tolerance and symbiotic nitrogen fixation in chickpea rhizobium *Mesorhizobium ciceri* Ca181. *Symbiosis*, Vol. 61, p. 135–143.
70. Drancourt M., Bollet C., Carlizot A., Martelin R., Gayral J.P., Raoult D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 38, No. 10, p. 3623–3630.
71. Drinkwater L.E., Wagoner P., Sarrantonio M. (1998). Legume based cropping systems have reduced carbon and nitrogen losses. *Nature*, Vol. 396, p. 262–265.
72. Dubova L. (2020). *Simbiotisko asociāciju ietekme uz pupu (Vicia faba L.) produktivitāti.: disertācija zinātņu doktora grāda iegūšanai lauksaimniecības un zivsaimniecības zinātnes, mežzinātnes nozarē*. Latvijas Lauksaimniecības universitāte, Jelgava, 126 lpp.
73. Dubova L., Alsina I., Sergejeva D., Šenberga A. (2015). *Rhizobium leguminosarum* un *Glomus* sp. ietekme uz cūku pupu augšanu. *Latvijas Lauksaimniecības universitātes Lauksaimniecības fakultātes, Latvijas Agronomu biedrības un Latvijas Lauksaimniecības un meža zinātņu akadēmijas zinātniski praktiskās konferences "Līdzsvarota Lauksaimniecība" raksti*, 121.–126. lpp.
74. 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*, Vol. 1, p. 34–39.
75. Dubova L., Šenberga A., Alsina I., Sergejeva D. (2016). Simbiotiskās sistēmas efektivitātes izvērtējums pupu (*Vicia faba* L.) sējumos. Ražas svētki "Vecauce – 2016: Lauksaimniecības zinātne nozares attīstībai", rakstu krājums, 20–23. lpp. ISBN: 9789984482408
76. Dwivedi S.L., Upadhyaya H.D., Balaji J., Buhariwalla H.K., Blair M.W., Ortiz R., Crouch J.H., Serraj R. (2006). Using genomics to exploit grain legume biodiversity in plant breeding. *In: Plant Breeding Reviews*. Ed. J. Janick. John Wiley & Sons, New York, p. 171–358.
77. Eardly B.D., Nour S.M., van Berkum P., Selander R.K. (2005). Rhizobial 16S rRNA and dnaK genes: mosaicism and the uncertain phylogenetic placement of *Rhizobium galegae*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, No. 3, p. 1328–1335.
78. Earl J.P., Adappa N.D., Krol J., Bhat A.S., Balashov S., Ehrlich R.L., Palmer J.N., Workman A.D., Blasetti M., Sen B., Hammond J., Cohen N.A., Enrich G.D., Chang Mell J. (2018). Species-level bacterial community profiling of the healthy sinonasal microbiome using Pacific Biosciences sequencing of full-length 16S rRNA genes. *Microbiome*, Vol., 6, p. 190.
79. Eisen J.A. (1995). The RecA protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species. *Journal of Molecular Evolution*, Vol. 41, No. 6, p. 1105–1123.
80. Elboutahiri N., Thami-Alami I., Udupa S.M. (2010). Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. *BMC Microbiol.*, Vol. 10, p. 15.

81. Elsheikh E.A.E., Wood M. (1995). Nodulation and nitrogen fixation by soybean inoculated with salt-tolerant rhizobia or salt-sensitive bradyrhizobia in saline soil. *Soil Biol. Biochem.*, Vol. 27, p. 657–661.
82. Espinoza L., Slaton N., Mozaffari M. (2021). Understanding the Numbers on Your Soil Test Report. *University of Arkansas, Fayetteville*, <https://www.uaex.uada.edu/publications/PDF/FSA-2118.pdf>
83. Evans H.J., Burris R.H. (1992). Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the Last 50 Years. **In:** *Biological Nitrogen Fixation*. Ed. by G. Stacey, R.H. Burris, H.J. Evans. Chapman and Hall, New York, p. 1–42.
84. Fageria N.K., Stone L.F., Santos A.B. (2015). Molybdenum requirements of dry bean with and without limiting. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, Vol. 46, p. 956–978.
85. Fernandez L.A., Zalba P., Gomez M.A., Sagardoy M.A. (2007). Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soils and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. *Biol. Fertil Soils*, Vol. 43, p. 805–809.
86. Fierer N., Jackson R.B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 103, p. 626–631.
87. Filipovičs J. (1970). *Lopbarības un seradelas gumiņbaktēriju izplatība Latvijas PSR augsnēs, to fizioloģiskās īpašības un efektivitāte*: disertācija bioloģijas zinātņu kandidāta grāda iegūšanai. Latvijas Lauksaimniecības akadēmija. Jelgava. 292 lpp.
88. Fischer H.M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiological Reviews*, Vol. 58, No. 3, p. 352–386.
89. Frayse N., Couderc F., Poinso V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *European Journal of Biochemistry*, Vol. 270, No. 7, p. 1365–1380.
90. Fred E.B., Baldwin I.L., McCoy E. (1932). *Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants*. Madison: The University of Wisconsin Press. 262 p.
91. Gage D.J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 68, No. 2, p. 280–300.
92. Gaunt M.W., Turner S.L., Rigottier-Gois L., Lloyd-Macgilp S.A., Young J.P. (2001). Phylogenies of atpD and recA support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 51, No. 6, p. 2037–2048.
93. Ghosh P.K., Maiti T.K. (2016). Structure of extracellular polysaccharides (EPS) produced by rhizobia and their functions in legume-bacteria symbiosis: - a review. *Achievements in the Life Sciences*, Vol. 10, No. 2, p. 136–143.
94. Giller K.E., Herridge D.F., Sprent J.I. (2016). The legume-rhizobia symbiosis and assessing the need to inoculate. **In:** *Working with Rhizobia*. Ed. by J.G. Howieson, M.J. Dilworth, Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, p. 15–24.
95. Gillings M., Holley M. (1997). Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 25, No. 1, p. 17–21.
96. Gnat S., Malek W., Olenska E., Wdowiak-Wrobel S., Kalita M., Lotocka B., Wojcik M. (2015). Phylogeny of symbiotic genes and the symbiotic properties of rhizobia specific to *Astragalus glycyphyllos* L. *PLoS ONE*, Vol. 10, No. 10, p. e0141504.
97. Goel A.K., Sindhu S.S., Dadarwal K.R. (2002). Stimulation of nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Pseudomonas* spp. antagonistic to fungal pathogens, *Biol. Fertil. Soil*, Vol. 36, p. 391–396.

98. Graham P.H. (1981). Some problems of nodulation and symbiotic fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: A review. *Field Crops Res.*, Vol. 4, p. 93–112.
99. Graham P.H. (1992). Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 38, No. 6, p. 475–484.
100. Graham P.H. (2008). Ecology of the root-nodule bacteria of legumes. *In: Nitrogen-fixing leguminous symbioses*. Ed. by M.J. Dilworth, E.K. James, J.I. Sprent, W.E. Newton, Springer, The Netherlands, p. 23–58.
101. Graham P.H., Draeger K.J., Ferrey M.L., Conroy M.J., Hammer B.E., Martinez E., Aarons S.R., Quinto C. (1994). Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 40, No. 3, p. 198–207.
102. Graham P.H., Vance C.P. (2000). Nitrogen fixation in perspective, an overview of research and extension needs. *Field Crops Res.*, Vol. 65, p. 93–106.
103. Hamblin A.P., Tennant D. (1987). Root length density and water uptake in cereals and grain legumes: how well are they correlated. *Crop Pasture Sci.*, Vol. 38, p. 513–527.
104. Hara F., de Oliveira L.A. (2004). Physiological and ecological characteristics of rhizobia isolated deriving of acid and alic soils of Presidente Figueiredo. *Acta Amazon*, Vol. 34, p. 343–357.
105. Hartmann A., Amarger N. (1991). Genotypic diversity of an indigenous *Rhizobium meliloti* field population assessed by plasmid profiles, DNA fingerprinting, and insertion sequence typing. *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 37, No. 8, p. 600–608.
106. Hassler H.B., Probert H., Moore C., Lawson E., Jackson R.W., Russell B.T., Richards V.P. (2022). Phylogenies of the 16S rRNA gene and its hypervariable regions lack concordance with core genome phylogenies. *Microbiome*, Vol. 10, article No. 104.
107. Hemkemeyer M., Dohrmann A.B., Christensen B.T., Tebbe C.C. (2018). Bacterial preferences for specific soil particle size fractions revealed by community analyses. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 9, No. 149, p. 1–13.
108. Hirsch A. (2009). *Brief history of the Discovery of Nitrogen-fixing Organisms*. [Tiešsaiste] [skatīts 10.11.2018.]. Pieejams: <https://bit.ly/2qFjhKY>
109. Howieson J.G., O'Hara G.W., Carr S.J. (2000). Changing roles for legumes in Mediterranean agriculture: developments from and Australian perspective. *Field Crops Research*, Vol. 65, No. 2–3, p. 107–122.
110. Hungria M., Menna P., Delamuta J.R.M. (2015). *Bradyrhizobium*, the Ancestor of All Rhizobia: Phylogeny of Housekeeping and Nitrogen-Fixation Genes. *In: Biological Nitrogen Fixation, Volume 1*. Ed. by F.J. de Bruijn. John Wiley & Sons, Inc, 191–202.
111. Ibal J.C., Pham H.Q., Park C.E., Shin J.H. (2019). Information about variations in multiple copies of bacterial 16S rRNA genes may aid in species identification. *PLoS ONE*, Vol. 14, No. 2, e:0212090.
112. Ibrahim M., Iqbal M., Tang Y.T., Khan S., Guan D.X., Li G. (2022). Phosphorus Mobilization in Plant-Soil Environments and Inspired Strategies for Managing Phosphorus: A Review. *Agronomy*, Vol. 12, p. 2539–2022.
113. Iyer B., Rajkumar S. (2018). Rhizobia. *In: Reference Module in Life Sciences*. Elsevier, 261–277
114. Jallinoja P., Nivaa M., Latvalab T. (2016). Future of sustainable eating? Examining the potential for expanding bean eating in a meat-eating culture. *Futures*, Vol 83, p. 4–14.
115. Janczarek M., Jaroszuk-Sciseł J., Skorupska A. (2009). Multiple copies of *rosR* and *pssA* genes enhance exopolysaccharide production, symbiotic competitiveness and clover nodulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Vol. 96, No. 4, p. 471–486.

