

Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte  
*Latvia University of Life Sciences and Technologies*  
Lauksaimniecības fakultāte  
*Faculty of Agriculture*



Mg. biol. Alise Klūga 

## GUMINBAKTĒRIJU DAUDZVEIDĪBA LATVIJAS AUGSNĒS

*DIVERSITY OF RHIZOBIA IN LATVIAN SOILS*

Promocijas darba KOPSAVILKUMS  
zinātņu doktora grāda (Ph.D.) iegūšanai  
lauksaimniecības, meža un veterinārās zinātnēs

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

Jelgava  
2023

Darba zinātniskā vadītāja / *Scientific supervisor*  
Darba zinātniskais vadītājs / *Scientific supervisor*

Dr. biol. **Ina Alsiņa**  
Dr. biol. **Nils Rostoks**

Darba recenzenti / *Reviewers:*

Dr. agr. **Gunita Bimšteine**  
Dr. agr. **Sanita Zute**  
PhD **Gunārs Lācis**

**Promocijas darba aizstāvēšana** paredzēta Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes Lauksaimniecības un zivsaimniecības zinātnes, mežzinātnes ar specializāciju “Lauksaimniecība” atklātajā sēdē 2023. gada 20. oktobrī plkst. 10:00, Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātē, 123. auditorijā, Lielā ielā 2, Jelgavā.

***The defence of Thesis will be held in an open session of the Promotion Board in Field of Agriculture and Fisheries Sciences, Forest science with specialization in “Agriculture” on 20<sup>th</sup> of October, at 10:00 in room 123, Latvia University of Life Sciences and Technologies, Liela Street 2, Jelgava.***

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

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

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

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

**Darbs izstrādāts:** no 2015.–2022. gadam, LBTU Augsnes un augu zinātņu institūtā un LBTU Molekulārās bioloģijas un mikrobioloģijas nodaļā, projektu Eurolegume un LegumeGap ietvaros.

**This work has been carried out:** from 2015–2022, LBTU Institute of Soil and Plant Sciences, and LBTU Molecular biology and microbiology department, within projects Eurolegume and LegumeGap.



Enhancing of legumes growing in Europe through  
sustainable cropping for protein supply for food and feed  
FP7 Research Project № 61378



## SATURS

PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE	4
MATERIĀLI UN METODIKA	7
Gumiņbaktēriju celmi	7
Gumiņbaktēriju identifikācija	8
Augsnes analīzes	12
PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA	13
LBTU kolekcijā esošo gumiņbaktēriju celmu inventarizācija	13
Gumiņbaktēriju celmu ģenētiskā identifikācija	13
Identificēto gumiņbaktēriju izplatība Latvijas augsnēs	27
Gumiņbaktēriju un endofītisko baktēriju daudzveidība, efektivitāte un potenciālais pielietojums tauriņziežu inokulācijā	35
SECINĀJUMI	38
PATEICĪBAS	39

## CONTENT

TOPICALLY OF THE RESEARCH	40
MATERIALS AND METHODS	42
Rhizobia strains	42
Rhizobia strain identification	43
Soil analysis	45
RESULTS AND DISSCUSSION	46
Inventory of LBTU rhizobia strain collection	46
Genetic identification of rhizobia strains	46
Distribution of identified rhizobia strains in Latvian soils	53
Diversity, efficiency and potential application of rhizobia and endophytic bacteria in legume inoculation	56
CONCLUSIONS	58
ACKNOWLEDGMENTS	59

## PĒTĪJUMA AKTUALITĀTE

Tauriņzieži pēdējos gados visā pasaulē nokļuvuši zinātnieku, lauksaimnieku, kā arī patēriņtāju uzmanības centrā. Lielā nozīme tauriņziežiem ir augsnes bagātināšanā ar slāpekli, uzlabojot augsnes auglību un pasargājot to no erozijas (Giller, Herridge, Sprent, 2016; Voisin et al., 2014). Šobrīd ES netiek audzēts pietiekoši daudz tauriņziežu, lai spētu nodrošināt vietējo pārtikas un lopbarības pieprasījumu. Lielāko daļu tauriņziežus, ko ES patēriņtā pārtikā, līdzīgi kā lopbarības tauriņziežus – importē no citām valstīm. Aramzeme, kas atvēlēta tauriņziežu audzēšanai, ES pēdējos piecdesmit gados ir sarukusi no 4.6% līdz 1.8% (Zander et al., 2016). Vietējo tauriņziežu audzēšanas apjoma palielināšanu iesaka, lai samazinātu Eiropas atkarību no importētā proteīna lopbarībai (Watson et al., 2017).