116. Janczarek M., Kalita M., Skorupska A.M. (2009). New taxonomic markers for identification on *Rhizobium leguminosarum* and discrimination between closely related species. *Archives Microbiology*, Vol. 191, No. 3, p. 207–219.
117. Janczarek M., Skorupska A. (2003). Exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* is related to various metabolic pathways. *Research Microbiology*, Vol. 153, No. 6, p. 433–442.
118. Janda J.M., Abbott S.L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 45, No. 9, p. 2761–2764.
119. Jansone I., Zute S., Treikale O. (2016). Pākšaugi bioloģiskajā saimniekošanas sistēmā. **No:** *Līdzsvarota lauksaimniecība*, Zinātniski praktiskās konferences raksti (2016. g. 25.–26. febr.). Jelgava: LLU, 35. – 39. lpp.
120. Jarvis B.D.W., van Berkum P., Chen W.X., Nour S.M., Fernandez M.P., Cleyet-Marel J.C., Gills M. (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 47, No. 3, p. 895–898.
121. Jensen H.L. (1961). Survival of *Rhizobium meliloti* in soil culture. *Nature*, Vol. 192, p. 682–683.
122. Johnson J.S., Spakowicz D.J., Hong B.Y., Petersen L.M., Demkowicz P., Chen L., Leopold S.R., Hanson B.M., Agresta H.O., Gerstein M., Sodergren E., Weinstock G.M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, Vol. 10, p. 5029.
123. Jolliffe I.T., Cadima J. (2016). Principal component analysis: A review and recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, Vol. 374, p. 2065.
124. Justino G.C., Sodek L. (2013). Recovery of nitrogen fixation after short-term flooding of the nodulation root system of soybean. *J. Plant Physiol.*, Vol. 170, p. 235–241.
125. Kalnins A., Klasens V., Leimane I. (1966). Activity and specificity of root nodule bacteria *Rhizobium leguminosarum*. **In:** *IX International congress for microbiology*, abstract of papers to be presented at local topic sessions, Moscow, July 24–30.
126. Kalniņš A. (1938). Gaisa slāpekļa saistīšana un mineralizācija. *Latvijas Universitātes raksti*, Nr. 2. (4), 41. – 64. lpp.
127. Kalniņš A. (1949). Bakteriofagu ietekme uz āboliņa augšanu un attīstību. *Latvijas PSR Zinātņu akadēmijas vēstis*, Nr. 8 (25), 103. – 115. lpp.
128. Kalniņš A. (1957). Āboliņa gumiņbaktēriju izplatība Latvijas PSR augsnēs. **No:** *Bioloģijas zinātne lauksaimniecībai un mežsaimniecībai*, 3. sējums. Rīga: Latvijas PSR Zinātņu akadēmijas izdevniecība, 21. – 22. lpp.
129. Kalniņš A. (1959). Āboliņa gumiņbaktēriju nitragīna rašu ieviešanās āboliņa rizosfērā un to līdzdalība gumiņu veidošanā. *Latvijas PSR Zinātņu akadēmijas vēstis*, Nr. 11 (148), 133. – 140. lpp/
130. Kalniņš A. (1964). Bakteriālos mēslošanas līdzekļus – katrā saimniecībā. *Latvijas Lauksaimniecības akadēmijas raksti*, Nr. 15, 17. – 25. lpp.
131. Kalniņš A., Klincāre A.J., Krēsliņa D., Lauzne A., Klincāre A.A. (1957). *Bakteriālie mēslošanas līdzekļi*. Rīga: Latvijas PSR zinātņu akadēmijas izdevniecība, 75 lpp.
132. Kawaka F., Dida M.M., Opala P.A., Ombori O., Maingi J., Osoro N., Muthini M., Amoding A., Mukaminega D., Muoma J. (2014). Symbiotic efficiency of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in soils of Western Kenya. *International Scholarly Research Notices*, Vol., 2014, p. 1–8.

133. Kawaka F., Makonde H., Dida M., Opala P., Ombori O., Maingi J., Muoma J. (2018). Genetic diversity of symbiotic bacteria nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris*) in western Kenya. *PLOS ONE*, Vol. 13, No. 11, p. e0207403.
134. Kennedy A.C., Smith K.I. (1995). Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant Soil*, Vol. 170, p. 75–86.
135. Kent A.D., Wojtasiak M.L., Robleto E.A., Triplett E.W. (1998). A transposable partitioning locus used to stabilize plasmid-borne hydrogen oxidation and trifolitoxin production genes in *Sinorhizobium* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 64, No. 5, p. 1657–1662.
136. Kijne J.W. (1992). The *Rhizobium* infection process. **In:** *Biological Nitrogen Fixation*. Ed. by G. Stacey, R.H. Burris, H.J. Evans. Chapman and Hall, New York, p. 349–398.
137. Kim K.Y., Jordan D., Krishnan H.B. (1997). *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from osybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 153, p. 273–277.
138. Klāsens V. (1967). *Rhizobium leguminosarum* Frank. izplatība Latvijas PSR augsnēs un to simbiozes aktivitāte: disertācijas zinātniskais referāts bioloģijas zinātņu kandidāta grāda iegūšanai. Jelgava: Latvijas Lauksaimniecības akadēmija. 230 lpp.
139. Klāsens V. (1994). *Gumiņbaktēriju simbiotiskā efektivitāte Latvijas augsnēs: zinātniskā darba kopsavilkums Dr. hab. lauks. zinātniskā grāda ieguvei*. Jelgava: LLU. 58 lpp.
140. Knight R. (2012). Produce quality: bulk and niche market opportunities for food and feed. Linking Research and Marketing Opportunities for Pulses in the 21st Century. **In:** *Proceedings of the Third International Food Legumes Research Conference*, p. 167–171.
141. Kohler U., Luniak M. (2005). Data inspection using biplots. *Stata Journal*, Vol. 5, No. 2, p. 208–223.
142. Kondorosi E., Gyuris J., Schmidt., John M., Duda E., Hoffmann B., Schell J., Kondorosi A. (1989). Positive and negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. *The EMBO Journal*, Vol. 8, No. 5, p. 1331–1340.
143. Konstantinidis K.T., Tiedje J.M. (2005). Towards a Genome-Based Taxonomy for Prokaryotes. *Journal of Bacteriology*, Vol. 187, No. 18, p. 62586264.
144. Koskey G., Mburu S.W., Kimiti J.M., Ombori O., Maingi J.M., Njeru E.M. (2018). Genetic characterization and diversity of *Rhizobium* isolated from nodules on mid-altitude climbing bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Front. Microbiol.*, Vol. 15, 9, doiL 10.3389/fmicb.2018.00968.
145. Krol J.E., Mazur A., Marczak M., Skorupska A. (2006). Synthetic arrangements of the surface polysaccharide biosynthesis genes in *Rhizobium leguminosarum*. *Genomics*, Vol. 89, No. 2, p. 237–247.
146. Kwon S.W., Park J.Y., Kim J.S., Kang J.W., Cho Y.K., Lim C.K., Parker M.A., Lee G.B. (2005). Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol., 55, p. 263–270.
147. Ķirse A. (2017). *Progresīvu apstrādes paņēmieni ietekme uz pākšaugu pastēšu kvalitāti uzglabāšanās laikā: zinātniskā darba kopsavilkums Dr. sc. ing. zinātniskā grāda ieguvei*. Jelgava: LLU. 55 lpp.
148. Laguerre G., Louvrier P., Allard M.R., Amarger N. (2003). Compatibility of Rhizobial Genotypes within Natural Populations or *Rhizobium leguminosarum* Biovar *viciae* for Nodulation of Host Legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 4, p. 2276–2283.
149. Laguerre G., Nour S.M., Macheret V., Sanjuan J., Drouin P., Amarger N. (2001). Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close

- phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, Vol. 147, No. 4, p. 981–983.
150. Lai C.C., Teng L.J., Hsueh P.R., Yuan A., Tsai K.C., Tang J.L., Tien H.F. (2004). Clinical and microbiological characteristics of *Rhizobium radiobacter* infections. *Clinical Infectious diseases*, Vol. 38, No. 1, p. 149–153.
 151. Laicāne T. (1981). *Divu gumiņbaktēriju celmu specifiskums uz dažādām āboliņa šķirnēm*: diplomdarbs. Latvijas Lauksaimniecības akadēmija. Jelgava. 89 lpp.
 152. Laranjo M., Oliveira S. (2011). Tolerance of *Mesorhizobium* type strains to different environmental stresses. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Vol. 99, No. 3, p. 651–662.
 153. Lauber C.L., Hmady M., Knight R., Fierer N. (2009). Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, No. 15, p. 5111–5120.
 154. *Lauksaimniecības leksikons* (1937a). 1. daļa, Baktēriju potēšana augsnā. Rīga: Zelta Grauds. 289. – 290. lpp.
 155. *Lauksaimniecības leksikons* (1937b). 1. daļa, Gaisa slāpekļa saistīšana. Rīga: Zelta Grauds. 673. – 675. lpp.
 156. Leite J., Fischer D., Rouws L.F.M., Fernandes-Junior P.I., Hofmann A., Kublik S., Schlöter M., Xavier G.R., Radl V. (2017). Cowpea nodules harbor non-rhizobial bacterial communities that are shaped by soil type rather than plant genotype. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 7, p. 2064.
 157. Leyva A., Palacios J.M., Murillo J., Ruiz-Argüeso T. (1990). Genetic organization of the hydrogen uptake (hup) cluster from *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 172, No. 3, p. 1647–1655.
 158. Liepiņa L. (2007). *Gumiņbaktēriju Rhizobium lupini ietekme uz lupīnas augšanu un attīstību*: zinātniskais darbs bakalaura grāda ieguvei. Latvijas Lauksaimniecības universitāte, Jelgava. 33 lpp.
 159. Lindström K. (1989). *Rhizobium galegae*, a New Species of Legume Root Nodule Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 39, No. 3, p. 365–367.
 160. Lindström K., Murwira M., Willems A., Altier N. (2010). The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in Microbiology*, Vol. 161, p. 453–463.
 161. Lira Junior M., Lima A., Arruda J., Smith D. (2005). Effect of root temperature on nodule development of bean, lentil and pea. *Soil biology and Biochemistry*, Vol 37, No. 2, p. 235–239.
 162. Long S.R. (2001). Genes and Signals in the *Rhizobium*-Legume Symbiosis. *Plant Physiology*, Vol. 125, p. 69–72.
 163. Lorenzi A.S., Bonatelli M.L., Chia M.A., Peressim L., Quecine M.C. (2022). Opposite sides of *Pantoea agglomerans* and its associated commercial outlook. *Microorganisms*, Vol. 10, p. 2072.
 164. Lotiņa I. (1985). *Lucernas gumiņbaktēriju celmu iedzīvošanās saknēs un to efektivitāte*: diplomdarbs. Latvijas Lauksaimniecības akadēmija. Jelgava. 89 lpp.
 165. Lynch D.H., Smith D.L. (1994). The effects of low root-zone temperature stress on two soybean (*Glycine max*) genotypes when combined with *Bradyrhizobium* strains of varying geographic origin. *Physiologia Plantarum*, Vol. 90, p. 105–113.
 166. Marnauza A. (1965). *Slāpekļa un kālija ietekme uz lopbarības pupu un gumiņbaktēriju simbiozes efektivitāti*: disertācija bioloģijas zinātņu kandidāta grāda iegūšanai. Latvijas Lauksaimniecības akadēmija. Jelgava. 229 lpp.
 167. Martinez-Hidalgo P. (2017). The nodule microbiome: N₂ fixing rhizobia do not live alone. *Phytobiomes J.*, Vol. 1, p. 70–82.