Nozīmīgu lomu tauriņziežu audzēšanā ieņem gumiņbaktērijas – augsnes baktērijas, kas 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 (Wang et al., 2019a). Gumiņbaktērijas atšķiras savā atmosfēras slāpekļa saistīšanas efektivitātē, un šīs atšķirības novērojamas ne tikai starp atšķirīgām gumiņbaktēriju sugām, bet arī vienasugas celmiem. 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. Turklat 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 pasaule, tomēr ir novēroti pretrunīgi rezultāti. Viens no iemesliem ir tas, ka trūkst informācija par gumiņbaktēriju daudzveidību. Latvijā līdz šim nav veikta kolekcijas gumiņbaktēriju taksonomiskās piederības noteikšana, izmantojot ģenētiskās analīzes. Gumiņbaktēriju filogenētiskie pētījumi ir nepieciešami, lai papildinātu zināšanas par gumiņbaktēriju daudzveidību, tajā pašā laikā, sniegtu uz pētījumiem balstītas zināšanas, kas palīdzētu izvēlēties atbilstošus gumiņbaktēriju celmus komerciālu tauriņziežu sēklu inokulācijas preparātu ražošanai.

### **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 celiem.
3. Noteikt LBTU Gumiņbaktēriju kolekcijā esošo un jaunizdalīto gumiņbaktēriju celmu taksonomisko piederību.
4. Izvērtēt identificēto gumiņbaktēriju celmu daudzveidību.
5. Analizēt identificēto gumiņbaktēriju celmu daudzveidību atkarībā no saimniekaugiem un augsnēs agroķīmiskajiem rādītājiem.

## **Promocijas darba hipotēze**

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

## **Promocijas darba tēzes**

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

## **Pētījuma rezultātu aprobācija**

Par šī pētījuma rezultātiem sagatavotas 8 publikācijas, no kurām 6 indeksētas Scopus vai Web of Science datubāzēs.

1. Klūga A., Dubova L., Alsiņa 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. 73, No. 1, p. 127–141.
2. Bērtiņš M., Klūga A., Dubova L., Petrēvics P., Alsiņa 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., Senberga<sup>1</sup> 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., Alsiņa I., Ruža A., Šenberga<sup>1</sup> A. (2018). Impact of faba bean (*Vicia faba* L.) cultivation on soil microbiological activity. *Agronomy Research*, Vol. 16, No. 5, p. 2016–2025.
5. Senberga<sup>1</sup> 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. Šenberga<sup>1</sup> A., Dubova L., Alsiņa I., Strauta L. (2017). *Rhizobium* sp. – a potential tool for improving protein content in peas and faba beans. *Rural sustainability research*, Vol. 37, No. 332.

Rezultāti apkopoti 3 publikācijās semināru rakstu krājumos, kā arī sniegti 6 mutiskie ziņojumi un 17 stenda referāti zinātniskās konferencēs, no kuriem būtiskākie:

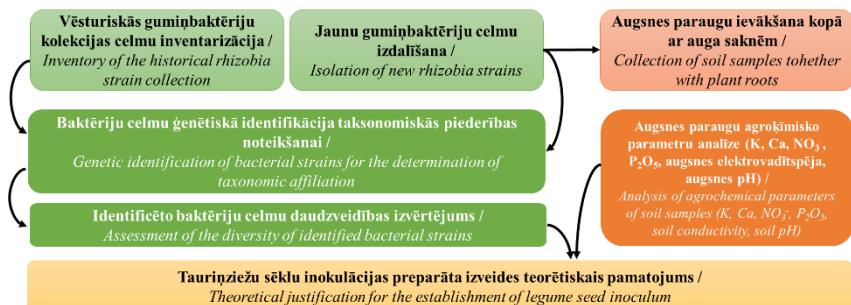
1. Klūga A., Alsiņa I., Dubova L., Lepse L., Zeipiņa S. Lauka pupu un sojas šķirņu izvērtējums, gumiņbaktēriju efektivitāte un galvenie faktori augstākas pākšaugu ražas iegūšanai. *Līdzsvarota lauksaimniecība: zinātniski praktiskā konference* – Jelgava. 2021. gada 25. februāris.
2. Senberga<sup>1</sup> A., Dubova L., Alsina I. Germination and growth of primary roots of inoculated bean (*Vicia faba*) seeds under different temperatures. *9th International Conference “Biosystems engineering 2018”*. May 9–11, 2018, Tartu, Estonia.
3. Senberga<sup>1</sup> 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.
4. Šenberga<sup>1</sup> 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.
5. Šenberga<sup>1</sup> 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.
6. Senberga<sup>1</sup> 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.

---

<sup>1</sup> manīts uzvārds no Šenberga uz Klūga

## MATERIĀLI UN METODIKA

Pētījums veikts vairākos soļos (1. att.): LBTU Augsnes un augu zinātnju institūta Gumiņbaktēriju kolekcijas celmu (turpmāk – vēsturiskā kolekcija) inventarizācija; jaunu gumiņbaktēriju celmu izdalīšana; augsnes paraugu ievākšana un agroķīmisko parametru analīze; vēsturiskās kolekcijas un jauniegūto celmu taksonomiskās piederības noteikšana ar molekulārās bioloģijas metodēm; identificēto celmu daudzveidības noteikšana. Baktēriju taksonomiskās piederības un daudzveidības rezultāti, kā arī augsnes agroķīmisko parametru analīžu rezultāti izmantoti, lai noteiktu tauriņziežu sēklu inokulācijas preparātiem atbilstošākās celmu asociācijas.



1. att. **Promocijas darba pētījuma struktūras shematiskais attēlojums**  
Fig. 1. Schematic representation of the research structure of the doctoral thesis

## Gumiņbaktēriju celmi

Daļa no pētījumā izmantotajiem baktēriju paraugiem ir vēsturiskās kolekcijas gumiņbaktēriju celmi (1962.–2015. g.; 1. tab.; 2. att.), daļa – baktēriju celmi izdalīti šī pētījuma laikā (2016.–2019. g.; 2. att.). Lai izdalītu jaunus baktēriju celmus, saimniekaugu izraka un izcēla no augsnes, nebojājot sakņu sistēmu un nezaudējot gumiņus. Auga sakņu daļu un augsnes paraugu tālākām analīzēm ievietoja plastmasas maisiņā. Visus gumiņus no viena auga uzglabāja vienā centrifūgas stobriņā, kas saturēja silikagēlu un vati (1:1).

### Baktēriju celmu izdalīšana no gumiņiem

Gumiņus pirms gumiņbaktēriju izdalīšanas ievietoja traukā ar destilētu ūdeni (dH<sub>2</sub>O) uz 24h 20 °C. Veica virsmas sterilizēšanu – 1 min 70% spirta šķīdumā, 2–4 min 3–5% nātrijs hipohlorīta šķīdumā; skaljoja 3–5 reizes sterilā

dH<sub>2</sub>O, saberza ar steriliu stikla spiekīti H<sub>2</sub>O pilienā mikrocentrifūgas stobriņā, suspensiju uztriepa uz YMA Petri plates.