168. Martinez-Romero E. (2009). Coevolution of *Rhizobium*-legume symbiosis? *DNA Cell Biol.*, Vol. 28, p. 361–370.
169. Martinez-Romero E., Caballero-Mellado J. (1996). *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit. Rev. Plant. Sci.*, Vol. 15, p. 113–140.
170. Mathis R., Van Gijsegem F., De Rycke R., D’Haeze W., Van Maelsaeke E., Anthonio E., Van Montagu M., Holsters M., Vereecke D. (2005). Lipopolysaccharides as a communication signal for progression of legume endosymbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 102, No. 7, p. 2655–2660.
171. Mazur A., De Meyer S.E., Tian R., Wielbo J., Zebracki K., Seshadri R., Reddy T.B.K., Markowitz V., Ivanova N.N., Pati A., Woyke T., Kyrpides N.C., Reeve W. (2015). High-quality permanent draft genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* strain GB30; an effective microsymbiont of *Pisum sativum* growing in Poland. *Standards in Genomic Sciences*, Vol. 10, No. 36, p. 1–7.
172. Mazur A., Stasiak G., Wielbo J., Kubik-Komar A., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A. (2011). Intergenomic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* clover nodule isolates. *BMC Microbiology*, Vol. 11, No. 123, p. 1–15.
173. Mārks B. (1971). *Fosfora ietekme uz dzeltenās lopbarības lupīnas (Lupinus luteus L.) slāpekļa asimilāciju*: disertācija bioloģijas zinātņu kandidāta grāda iegūšanai. Latvijas Lauksaimniecības akadēmija. 184 lpp.
174. Menna P., Pereira A.A., Bangel E.V., Hungria M. (2009). Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. *Symbiosis*, Vol. 48, No. 1–3, p. 120–130.
175. Mignard S., Flandrois J.P. (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 67, No. 3, p. 574–581.
176. Miklashevichs E., Röhrig H., Schell J., Schmidt J. (2010). Perception and Signal Transduction of Rhizobial NOD Factors. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Vol. 20, No. 4, p. 373–394.
177. Minamisawa K., Itakura M., Suzuki M., Ichige K., Isawa T., Yuhuashi K., Mitsui H. (2002). Horizontal transfer of nodulation genes in soils and microcosms from *Bradyrhizobium japonicum* to *B. elkanii*. *Microbes and Environments*, Vol. 17, p. 82–92.
178. Mora Y., Díaz R., Vargas-Lagunas C., Peralta H., Guerrero G., Aguilar A., Encarnación S., Girard L., Mora J. (2014). Nitrogen-fixing rhizobial strains isolated from common bean seeds: phylogeny, physiology, and genome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 80, p. 5644–5654.
179. Moulin L., Munive A., Dreyfus B., Boivin-Masson C. (2001). Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteovacteria. *Letters to Nature*, Vol. 411, p. 948–950.
180. Munevar F., Wollum A.G. (1981). Growth of *Rhizobium japonicum* strains at temperatures above 27 °C. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 42, p. 272–276.
181. Murray R.G.E., Brenner D.J., Colwell R.R., de Vos P., Goodfellow M., Grimont P.A.D., Pfennig N., Stackebrandt E., Zavarzin G.A. (1990). Report of the Ad Hoc Committee on Approaches to Taxonomy within the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 40, No. 2, p. 213–215.
182. Mutch L.A., Young J.P. (2004). Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* on wild and cultivated legumes. *Molecular Ecology*, Vol. 13, No. 8, p. 2435–2444.

183. Namdari H., Hamzavi S., Peairs R.R. (2003). Rhizobium (Agrobacterium) radiobacter identified as a cause of chronic endophthalmitis subsequent to cataract extraction. *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 41, No. 8. p. 3998–4000.
184. Navarro R.B., Vargas A.A., Schröder E.C., van Berkum P. (1993). Uptake Hydrogenase (Hup) in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 59, No. 12, p. 4161–4165.
185. Naveed M., Mehboob I., Hussain M.B., Zahir Z.A. (2015). Perspectives of Rhizobial Inoculation for Sustainable Crop Production. *In: Plant Microbes Symbiosis: Applied Facts*. Ed. by N.K. Arora. Springer, India, p. 209–239.
186. Naveed M., Mubeen S., Khan S.U., Ahmed I., Khalid N., Suleria H.A.R., Bano A., Mumtaz A.S. (2014). Identification and characterization of rhizospheric microbial diversity by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 45, No. 3, p. 985–993.
187. Nguyen T.H., Deaker R., Kennedy I.R., Roughley R.J. (2003). The positive yield response of field-grown rice to inoculation with a multi-strain biofertilizer in the Hanoi area, Vietnam. *Symbiosis*, Vol. 35, p. 231–245.
188. Nollendorfs V., Āboliņa L. (2023). Laukaugu minerālās barošanās diagnostika un optimizācija. *No: Augu minerālās barošanās diagnostika un mēslošanas optimizācija*. Red. V. Nollendorfs, A. Osvalde, G. Čekstere, A. Karlsons, L. Āboliņa. LLU Akadēmiskais apgāds, Rīga, 71.–82. Lpp.
189. Nollendorfs V., Karlsons A. (2023). Augsnes reakcija (pH) un tās optimizācija. *No: Augu minerālās barošanās diagnostika un mēslošanas optimizācija*. Red. V. Nollendorfs, A. Osvalde, G. Čekstere, A. Karlsons, L. Āboliņa. LLU Akadēmiskais apgāds, Rīga, 24. – 37. lpp.
190. Norse D. (2005). Non-point pollution from crop production: global, regional and national issues. *Pedosphere*, Vol. 15, No. 4, p. 1–10.
191. Nyoki D., Ndakidemi P.A. (2016). Intercropping System, Rhizobia Inoculation, Phosphorus and Potassium Fertilization: A Strategy of Soil Replenishment for Improved Crop Yield. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences ISSN*, Vol. 5, No. 10, p. 504–522.
192. Nzoué A., Miché L., Klonowska A., Laguerre G., de Lajudie P., Moulin L. (2009). Multilocus sequence analysis of bradyrhizobia isolated from *Aeschynomene* species in Senegal. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 32, No. 6, p. 400–412.
193. Ogutcu H., Adiguzel A., Gulluce M., Karadayi M., Sahin F. (2009). Molecular Characterization of *Rhizobium* Strains Isolated from Wild Chickpeas Collected from High Altitudes in Erzurum-Turkey. *Romanian Biotechnological Letters*, Vol. 14, No. 2, p. 4294–4300.
194. O'Hara G.W. (2001). Nutritional constraints on root nodule bacteria affecting symbiotic nitrogen fixation: a review. *Aust. J. Exp. Ag.*, Vol. 41, p. 417–433.
195. O'Hara G.W., Boonkerd N., Dilworth M.J. (1988). Mineral constraints to nitrogen fixation. *Plant and Soil*, Vol. 108, p. 93–110.
196. O'Hara G.W., Zilli J.E., Poole P.S., Hungria M. (2016). Taxonomy and physiology of rhizobia. *In: Working with rhizobia*. Ed. by J.G. Howieson, M.J. Dilworth. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, p.125–144.
197. Oldroyd G.E., Downie J.A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, Vol. 59, p. 519–546.
198. Österman J., Marsh J., Laine P.K., Zeng Z., Alatalo E., Sullivan J.T., Young J.P.W., Thomas-Oates L., Paulin L., Lindström K. (2014). Genome sequencing of two *Neorhizobium galegae* strains reveals a *noeT* gene responsible for the unusual acetylation of the nodulation factors. *BMC Genom.*, Vol. 15, p. 500.