1. tabula / Table 1

**LBTU Augsnes un augu zinātnu institūta Gumiņbaktēriju kolekcijas celmi**  
*/ Rhizobia strain collection of LBTU Soil and Plant Sciences*

Nr.	Gumiņbaktēriju celms / <i>Rhizobia strain</i>	Saimniekaugs / Host plant
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 / Unknown

### **Gumiņbaktēriju tīrkultūru iegūšana**

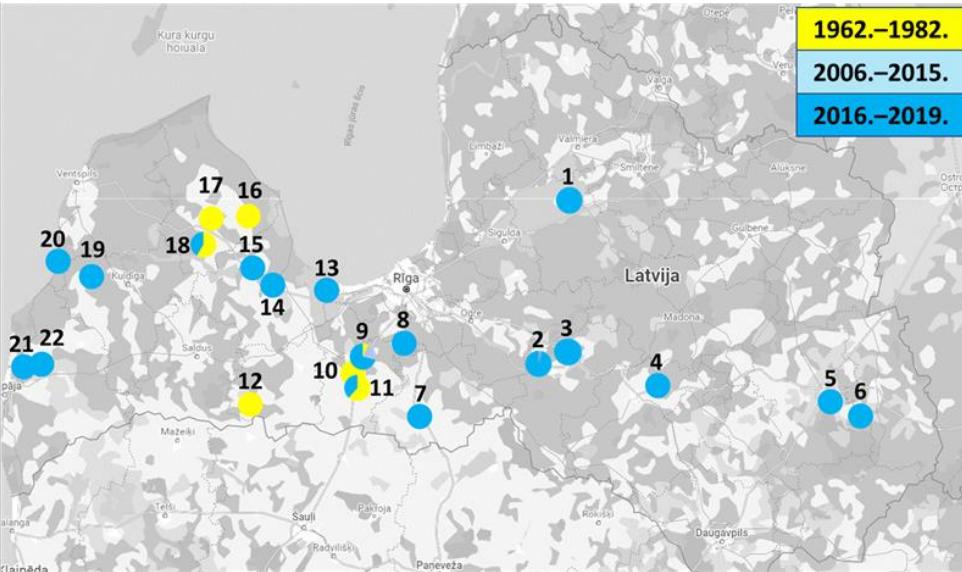
Baktēriju tīrkultūru iegūšanai izmantoja YMA Petri plates, papildinātas ar indikatoru krāsvielām – Kongo sarkano vai bromtimola zilo. Petri plates inkubēja tumsā 25–30 °C, 3–10 dienas. Tīrkultūru iegūšanai izmantoja atšķaidījumu metodi: 1 mL sterilā H<sub>2</sub>O izšķidināja 1 μL baktēriju paraugu; 100 μL pārnesa uz nākamo stobriņu, kas saturēja 900 μL sterilu H<sub>2</sub>O, izšķidināja un atkal pārnesa 100 μL uz nākamo stobriņu. Šādi turpināja līdz ieguva piecus stobriņus ar dažādiem atšķaidījumiem. 100 μL no katras atšķaidījuma pārnesa uz jaunu YMA Petri plati; tās inkubēja tumsā 25–30 °C 5 dienas. Šādu attīrišanu veica vismaz divas reizes. Attīritos celmus reizi gadā pārsēja uz jaunām barotnēm. Visiem celmiem izveidoja vienotu kolekcijas kodu sistēmu.

### **Gumiņbaktēriju identifikācija**

#### **DNS izdalīšana**

Gumiņbaktēriju celmu identifikācijai ar molekulārās bioloģijas metodēm izmantoja celmu tīrkultūras: 1 μL paraugu ievietoja 1.5 mL centrifūgas stobriņā, kas saturēja 100 μL *PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent* šķidumu, lai veiktu DNS izdalīšanu. Paraugu samaisīja kratot 30 Hz 30 s,