199. Pankhurst C.E., Gibson A.H. (1973). Rhizobium Strain Influence on Disruption of Clover Nodule Development at High Root Temperature. *Journal of General Microbiology*, Vol 74, p. 219–231.
200. Parniske M., Downie J.A. (2003). Plant biology: locks, keys and symbioses. *Nature*, Vol. 425, p. 569–570.
201. Paulucci N.S., Medeot D.B., Dardanelli M.S., de Lema M.G. (2011). Growth temperature and salinity impact fatty acid composition and degree of unsaturation in peanut-nodulating rhizobia. *Lipids*, Vol 46, No. 5, p. 435–441.
202. Pawar V., Pawar P.R., Bhosale A.M., Chavan S.V. (2014). Effect of *Rhizobium* on Seed Germination and Growth of Plants. *Journal of Academia and Industrial Research*, Vol. 3, No. 2, p. 84–88.
203. Pei A.Y., Oberdorf W.E., Nossa C.W., Agarwal A., Chokshi P., Gerz E.A., Jin Z., Lee P., Yang L., Poles M., Brown S.M., Sotero S., Desantis T., Brodie E., Nelson K., Pei Z. (2010). Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. *Applied and environmental microbiology*, Vol., 76, p. 3886–3897.
204. Peoples M.B., Herridge D.F., Ladha J.K. (1995). Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant and Soil*, Vol. 174, No. 1–2, p. 3–28.
205. Perez-Montano F., Alias-Villegas C., Bellogin R.A., del Cerro P., Espuny M.R., Jiménez-Guerrero L., López-Baena F.J., Ollero F.J., Cubo T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiol. Res.*, Vol. 169, p. 325–336.
206. Perret X., Staehelin C., Broughton W.J. (2000). Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 64, No. 1, p. 180–201.
207. Petrēvics P. (2021). *Simbiozes ietekme uz sojas ražu un tās formēšanos zemnieku saimniecībā SIA "Ezermaļi-3": zinātniskais darbs bakalaura grāda un agronoma kvalifikācijas ieguvei*. Latvijas Lauksaimniecības universitāte. Jelgava. 43 lpp.
208. Pimentel, D., & Pimentel, M. (2003). Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 78, p. 660S–663S.
209. Pongsilp N., (2012). *Phenotypic and Genotypic Diversity of Rhizobia*. Thailand: Bentham eBooks. 194 p.
210. Pootakham W., Mhuantong W., Yoocha T., Putchim L., Chutima S., Chaiwat N., Thongtham N., Tangphatsornruang S. (2017). High resolution profiling of coral associated bacterial communities using full-length 16S rRNA sequence data from PacBio SMRT sequencing system. *Scientific Reports*, Vol. 7, p. 2774.
211. Rahal S., Chekireb D. (2021). Diversity of rhizobia and non rhizobia endophytes isolated from root nodules of *Trifolium* sp. growing in lead and zinc mine site Guelma, Algeria. *Arch. Microbiol.*, Vol. 203, p. 3839–3849.
212. Rahmani H., Saleh-Rastin N., Khavazi K., Asgharzadeh A., Fewer D., Kiani S., Lindstrom K. (2009). Selection of thermotolerant *Bradyrhizobial* strains for nodulation of soybean (*Glycine max* L.) in semi-arid regions of Iran. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 25, p. 591–600.
213. Ramirez M.D.A., Espana M., Aguirre C., Kojima K., Ohkama-Ohtsu N., Sekimoto H., Yokoyama T. (2019). *Burkholderia* and *Paraburkholderia* are predominant soybean rhizobial genera in Venezuelan soils in different climatic and topographical regions. *Microbes and Environments*, Vol. 34, No. 1, p. 43–58.
214. Ratner B. (2009). The correlation coefficient: Its values range between 1/1, or do they. *Journal of Targeting, Measurement and Analysis for Marketing*, Vol. 17, No. 2, p. 139–142.

215. Raymond N.S., Gomez-Munoz B., van der Bom F.T., Nybroe O., Jensen L.S. (2021). Phosphate-solubilising microorganisms for improved crop productivity: a critical assessment. *New Phytologist*, Vol. 229, No. 3, p. 1268–1277.
216. Redondo-Nieto M., Wilmot A.R., El-Hamdaoui A., Bonilla L., Bolaños L. (2003). Relationship between boron and calcium in the N₂-fixing legume-rhizobia symbiosis. *Plant, Cell & Environment*, Vol 26, No. 11, p. 1905–1915.
217. Reeve W.G., Tieari R.P., Dilworth M.J. Grenn A.R. (1993). Calcium affects the growth and survival of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biol. Biochem.*, Vol. 25, No. 5, p. 581–586.
218. Reeve W.G., Tiwari R.P., Melino V., De Meyer S., Poole P.S. (2016a). Specialised genetic techniques for rhizobia. **In:** *Working with rhizobia*. Ed. by J.G. Howieson, M.J. Dilworth. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, p. 245–282.
219. Reeve W.G., Tiwari, R.P., Melino V., Poole P.S. (2016b). Fundamental molecular techniques for rhizobia. **In:** *Working with rhizobia*. Ed. by J.G. Howieson, M.J. Dilworth. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, p. 221–243.
220. Rejili M., Mahdhi M., Fterich A., Dhaoui S., Guefrachi I., Abdeddayem R., Mars M. (2012). Symbiotic nitrogen fixation of wild legumes in Tunisia: soil fertility dynamics, field nodulation and nodules effectiveness. *Agric. Ecosyst. Environ.*, Vol. 157, p. 69–69.
221. Roberts R., Jackson R.W., Mauchline T.H., Hirsch P.R., Shaw L.J., Doring T.F., Jones H.E. (2017). Is there sufficient *Ensifer* and *Rhizobium* species diversity in UK farmland soils to support red clover (*Trifolium pretense*), white clover (*T. repens*), Lucerne (*Medicago sativa*) and black medic (*M. lupulina*)? *Applied Soil Ecology*, Vol., 120, p. 35–43.
222. Rochon J.J., Doyle C.J., Greef J.M., Hopkins A., Molle G., Sitzia M., Scholefield D., Smith C.J. (2004). Grazing legumes in Europe: a review of their status, management, benefits, research needs and future prospects. *Grass and Forage Science*, Vol. 59, No. 3, p. 197–214.
223. Rodriguez H., Fraga R., Gonzalez T., Bashan Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth promoting bacteria. *Plant Soil*, Vol. 287, p. 15–21.
224. Rosselli R., Romoli O., Vitulo N., Vezzi A., Campanaro S., de Pascale F., Schiavon R., Tiarca M., Poletto F., Concheri G., Valle G., Squartini A. (2016). Direct 16S rRNA-seq from bacterial communities: a PCR-independent approach to simultaneously assess microbial diversity and functional activity potential of each taxon. *Scientific Reports*, Vol. 6, p. 32165.
225. Rossello-Mora R., Amann R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 25, p. 39–67.
226. Roughley P.J., Dart P.J. (1970). Root temperature and root-hair infection of *Trifolium subterraneum* L. cv. Cranmore. *Plant and Soil*, Vol. 32, No. 2, p. 518–520.
227. Rousk J., Baath E., Brookes P.C., Lauber C.L., Lozupone C., Caporaso J.G., Knight R., Fierer N. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal*, Vol. 4, p. 1340–1351.
228. Ruiz-Argüeso T., Imperial J., Palacios J.M. (2000). Uptake hydrogenases in root nodule bacteria. **In:** *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for Analysis of a Biological Process*. Ed. by E.W. Triplett. Horizon Scientific Press, Wymondham, United Kingdom, p. 489–507.
229. Runcis A. (1997). *Gumiņbaktēriju iedzīvošanās saimniekauga saknēs: zinātniskais darbs bakalaura grāda ieguvei*. Latvijas Lauksaimniecības universitāte. Jelgava. 44 lpp.

230. Russelle M.P. (2008). Biological dinitrogen fixation in agriculture. *In: Nitrogen in agricultural systems*. Ed. by J.S. Schepers, W.R. Raun. American Society of Agronomy, Madison, p. 281–359.
231. Saidi S., Chebil S., Gtari M., Mhamdi R. (2013). Characterization of root-nodule bacteria isolated from *Vicia faba* and selection of plant growth promoting isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 29, No. 6, p. 1099–1106.
232. Saleh M.A., Zaman S., Kabir G. (2013). Yield response of black gram to inoculation by different *Rhizobium* strains using various types of adhesives. *Asian Journal of Biological Sciences*, Vol. 6, No. 3, p. 181–186.
233. Sarkar S.F., Guttman D.S. (2004). Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 70, p. 1999–2012.
234. Schultze J. (2004). How are nitrogen fixation rates regulated in legumes? *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, Vol. 167, p. 125–137.
235. Schultze M., Kondorosi E., Ratet P., Buire M., Kondorosi A. (1994). Cell and Molecular Biology of *Rhizobium*-Plant Interactions. *International Review of Cytology*, Vol. 156, p. 1–75.
236. Sessitsch A., Howieson J.G., Perret X., Antoun H., Martinez-Romero E. (2002) Advances in Rhizobium Research. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Vol. 21, No. 4, p. 323–378.
237. Sharasia P.L., Garg M.R., Bhandari B.M. (2017). *Pulses and their by-products as animal feed*. Ed. by T. Calles, H.P.S. Makkar, Rome, FAO, 204 p.
238. Shiraishi A., Matsushita N., Hougetsu T. (2010). Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 33, p. 269–274.
239. Shoebitz M., Ribaud C.M., Pardo M.A., Cantorec M.L., Ciampia L., Curáb J.A. (2009). Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil. Ecol. Biochem.*, Vol. 41, p. 1768–1774.
240. Sikora S., Redžepović S. (2003). Genotyping characterization of indigenous soybean rhizobia by PCR-RFLP of 16S rDNA, rep-PCR and RAPD analysis. *Food Technology and Biotechnology*, Vol. 41, No. 1, p. 61–67.
241. Silva C., Vinuesa P., Eguiarte L.E., Souza V., Martinez-Romero E. (2005). Evolutionary genetics and biogeographic structure of *Rhizobium gallicum sensu lato*, a widely distributed bacterial symbiont of diverse legumes. *Molecular Ecology*, Vol. 14, No 13, p. 4033–4050.
242. Simon Z., Mtei K., Gessesse A., Ndakidemi P.A. (2014). Isolation and characterization of nitrogen fixing rhizobia from cultivated and uncultivated soils of northern Tanzania. *AJPS*, Vol. 5, No. 26, p. 4050–4067.
243. Singer E., Buchnell B., Coleman-Derr D., Browman B., Bowers R.M., Levy A., Gies E.A., Chen J.F., Copeland A., Klenk H.P., Hallam S.J., Hugenholtz P., Tringe S.G., Woyke T. (2016). High resolution phylogenetic microbial community profiling. *The ISME Journal*, Vol. 10, No. 8, p. 2020–2032.
244. Skorupska A., Janczarek M., Marczak M., Mazur A., Król J. (2006). Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial Cell Factories*, Vol. 5, No. 7, p. 1–19.
245. Slattery J.F., Pearce D.J., Slattery W.J. (2004). Effects of resident rhizobial communities and soil type on the effective nodulation of pulse legumes. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 36, No. 8, p. 1339–1346.
246. Sleator R.D. (2011). Phylogenetics. *Arch. Microbiol.*, Vol 193, p. 235–293.
247. Somasegaran P., Hoben H.J. (1994). *Handbook for Rhizobia: Methods in legume-Rhizobium technology*. New York: Springer-Verlag, 450 p.