1. Priekuļi; 2. Skrīveri; 3. Kokneses nov.; 4. Kūkas pag.; 5. Griškānu pag.; 6. Stolerovas pag.; 7. Bauska; 8. Olaines nov.; 9. Jelgava; 10. Dimzas; 11. Pēterlauki; 12. Vecauce; 13. Jūrmala; 14. Tumes pag.; 15. Pūre; 16. Plavas; 17. Talsi; 18. Stende; 19. Ēdoles pag.; 20. Jūrkalnes pag.; 21. Medzes pag.; 22. Tadaikai pag. / 1. Priekuļi; 2. Skrīveri; 3. Kokneses Municipality; 4. Kukas Parish; 5. Griskani Parish; 6. Stolerova Parish; 7. Bauska; 8. Olaine Municipality; 9. Jelgava; 10. Dimzas; 11. Peterlauki; 12. Vecauce; 13. Jurmala; 14. Tume Parish; 15. Pure; 16. Plavas; 17. Talsi; 18. Stende; 19. Edoles Parish; 20. Jurkalnes Parish; 21. Medze Parish.; 22. Tadaiki Parish.



2. att. Teritorijas Latvijā, kur veikta baktēriju izdalīšana no tauriņziežu guminiem / Fig. 2. Sites in Latvia where bactecia isolation from legume nodules has been carried out

Aplā diagramma procentuāli norāda laika posmu, kurā baktērijas konkrētajā paraugu ievākšanas vietā izdalītas / The percentage of the circle chart indicates the time period during which the bacteria were isolated at the specific sampling site.

karsēja 10 min 100 °C. Pēc karsēšanas 2 min atdzesēja istabas temperatūrā un centrifugēja  $14000 \times g$  2 min. Pēc centrifugēšanas 50  $\mu\text{L}$  šķiduma virsējo daļu pārvietoja jaunā 1.5 mL mikrocentrifūgas stobriņā.

### **16S rRNA gēna amplifikācija un sekvencēšana**

Lai iegūtu pilna 16S rRNA gēna sekvenci, to amplificēja trīs atsevišķas PCR reakcijās, izmantojot *MicroSeq® Full Gene 16S rDNA Bacterial Identification PCR* komplektu. Gumiņbaktēriju DNS atšķaidīja 1:50, izmantojot nukleāžu brīvu H<sub>2</sub>O. 7  $\mu\text{L}$  DNS sajauca ar 7  $\mu\text{L}$  *MicroSEQ™ PCR* maisījumu. 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 16S rRNA gēna fragmentu. Amplificēja arī kontroles paraugus – *E. coli* (pozitīvā kontrole) un nukleāžu brīvu H<sub>2</sub>O (negatīvā kontrole). DNS fragmentu amplifikāciju veica PCR iekārtā, izmantojot 9600 simulācijas režīmu (2. tab.).

2. tabula / Table 2

**Polimerāzes ķēdes reakcijas programma 16S rRNA gēna fragmentu amplifikācijai / 16S rRNA gene fragment amplification polymerase chain reaction program**

Temperatūra (°C) / Temperature (°C)	Ilgums / Duration	Ciklu skaits / Number of cycles
95	10 min	1
95	30 s	30
60	30 s	
72	45 s	1
72	10 min	
4	$\infty$	1

PCR produkta kvalitāti pārbaudīja, izmantojot agarozes gelu. Paraugi, kuriem nebija novērojams amplificētais DNS fragments, vai bija novērojamas blakus zonas, netika izmantoti turpmākai analīzei. Amplificēto PCR produktu (5  $\mu\text{L}$ ) attīrīja, pievienojot 1.5  $\mu\text{L}$  maisījumu, kas satur 0.5  $\mu\text{L}$  eksonukleāži (20 vienības  $\mu\text{L}^{-1}$ ) un 1  $\mu\text{L}$  sārmaino fosfatāzi (1 vienība  $\mu\text{L}^{-1}$ ), apstrādāja 37 °C 15 min, un 85 °C 15 min. Attīrītā PCR produkta sekvencēšanas reakciju veica, izmantojot *MicroSeq® Full Gene 16S rDNA Bacterial Identification Sequencing* komplektu. Šajā komplektā ietilpst reāgenti trīs dažādu 16S rRNA gēna fragmentu sekvencēšanai gan ar tiešajiem gan atgriezeniskajiem praimeriem. Reakcijas maisījumu sagatavoja atbilstoši komplekta instrukcijai. Sekvencēšanas reakciju (3. tab.) veica PCR iekārtā ar 9600 simulācijas režīmu.