248. Sprent J.I. (2007). Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol.*, Vol. 174, p. 11–25.
249. Steinberga V., Alsina I., Ansevica A., Dubova L., Liepina L. (2008). The evaluation of effectiveness of *Rhizobium lupini* strains. *Latvian Journal of Agronomy*, Vol. 10, p. 193–197.
250. Stikute I. (1973). *Lucernas inokulācijas efektivitāte atkarībā no pielietoto gumiņbaktēriju rasu konkurences spējām un augsnes apstākļiem*: disertācijas zinātniskais referāts bioloģijas zinātņu kandidāta grāda iegūšanai. Latvijas Lauksaimniecības akadēmija. Jelgava. 207 lpp.
251. Strauta L. (2017). *Pākšaugi ekstrudētu pārtikas produktu ieguvei*: zinātniskā darba kopsavilkums Dr. sc. ing. zinātniskā grāda ieguvei. Jelgava: LLU. 66 lpp.
252. Sundara B., Natarajan V., Hari K. (2002). Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crop Research*, Vol. 77, p. 43–49.
253. Surin B.P., Downie J.A. (1989). *Rhizobium leguminosarum* genes required for expression and transfer of host specific nodulation. *Plant Molecular Biology*, Vol. 12, p. 19–29.
254. Šenberga A., Dubova L., Alsina 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, p. 2–9.
255. Šteinberga V. (2000). Augsnes mikroorganismu pētnieki. **No:** *Lauksaimniecības Zinātne Latvijā 1950 – 1990 senioru skatījumā*. LLU, Jelgava, 34. – 52 lpp.
256. Tamimi S.A., Young J.P.W. (2004). *Rhizobium etli* is the dominant common bean nodulating rhizobia in cultivated soils from different locations in Jordan. *Applied Soil Ecology*, Vol. 26, No. 3, p. 193–200.
257. Tampakaki A.P., Alsina I., Ntatsi G., Dubova L., Fotiadis C.T., Steinberga V., Savvas D., Marques G. (2014). Working with rhizobia. **In:** *Working with microbial symbioses of legumes: Handbook of protocols*. Ed. by Marques G., Tampakaki A.P., Alsina I., Portugal, Greece, Latvia, p. 10–34.
258. Terpolilli J.J., Hood G.A., Poole P.S. (2012). What determines the efficiency of N(2)-fixing *Rhizobium*-legume symbioses? *Adv. Microb. Physiol.*, Vol. 60, p. 325–389.
259. Terpolilli J.J., O'Hara G.W., Tiwari R.P., Dilworth M.J., Howieson J.G. (2008). The model legume *Medicago truncatula* A17 is poorly matched for N₂ fixation with the sequenced microsymbiont *Sinorhizobium meliloti* 1021. *New Phytologist*, Vol. 179, No. 1, p. 62–66.
260. Timmusk S., Grantcharova N., Wagner E.G.H. (2005). *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 71, p. 7292–7300.
261. Timofeeva A., Sedkykh S. (2022). Prospects for Using Phosphate-Solubilizing Microorganisms as Natural Fertilizers in Agriculture. *Plants*, Vol 11, No. 16, p. 2119.
262. Torres A.R., Cursino L., Muro-Abad J.I., Gomes E.A., de Araujo E.F., Hungria M., Alves-Cassini S.T. (2009). Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from the state of Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 40, No. 4, p. 852–856.
263. Tran Q., Pham D.T., Phan V. (2017). Using 16S rRNA gene as marker to detect unknown bacteria in microbial communities. *BMC bioinformatics*, Vol. 18, No. 14, p. 499.
264. Trops G. (1979). *Rhizobium trifolii* rasu iedzīvošanās sarkanā āboliņa saknēs: diplomdarbs. Agronomijas fakultāte, Augu fizioloģijas un mikrobioloģijas katedra, Latvijas Lauksaimniecības akadēmija. Jelgava. 73 lpp.

265. Turner S.L., Young J.P. (2000). The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 17, No. 2, p. 309–319.
266. Udvardi M., Poole P.S. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu. Rev. Plant Biol.*, Vol. 64, p. 781–805.
267. van Berkum P., Beyene D., Vera F.T., Keyser H.H. (1995). Variability among *Rhizobium* Strains Originating from Nodules of *Vicia faba*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, No. 7, p. 2649–2653.
268. van Berkum P., Elia P., Eardly B.D. (2006). Multilocus Sequence typing as an approach for population analysis of *Medicago*-Nodulating Rhizobia. *Journal of Bacteriology*, Vol. 188, No. 15, p. 5570–5577.
269. Vessey J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, Vol. 255, p. 571–586.
270. Vessey K.J., Chemining'wa G.N. (2006). The genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 38, No. 1, 153–163.
271. Vinuesa P., Silva C., Werner D., Martínez-Romero E. (2005). Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 34, No. 1, p. 29–54.
272. Virtanen, Y., Kurppa, S., Saarinen, M., Katajajuuri, J., Usva, K., Mäenpää, I., Mäkelä J., Grönroos J., Nissinen A. (2011). Carbon footprint of food—approaches from national input–output statistics and a LCA of a food portion. *Journal of Cleaner Production*, 19, 1849–1856.
273. Vīgule A. (1976). *Nitragīna ietekme uz slāpekļa un ogļhidrātu saturu dzeltenajā lupīnā (Lupinus luteus L.): diplomdarbs*. Latvijas Lauksaimniecības akadēmija. Jelgava. 111 lpp.
274. Voisin A., Salon C., Munier-Jolain N.G., Ney B. (2002). Effect of mineral nitrogen on nitrogen nutrition and biomass partitioning between the shoot and roots of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil*, Vol. 242, p. 251–262.
275. Voisin A.S., Guéguen J., Huygh C., Jeuffroy, M.H., Magrini M.B., Meynard J.M., Mougel C., Pelleri S., Pelzer, E. (2014). Legumes for feed, food, biomaterials and bioenergy in Europe: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, Vol. 34, No. 2, p. 361–380.
276. Vriezen J.A., de Bruijn F.J., Nüsslein K. (2007). Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73, No. 11, p. 3451–3459.
277. Wagner J., Coupland P., Browne H.P., Lawley T.D., Francis S.C., Parkhill J. (2016). Evaluation of PacBio sequencing for full-length bacterial 16S rRNA gene classification. *BMC Microbiology*, Vol. 16, p. 274.
278. Wagner S.C. (2011). Biological nitrogen fixation. *Nature Education Knowledge*, Vol. 3, No 10, p. 15.
279. Wang E.T., Chen W.T., Tian C.F., Young J.P.W., Chen W.X. (2019a). Symbiosis between rhizobia and legumes. **In:** *Ecology and Evolution of Rhizobia*. Ed. by Wang E.T., Tian C.F., Chen W.F., Young J.P.W., Chen W.X., Springer, Singapore, p. 3–19.
280. Wang E.T., Chen W.T., Tian C.F., Young J.P.W., Chen W.X. (2019b). History of Rhizobial Taxonomy. **In:** *Ecology and Evolution of Rhizobia*. Ed. by Wang E.T., Tian C.F., Chen W.F., Young J.P.W., Chen W.X., Springer, Singapore, p. 23–39.

281. Wang E.T., Chen W.T., Tian C.F., Young J.P.W., Chen W.X. (2019c). Genomics and Evolution of Rhizobia. *In: Ecology and Evolution of Rhizobia*. Ed. by Wang E.T., Tian C.F., Chen W.F., Young J.P.W., Chen W.X., Springer, Singapore, p. 103–1.
282. Wang E.T., Chen W.T., Tian C.F., Young J.P.W., Chen W.X. (2019d). Geographical Distribution of Rhizobia. *In: Ecology and Evolution of Rhizobia*. Ed. by Wang E.T., Tian C.F., Chen W.F., Young J.P.W., Chen W.X., Springer, Singapore, p. 181–209.
283. Wang E.T., Chen W.T., Tian C.F., Young J.P.W., Chen W.X. (2019e). Working on the Taxonomy, Biodiversity, Ecology and Evolution of Rhizobia. *In: Ecology and Evolution of Rhizobia*. Ed. by Wang E.T., Tian C.F., Chen W.F., Young J.P.W., Chen W.X., Springer, Singapore, p. 251–273.
284. Wang E.T., Chen W.T., Tian C.F., Young J.P.W., Chen W.X., (2019f). Current Systematics of Rhizobia. *In: Ecology and Evolution of Rhizobia*. Ed. by Wang E.T., Tian C.F., Chen W.F., Young J.P.W., Chen W.X., Springer, Singapore, p. 41–102.
285. Watkin E.L.J., O'Hara G.W., Glenn A.R. (1997). Calcium and stress interact to affect the growth of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Soil Biol. Biochem.*, Vol. 29, No. 9/10, p. 1427–1432.
286. Watson C.A., Reckling M., Preissel S., Bachinger J., Bergkvist G., Kuhlman T., Lindström K., Nemecek T., Topp C.F.E., Vanhatalo A., Zander P., Murphy-Bokern D., Stoddard F.L. (2017). Grain Legume Production and Use in European Agricultural Systems. *Advances in Agronomy*, Vol. 44, p. 235–303.
287. Weisany W., Raei Y., Allahverdiipoor K.H. (2013). Role of Some Mineral Nutrients in Biological Nitrogen Fixation. *Bulletin of Environmental, Pharmacology and Life Sciences*, Vol. 2, No. 4, p. 77–84.
288. Yamal G., Bidalia A., Vikram K., Rao K.S. (2016) An Insight into the Legume–*Rhizobium* Interaction. *In: Plant, Soil and Microbes*. Ed. by K. Hakeem, M. Akhtar. Springer, Cham, p. 359–384.
289. Yang J., Kloepper J.W., Ryu C.M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.*, Vol. 14, p. 1–4.
290. Young J.M. (2003). The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a tater synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*' (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 53, pp. 2107–2110.
291. Young J.M. (2010). *Sinorhizobium* versus *Ensifer*: may a taxonomy subcommittee of the ICSP contradict the Judicial Commission? *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 60, pp. 1711–1713.
292. Young J.P., Crossman L.C., Johnston A.W., Thomson N.R., Ghazoui Z.F., Hull K.H., Wexler M., Curson A.R., Todd J.D., Poole P.S., Mauchline T.H., East A.K., Quail M.A., Churcher C., Arrowsmith C., Cherevach I., Chillingworth I., Clarke K., Cronin A., Davis P., Fraser A., Hance Z., Hauser H., Jagels K., Moule S., Mungall K., Norbertczak H., Rabinowitsch E., Sanders M., Whitehead S., Parkhill J. (2006). The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biology*, Vol. 7, No. 4, p. R34.
293. Young J.P., Downer H.L., Eardly B.D. (1991). Phylogeny of the phototrophic rhizobium strain BRAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *Journal of Bacteriology*, Vol. 173, No. 7, p. 2271–2277.
294. Young J.P.W. (1992). Phylogenetic Classification of Nitrogen-Fixing Organisms. *In: Biological Nitrogen Fixation*. Ed. by G. Stacey, R.H. Burris, H.J. Evans. Chapman and Hall, New York, p. 43–86.

295. Young J.P.W., Haukka K.E. (1996). Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytologist*, Vol. 133, p. 87–94.
296. Zahran H.H. (1999). *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology*, Vol. 63, No. 4, p. 968–989.
297. Zander P., Amjath-Babu T.S., Preissel S., Reckling M., Bues A., Schlafke N., Kuhlman T., Bachinger J., Uthes S., Stoddard F., Murphy-Bokern D., Watson C. (2016). Grain legume decline and potential recovery in European agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, Vol. 36, No. 26, <https://doi.org/10.1007/s13593-016-0365-y>.
298. Zhang F., Lynch D.H., Smith D.L. (1995). Impact of low root temperatures in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] on nodulation and nitrogen fixation. *Environmental and Experimental Botany*, Vol 35, No. 3, p. 279–285.
299. Zhang F., Smith D.L. (1994). Effects of low root zone temperatures on early stages of symbiosis establishment between soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] and *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of experimental Botany*, Vol. 45, No. 10, p. 1467–1473.
300. Zhang Y.M., Tian C.F., Sui X.H., Chen W.F., Chen W.X. (2012). Robust Markers Reflecting Phylogeny and Taxonomy of Rhizobia. *PLoS ONE*, Vol. 7, No. 9, p. e44936.
301. Zineb A.B., Trabelsi D., Ayachi I., Barhoumi I., Aroca R., Mhamdi R. (2019). Inoculation with elite strains of phosphate-solubilizing bacteria enhances the effectiveness of fertilization with rock phosphates. *Geomicrobiol. J.*, Vol. 37, No. 1, p. 22–30.
302. Zute S., Jansone I., Šterna V. (2021). Vai sojai nepieciešams slāpekļa mēslojums? **No:** *Latvijā audzēta soja un mieži – inovācija cūku ēdināšanā*. Projekta “Jaunas tehnoloģijas un ekonomiski pamatoti risinājumi vietējās lopbarības ražošanai cūkkopībai: ģenētiski nemodificētas sojas un jaunu lopbarīnas miežu šķirņu audzēšana Latvijā” (Nr. 18 – 00A01612) izdevums, 25. – 28. lpp.

PIELIKUMI

No tauriņziežu saknēm izdalīto baktēriju ģenētiskā identifikācija, izmantojot pilna garuma 16S rRNS gēna sekvences.

Identifikācija veikta izmantojot GeneBank datubāzi. Genotipu taksonomiskā identitāte pārbaudīta izmantojot SILVA datubāzi

N.p.k.	Gumiņbaktēriju celma kods (GenBank piešķirtais kods)	Taksonomiskais iedalījums (klase)	Taksonomiskā piederība un sekvenču līdzība (%) pēc <i>GeneBank</i> datubāzes	Taksonomiskā piederība pēc <i>SILVA</i> datubāzes	Filoģenētiskās analīzes paraugu n.p.k	Genotips (Paraugu grupas kods filoģenētiskajā kokā)
1.	RM00501 (OQ236290)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> (100%) <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (100%) <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (100%)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	1.	RhL01
2.	RVi00601 (OQ236316)					
3.	RVi00401 (OQ236334)					
4.	RVi00701 (OQ236327)					
5.	RVi00101 (OQ236349)					
6.	RV00801 (OQ236331)					
7.	RV00901 (OQ236296)					
8.	RV01301 (OQ236311)					
9.	RV01501 (OQ236335)					
10.	RV2010 (OQ236345)					
11.	RV19KE (OQ236307)					

1. pielikuma turpinājums

N.p.k.	Gumiņbaktēriju celma kods (GenBank piešķirtais kods)	Taksonomiskais iedalījums (klase)	Taksonomiskā piederība un sekvenču līdzība (%) pēc <i>GeneBank</i> datubāzes	Taksonomiskā piederība pēc <i>SILVA</i> datubāzes	Filoģenētiskās analīzes paraugu n.p.k	Genotips (Paraugu grupas kods filoģenētiskajā kokā)
12.	RV19/P2. (OQ236325)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> (100%) <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (100%) <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (100%)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	1.	RhL01
13.	RV19/P6 (OQ236361)					
14.	RVLTSKR (OQ236310)					
15.	RVLT60 (OQ236312)					
16.	RP00701 (OQ236343)					
17.	RP01201 (OQ236322)					
18.	RP01001 (OQ236324)					
19.	RP00501 (OQ236365)					
20.	RP00601 (OQ236330)					
21.	RT00901 (OQ236291)					
22.	RT00501 (OQ236372)					
23.	RT2010 (OQ236268)					

1. pielikuma turpinājums

N.p.k.	Gumiņbaktēriju celma kods (GenBank piešķirtais kods)	Taksonomiskais iedalījums (klase)	Taksonomiskā piederība un sekvenču līdzība (%) pēc <i>GeneBank</i> datubāzes	Taksonomiskā piederība pēc <i>SILVA</i> datubāzes	Filoģenētiskās analīzes paraugu n.p.k	Genotips (Paraugu grupas kods filoģenētiskajā kokā)
23.	RT2010 (OQ236268)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> (100%) <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (100%) <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (100%)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	1.	RhL01
24.	RT2020 (OQ236288)					
25.	RPh00501 (OQ236364)					
26.	RO00101 (OQ236314)					
27.	RLa00301 (OQ236369)					
28.	RLa00101 (OQ236254)					
29.	RVn2010 (OQ236363)					
30.	RVg2021 (OQ236283)					
31.	RVg2011 (OQ236280)					
32.	RPh00601 (OQ236260)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> (100%)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	2.	RhL05
33.	RVi00301 (OQ236250)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> (99%) <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (99%)	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	3.	RhL03

1. pielikuma turpinājums

N.p.k.	Gumiņbaktēriju celma kods (GenBank piešķirtais kods)	Taksonomiskais iedalījums (klase)	Taksonomiskā piederība un sekvenču līdzība (%) pēc <i>GeneBank</i> datubāzes	Taksonomiskā piederība pēc <i>SILVA</i> datubāzes	Filoģenētiskās analīzes paraugu n.p.k	Genotips (Paraugu grupas kods filoģenētiskajā kokā)
34.	RVi00501 (OQ236313)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> (99%)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	4.	RhL06
35.	RP023Y (OQ236284)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (100%) <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (99%)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	5.	RhL02
36.	RP02301 (OQ236309)					
37.	RP023Z (OQ236240)					
38.	RP01101 (OQ236286)					
39.	RT01901 (OQ236347)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (100%) <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (99%)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	5.	RhL02
40.	RT02201 (OQ236370)					
41.	RL01001 (OQ236340)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (99%) <i>Bradyrhizobium</i> sp. (99%) <i>Rhizobium leguminosarum</i> (99%)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	6.	RhSP01
42.	RV00701 (OQ236346)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (100%) <i>Bradyrhizobium</i> sp. (99%) <i>Rhizobium leguminosarum</i> (99%)	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	7.	RhSP02
43.	RT00801 (OQ236336)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium gallicum</i> (99%)	<i>Rhizobium gallicum</i>	8.	RhG01

1. pielikuma turpinājums

N.p.k.	Gumiņbaktēriju celma kods (GenBank piešķirtais kods)	Taksonomiskais iedalījums (klase)	Taksonomiskā piederība un sekvenču līdzība (%) pēc <i>GeneBank</i> datubāzes	Taksonomiskā piederība pēc <i>SILVA</i> datubāzes	Filoģenētiskās analīzes paraugu n.p.k	Genotips (Paraugu grupas kods filoģenētiskajā kokā)
44.	RT2050 (OQ236269)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium gallicum</i> (99%)	<i>Rhizobium gallicum</i>	8.	RhG01
45.	RL00701 (OQ236358)					
46.	RS2020 (OQ236344)					
47.	RV01401 (OQ236257)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> (99%)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	9.	RhL04
48.	RL00101 (OQ236360)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Ensifer adhaerens</i> (100%) <i>Sinorhizobium</i> sp. (99%)	<i>Ensifer adhaerens</i>	10.	ShSP01
49.	RA00101 (OQ236350)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (99%)	<i>Rhizobium</i> sp.	11.	RhSP03
50.	RM01201 (OQ236339)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (99%)	<i>Rhizobium</i> sp.	12.	RhSP04
51.	RL00501 (OQ236278)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (100%)	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	13.	RhSP05
52.	RL00901 (OQ236308)					
53.	RV50104 (OQ236337)					
54.	RV00101 (OQ236285)					

1. pielikuma turpinājums

N.p.k.	Gumiņbaktēriju celma kods (GenBank piešķirtais kods)	Taksonomiskais iedalījums (klase)	Taksonomiskā piederība un sekvenču līdzība (%) pēc <i>GeneBank</i> datubāzes	Taksonomiskā piederība pēc <i>SILVA</i> datubāzes	Filoģenētiskās analīzes paraugu n.p.k	Genotips (Paraugu grupas kods filoģenētiskajā kokā)
55.	RV00501 (OQ236348)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (100%)	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	13.	RhSP05
56.	RG00101 (OQ236279)					
57.	RP00301 (OQ236302)					
58.	RP00303 (OQ236366)					
59.	RP00304 (OQ236318)					
60.	RS00201 (OQ236277)					
61.	RS00202 (OQ236368)					
62.	RM00401 (OQ236320)					
63.	RL000401 (OQ236354)					
64.	RT02101 (OQ236323)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (100%)	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	13.	RhSP05
65.	RT2021 (OQ236289)					
66.	RAm2020 (OQ236273)					

1. pielikuma turpinājums

N.p.k.	Gumiņbaktēriju celma kods (GenBank piešķirtais kods)	Taksonomiskais iedalījums (klase)	Taksonomiskā piederība un sekvenču līdzība (%) pēc <i>GeneBank</i> datubāzes	Taksonomiskā piederība pēc <i>SILVA</i> datubāzes	Filoģenētiskās analīzes paraugu n.p.k	Genotips (Paraugu grupas kods filoģenētiskajā kokā)
67.	RPh11603 (OQ236241)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (100%)	<i>Agrobacterium fabacearum</i>	14.	RhSP07
68.	RL00301 (OQ236263)					
69.	RV40801 (OQ236248)					
70.	RV50503 (OQ236247)					
71.	RM24505 (OQ236255)					
72.	RG00201 (OQ236239)					
73.	RP00302 (OQ236243)					
74.	RS00203 (OQ236351)					
75.	RS00204 (OQ236246)					
76.	RS00301 (OQ236245)					
77.	RT02001 (OQ236295)					
78.	RT01101 (OQ236304)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (100%)	<i>Agrobacterium fabacearum</i>	14.	RhSP07

1. pielikuma turpinājums

N.p.k.	Gumiņbaktēriju celma kods (GenBank piešķirtais kods)	Taksonomiskais iedalījums (klase)	Taksonomiskā piederība un sekvenču līdzība (%) pēc <i>GeneBank</i> datubāzes	Taksonomiskā piederība pēc <i>SILVA</i> datubāzes	Filoģenētiskās analīzes paraugu n.p.k	Genotips (Paraugu grupas kods filoģenētiskajā kokā)
79.	RT32603 (OQ236242)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (100%)	<i>Agrobacterium fabacearum</i>	14.	RhSP07
80.	RL00401 (OQ236253)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (99%)	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	15.	RhSP08
81.	RP30201 (OQ236262)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (99%)	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	16.	RhSP09
82.	RV40703 (OQ236249)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (100%)	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	17.	RhSP06
83.	RV40704 (OQ236281)					
84.	RV40705 (OQ236355)					
85.	RM01101 (OQ236265)					
86.	RM00901 (OQ236338)					
87.	RL01101 (OQ236319)					
88.	RP01401 (OQ236292)					
89.	RG00401 (OQ236371)	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Neorhizobium galegae</i> (99%)	<i>Neorhizobium galegae</i>	18.	NhG01
90.	RG2010 (OQ236326)					

1. pielikuma turpinājums

N.p.k.	Gumiņbaktēriju celma kods (GenBank piešķirtais kods)	Taksonomiskais iedalījums (klase)	Taksonomiskā piederība un sekvenču līdzība (%) pēc <i>GeneBank</i> datubāzes	Taksonomiskā piederība pēc <i>SILVA</i> datubāzes	Filoģenētiskās analīzes paraugu n.p.k	Genotips (Paraugu grupas kods filoģenētiskajā kokā)
91.	RG2020 (OQ236352)	α -proteobacteria	<i>Neorhizobium galegae</i> (99%)	<i>Neorhizobium galegae</i>	18.	NhG01
92.	RS2030 (OQ236321)	α -proteobacteria	<i>Mesorhizobium</i> sp. (99%)	<i>Mesorhizobium loti</i>	19.	MhSP01
93.	RS2011 (OQ236328)	α -proteobacteria	<i>Mesorhizobium</i> sp. (100%)	<i>Mesorhizobium</i> sp. <i>Mesorhizobium loti</i>	20.	MhSP02
94.	RM24502 (OQ236301)	α -proteobacteria	<i>Azospirillum</i> sp. (99%)	<i>Azospirillum</i> sp.	21.	ASP01
95.	RSBASF/S (OQ236359)	α -proteobacteria	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (100%)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	22.	BhJ01
96.	RM00301 (OQ236258)	α -proteobacteria	<i>Rhizobium</i> sp. (100%)	<i>Rhizobium</i> sp.	23.	RhSP10
97.	RS2051 (OQ236267)	β -proteobacteria	<i>Paraburkholderia terricola</i> (99%)	<i>Paraburkholderia terricola</i>	24.	PbT01
98.	RS2041 (OQ236329)					
99.	RS2041/19 (OQ236306)					
100.	RM00701 (OQ236272)	β -proteobacteria	<i>Paraburkholderia terricola</i> (99%)	<i>Paraburkholderia terricola</i>	25.	PbT02
101.	RS2010 (OQ236367)	β -proteobacteria	<i>Paraburkholderia terricola</i> (99%)	<i>Paraburkholderia terricola</i>	26.	PbT03
102.	RS2081/19 (OQ236380)					

1. pielikuma turpinājums

N.p.k.	Gumiņbaktēriju celma kods (GenBank piešķirtais kods)	Taksonomiskais iedalījums (klase)	Taksonomiskā piederība un sekvenču līdzība (%) pēc <i>GeneBank</i> datubāzes	Taksonomiskā piederība pēc <i>SILVA</i> datubāzes	Filoģenētiskās analīzes paraugu n.p.k	Genotips (Paraugu grupas kods filoģenētiskajā kokā)
103.	RV00601 (OQ236315)	<i>β-proteobacteria</i>	<i>Paraburkholderia terricola</i> (100%)	<i>Paraburkholderia terricola</i>	27.	PbT04
104.	RV19/K3 (OQ236275)	<i>β-proteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i> sp. (99%)	<i>Burkholderia</i> sp.	28.	BSP04
105.	RV19/K5 (OQ236305)					
106.	RV19/P5 (OQ236374)					
107.	RS2281 (OQ255684)	<i>β-proteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i> sp. (99%)	<i>Burkholderia</i> sp.	29.	BSP05
108.	RS2081 (OQ236293)	<i>β-proteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i> sp. (99%)	<i>Burkholderia</i> sp.	30.	BSP06
109.	RV19/P4 (OQ236264)	<i>β-proteobacteria</i>	<i>Paraburkholderia caledonica</i> (100%)	<i>Paraburkholderia caledonica</i>	31.	PbC01
110.	RS2030/19 (OQ236270)	<i>β-proteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i> sp. (99%)	<i>Burkholderia stagnalis</i>	32.	BSP07
111.	RV19/K12 (OQ236333)	<i>β-proteobacteria</i>	<i>Achromobacter</i> sp. (99%)	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	33.	AcSP01
112.	RV01201 (OQ236373)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Rahnella aquatilis</i> (99%)	<i>Rahnella aquatilis</i>	34.	RA01
113.	RV19.3/5 (OQ236362)					
114.	RP2030 (OQ236266)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Rahnella aquatilis</i> (99%)	<i>Rahnella aquatilis</i>	35.	RA02

1. pielikuma turpinājums

N.p.k.	Gumiņbaktēriju celma kods (GenBank piešķirtais kods)	Taksonomiskais iedalījums (klase)	Taksonomiskā piederība un sekvenču līdzība (%) pēc <i>GeneBank</i> datubāzes	Taksonomiskā piederība pēc <i>SILVA</i> datubāzes	Filoģenētiskās analīzes paraugu n.p.k	Genotips (Paraugu grupas kods filoģenētiskajā kokā)
115.	RP2040 (OQ236297)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Rahnella aquatilis</i> (99%)	<i>Rahnella aquatilis</i>	35.	RA02
116.	RLuc2021 (OQ236252)					
117.	RAm2021 (OQ236276)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Rahnella aquatilis</i> (99%)	<i>Rahnella aquatilis</i>	36.	RA03
118.	RV19.2/11 (OQ236379)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Serratia plymuthica</i> (99%)	<i>Serratia plymuthica</i>	37.	SrP01
119.	RL00801 (OQ236271)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Serratia plymuthica</i> (99%)	<i>Serratia plymuthica</i>	38.	SrP02
120.	RL00701/2 (OQ255685)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Serratia plymuthica</i> (99%)	<i>Rhizobium gallicum</i>	39.	SrP04
121.	RS3010 (OQ236294)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Enterobacter</i> sp. (99%)	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i> / <i>Kosakonia cowanii</i>	40.	ESP01
122.	RS3020 (OQ236353)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Enterobacter</i> sp. (99%)	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i> / <i>Kosakonia cowanii</i>	41.	ESP02
123.	RSMix19/M (OQ236375)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Enterobacter</i> sp. (99%)	<i>Enterobacter</i> sp.	42.	ESP03
124.	RSBASF/M (OQ236378)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Enterobacter ludwigii</i> (100%)	<i>Enterobacter cloacae</i> complex sp.	43.	ESP04
125.	RS2061/19 (OQ236377)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Enterobacter asburiae</i> (100%)	<i>Enterobacter asburiae</i>	44.	EA01

1. pielikuma turpinājums

N.p.k.	Gumiņbaktēriju celma kods (GenBank piešķirtais kods)	Taksonomiskais iedalījums (klase)	Taksonomiskā piederība un sekvenču līdzība (%) pēc <i>GeneBank</i> datubāzes	Taksonomiskā piederība pēc <i>SILVA</i> datubāzes	Filoģenētiskās analīzes paraugu n.p.k	Genotips (Paraugu grupas kods filoģenētiskajā kokā)
126.	RSMix19/L (OQ236357)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Enterobacter ludwigii</i> (99%)	<i>Enterobacter cloacae</i>	45.	EL01
127.	RS2071 (OQ236256)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Pantoea agglomerans</i> (99%)	<i>Pantoea agglomerans</i>	46.	PnA01
128.	RV19/K10 (OQ236356)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Pantoea agglomerans</i> (99%)	<i>Pantoea agglomerans</i>	47.	PnA02
129.	RAm2010 (OQ236303)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Pantoea agglomerans</i> (100%)	<i>Pantoea agglomerans</i>	48.	PnSP01
130.	RV19.1/13 (OQ236376)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Serratia plymuthica</i> (100%)	<i>Serratia plymuthica</i>	49.	SrP03
131.	RT01601 (OQ236332)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Serratia plymuthica</i> (100%)	<i>Serratia plymuthica</i>	50.	SrP05
132.	RLuc2011 (OQ236274)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. (99%)	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	51.	PSP01
133.	RAm2011 (OQ236298)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> (99%)	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	52.	PSP02
134.	RT01001 (OQ236300)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. (100%)	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	53.	PSP04
135.	RS2040 (OQ236299)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. (100%)	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	53.	PSP04
136.	RT01301 (OQ236259)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. (99%)	<i>Pseudomonas</i> sp.	54.	PSP05

1. pielikuma nobeigums

N.p.k.	Gumiņbaktēriju celma kods (GenBank piešķirtais kods)	Taksonomiskais iedalījums (klase)	Taksonomiskā piederība un sekvenču līdzība (%) pēc <i>GeneBank</i> datubāzes	Taksonomiskā piederība pēc <i>SILVA</i> datubāzes	Filoģenētiskās analīzes paraugu n.p.k	Genotips (Paraugu grupas kods filoģenētiskajā kokā)
137.	RVi00901 [†]	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. (99%)	<i>Pseudomonas</i> sp. / <i>Pseudomonas fluorescens</i>	55.	PSP06
138.	RS00601 [‡]	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. (99%)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	56.	PSP07
139.	RT01701 (OQ236317)	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. (99%)	<i>Pseudomonas putida</i>	57.	PSP08
140.	RPh11601 (OQ236282)	<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (99%)	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	58.	PaSP05
141.	RPh11602 (OQ236287)					
142.	RM24503 (OQ236342)	<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (99%)	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	59.	PaSP01
143.	RV02001 (OQ236341)					
144.	RP20201 (OQ236244)	<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillus peoriae</i> (100%)	<i>Paenibacillus peoriae</i>	60.	PaSP02
145.	RV06902 (OQ236261)	<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (99%)	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	61.	PaSP03
146.	RVg00101 (OQ236251)	<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (100%)	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	62.	PaSP04

[†] Paraugs GenBank identificēts kā himēriskis

[‡] Paraugs GenBank identificēts kā himēriskis

Augsnes agroķīmisko rādītāju rezultāti

N.p.k.	Gumiņbaktēriju celma kods	P ₂ O ₅ (mg kg ⁻¹)	pH	COND (μS cm ⁻¹)	Na (mg kg ⁻¹)	K (mg kg ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹)	Ca (mg kg ⁻¹)	Salt EC
1.	RVi00801	70.33	6.89	525.00	31.00	25.00	586.67	1533.33	0.57
2.	RVi00601	62.83	6.76	407.67	11.67	38.33	306.00	670.00	0.40
3.	RL00901	236.67	5.31	348.67	11.33	22.00	373.33	806.67	0.37
4.	RVi00401	141.67	6.95	422.67	15.00	52.33	326.67	1066.67	0.40
5.	RM00701	145.25	6.01	441.33	7.00	33.33	540.00	1023.33	0.47
6.	RV00901	199.50	5.38	999.67	26.67	98.67	920.00	2000.00	0.97
7.	RVi00201	256.50	5.93	238.00	11.00	38.00	370.00	483.33	0.23
8.	RV01501, RP01201	835.00	6.44	1443.33	16.67	79.33	1266.67	3333.33	1.33
9.	RV00601	573.75	6.41	443.33	9.00	34.33	556.67	1023.33	0.40
10.	RPh00501	541.50	6.78	355.33	5.33	23.00	536.67	793.33	0.33
11.	RVi00301	627.50	6.69	569.33	4.67	27.67	696.67	1200.00	0.60
12.	RS00601	507.75	6.79	303.67	4.67	19.67	450.00	633.33	0.30
13.	RT01001	261.17	6.72	946.00	8.00	76.33	850.00	2700.00	1.00
14.	RV00801	181.50	6.59	305.00	7.67	48.67	390.00	566.67	0.30
15.	RVi00101	215.25	6.40	456.33	7.00	8.33	623.33	1100.00	0.40
16.	RV00501	280.75	5.83	304.67	7.33	18.00	416.67	746.67	0.30
17.	RT01101	128.75	7.15	329.67	7.67	31.00	300.00	860.00	0.30
18.	RM00601	59.00	7.41	269.00	38.00	9.33	370.00	756.67	0.30
19.	RVi00501	281.67	6.96	791.00	17.33	58.00	580.00	2033.33	0.80
20.	RP01101	267.67	6.55	595.00	8.33	28.33	700.00	1333.33	0.63
21.	RLa00301	177.17	5.43	1230.00	15.00	30.67	1166.67	2200.00	1.17

2. pielikuma turpinājums

N.p.k.	Gumiņbaktēriju celma kods	P ₂ O ₅ (mg kg ⁻¹)	pH	COND (μS cm ⁻¹)	Na (mg kg ⁻¹)	K (mg kg ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹)	Ca (mg kg ⁻¹)	Salt EC
22.	RO00101	33.00	7.34	272.00	68.67	21.67	182.67	480.00	0.30
23.	RL00701	287.83	6.01	348.67	7.33	37.67	570.00	840.00	0.40
24.	RT01401	108.17	6.19	482.67	6.67	20.33	553.33	1100.00	0.50
25.	RP00801	236.17	5.05	615.00	13.33	20.00	623.33	1433.33	0.60
26.	RMe00101	42.00	7.19	773.67	77.33	14.00	800.00	1800.00	0.80
27.	RM00501	112.50	6.74	363.00	9.00	32.33	573.33	833.33	0.40
28.	RL00101	168.33	6.64	744.33	7.67	68.00	586.67	1966.67	0.77
29.	RVi00901	101.33	7.49	204.00	8.67	6.00	273.33	563.33	0.20
30.	RP00701	340.17	6.70	445.00	18.67	31.33	616.67	910.00	0.47
31.	RT01201	71.17	6.73	799.00	503.33	30.33	843.33	1300.00	0.83
32.	RVi00701	79.75	7.01	429.33	286.67	14.33	530.00	653.33	0.43
33.	RV01101	250.00	5.47	685.00	19.00	56.00	673.33	1600.00	0.73
34.	RT00501	285.83	5.62	694.33	14.67	46.33	853.33	1733.33	0.67
35.	RT00701	296.83	5.96	689.00	11.33	183.33	853.33	1233.33	0.70
36.	RP01301	46.67	6.75	458.00	5.00	13.00	553.33	1066.67	0.50
37.	RP00901	154.67	5.57	749.00	8.67	12.00	700.00	1633.33	0.80
38.	RV01001	193.67	4.89	780.33	20.33	35.00	706.67	1533.33	0.80
39.	RT01701	204.00	6.15	2336.67	51.67	140.00	2233.33	5833.33	2.13
40.	RV19/P5	49.83	5.88	1500.33	34.00	23.67	866.67	356.67	0.77
41.	RT2010	275.00	7.23	446.00	6.00	14.67	123.33	88.00	0.80
42.	RM00401	161.33	6.85	702.67	14.67	39.67	600.00	1933.33	0.70
43.	RT2050	206.50	5.67	431.00	5.00	11.33	200.00	61.00	0.20
44.	RAm2011	177.67	7.24	340.00	9.67	-	45.00	85.00	0.20
45.	RG2010	281.17	7.84	504.33	3.67	17.33	143.33	71.67	0.27

2. pielikuma turpinājums

N.p.k.	Gumiņbaktēriju celma kods	P ₂ O ₅ (mg kg ⁻¹)	pH	COND (μS cm ⁻¹)	Na (mg kg ⁻¹)	K (mg kg ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹)	Ca (mg kg ⁻¹)	Salt EC
46	RP00501	456.00	6.25	536.33	8.00	16.67	693.33	1300.00	0.50
47	RV19/P4	58.50	5.82	1339.00	13.00	4.00	616.67	370.00	0.60
48	RV19/K5	314.50	5.98	1007.00	20.33	15.00	196.67	240.00	0.50
49	RS2040	157.17	7.20	405.33	6.67	9.00	77.33	89.33	0.20
50	RLuc2011	166.83	6.98	300.00	9.33	-	34.67	87.67	0.20
51	RL00801	378.50	5.90	311.00	7.67	30.67	513.33	803.33	0.37
52	RLa00101	426.00	6.74	1133.33	14.67	88.67	876.67	2033.33	1.10
53	RV19.1/13	296.00	7.94	907.33	11.00	4.00	116.67	240.00	0.43
54	RV01601, RV01701, RV01801	1925.00	6.62	657.33	21.00	21.00	650.00	1433.33	0.63
55	RM00301	811.00	6.93	565.67	9.00	110.00	406.67	916.67	0.53
56	RVLt60	128.67	7.79	2.44	25.33	12.67	213.33	580.00	1.00
57	RV19/K12	192.50	7.24	743.00	17.67	12.00	68.00	193.33	0.40
58	RV19.3/5	249.17	6.22	543.33	10.33	11.67	53.67	126.67	0.30
59	RT01601	74.00	6.90	394.33	9.33	55.33	470.00	756.67	0.40
60	RV19/P6	34.50	5.93	648.33	12.33	6.33	243.33	186.67	0.30
61	RV19/K3	237.50	7.28	928.00	11.33	7.00	160.00	250.00	0.47
62	RV19/P2	116.00	6.25	1197.33	12.33	42.00	590.00	280.00	0.60
63	RP01001	293.50	6.17	305.00	11.67	43.00	323.33	643.33	0.33
64	RP00601	295.83	6.13	365.33	6.33	47.33	536.67	693.33	0.40
65	RV00701	791.50	5.91	678.00	9.00	37.67	790.00	1500.00	0.70
66	RV19/K10	259.00	6.87	1725.67	26.33	51.33	420.00	400.00	0.80
67	RT02001	419.00	-	-	-	-	-	-	-
68	RVLTSKR	344.00	-	-	-	-	-	-	-

2. pielikuma nobeigums

N.p.k.	Gumiņbaktēriju celma kods	P ₂ O ₅ (mg kg ⁻¹)	pH	COND (μS cm ⁻¹)	Na (mg kg ⁻¹)	K (mg kg ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹)	Ca (mg kg ⁻¹)	Salt EC
69	RT00801	-	6.12	322.67	8.00	110.00	410.00	516.67	0.30
70	RT00901	-	5.80	1065.33	17.00	48.33	966.67	2433.33	1.10
71	RT01301	-	6.40	828.33	36.33	126.67	826.67	1733.33	0.87
72	RG00401	-	4.80	1266.67	18.00	81.00	1233.33	2466.67	1.17
73	RT02201	-	5.81	178.33	9.33	47.00	166.67	220.00	0.20
74	RT01901	-	7.67	1313.67	12.67	10.00	256.67	433.33	0.73
75	RVLT60	-	8.18	551.33	9.33	17.67	97.00	120.00	0.30
76	RT2020	-	7.23	-	-	-	-	-	-

Mainīgais	Novērojumu skaits	Minimālā vērtība	Maksimālā vērtība	Vidējā vērtība	Standartnovirze
pH	66	4.887	8.177	6.500	0.705
COND (μS cm ⁻¹)	66	2.443	2336.667	660.088	407.773
Na (mg kg ⁻¹)	66	3.667	503.333	26.682	69.614
K (mg kg ⁻¹)	66	4.000	183.333	36.530	32.585
NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹)	66	5.517	1551.003	185.337	298.348
Ca (mg kg ⁻¹)	66	61.000	5833.333	1096.616	946.094
Sāļums EC	66	0.200	2.133	0.584	0.331
P ₂ O ₅ (mg kg ⁻¹)	66	33.000	1925.000	285.923	282.980

PCA analīzes rezultāti – augsnes analīžu rādītāju ietekmes slodze uz galvenajiem komponentiem (F1, F2, F3, F4)

	Galvenie komponenti				
	F1	F2	F3	F4	F5
Genotips	0.112	0.847	0.157	-0.200	-0.123
pH	-0.310	0.451	0.360	0.602	-0.349
COND	0.833	0.183	0.184	-0.134	0.129
Na	0.024	-0.312	0.790	0.270	0.338
K	0.708	-0.144	-0.109	0.054	-0.422
NO ₃ ⁻	0.598	0.460	-0.043	-0.047	0.444
Ca	0.861	-0.218	0.037	0.073	-0.213
Augsnes sāļums	0.918	-0.120	0.171	0.054	-0.076
P	0.286	0.088	-0.574	0.665	0.264