3. tabula / Table 3

**16S rRNS gēna amplificētā fragmenta sekvencēšanas polimerāzēs kēdes reakcijas programma / 16S rRNA gene amplified fragment sequencing polymerase chain reaction program**

Temperatūra (°C) / Temperature (°C)	Ilgums / Duration	Ciklu skaits / Number of cycles
96	10 s	25
50	5 s	
60	4 min	
4	∞	1

Sekvencēšanas PCR produktu attīrišanu veica, izmantojot kārtridžus (*MicroSEQ™ ID Sequencing Clean-up Cartridges*), vadoties pēc ražotāja norādījumiem. Sekvencēšanas PCR produktu elektroforēzi veica, izmantojot Sanger 3500 ģenētisko analizatoru ar kapilāru garumu 50 cm, izmantojot polimēry POP-7™. 96 bedrīšu platē katrā bedrītē ievietoja 10 µL *Hi-Di™* formamīda un 10 µL attīritā sekvencēšanas PCR parauga.

### 16S rRNS sekvencēšanas rezultātu analīze

Sekvencēšanas rezultātus analizēja, izmantojot *CLC Main Workbench 20.0.2.* programmu. Visas sekvences manuāli pārbaudīja un izlaboja, salīdzinot iegūtos hromatogrammas pīķus ar programmas identificētajiem nukleotīdiem. Visas iegūtās viena parauga 16S rRNS gēna fragmentu sekvences apkopoja vienā sekvencē, kuru izmantoja celmu identifikācijai, kā arī filoģenētiskajām analīzēm. Gumiņbaktēriju celmu taksonomisko piederību noteica, izmantojot publiski pieejamo NCBI GenBank standarta nukleotīdu datubāzes meklēšanas programmu BLAST®. No datubāzes rezultātiem izmantoja organismu, kuram uzrādīja pētāmajam celmam tuvāko sekvences līdzību. Genotipu taksonomisko piederību papildus pārbaudīja, izmantojot brīvpiejas datubāzi SILVA.

### 16S rRNS sekvencēšanas datu statistiskā analīze

Visas celmu pilna garuma 16S rRNS gēna sekvences analizēja, veicot daudzkārtējo sekvenču salīdzinājumu *CLC Main Workbench 20.0.2.* programmā (parametri: *gap open cost = 10.0; gap extension cost = 1.0; end gap cost = as any other; alignment mode = very accurate*). Sekvenču salīdzinājumā iekļāva atsauces celmus. Filoģenētiskā koka izveidei no sekvenču salīdzinājuma izņēma ārā celmus ar identiskām sekvencēm, atstājot vienu reprezentatīvu paraugu katram genotipam. Filoģenētisko koku izveidoja, izmantojot *Neighbor Joining* filoģenētiskās dendrogrammas konstrukcijas metodi un *Kimura 80* nukleotīdu aizvietošanas modeli. Filoģenētiskā koka būtiskuma un evolucionārās ticamības pārbaudei, izmantoja butstrapa analīzes metodi 1000 atkārtojumos.

### 16S rRNS gēna mainīgo reģionu aprēķināšana

Pilna garuma 16S rRNA gēna mainīgos un konservatīvos reģionus noteica, aprēķinot, cik bieži pētāmo gumiņbaktēriju celmu daudzīkārtējā sekvenču salīdzinājumā noteiktā pozīcijā (bp) ir visbiežāk sastopamais nukleotīds:

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

kur:

a = nukleotīda sastopamība konkrētajā pozīcijā sekvenču salīdzinājumā;  
k = maksimālais biežuma indekss (= 1);  
n = kopējais paraugu skaits sekvenču salīdzinājumā.

## Augsnes analīzes

Augsnes paraugus ievāca vienlaicīgi ar jaunu gumiņbaktēriju celmu izdalīšanu. Paraugus uzglabāja plastmasas maisiņos, sausā telpā, istabas temperatūrā līdz analīžu veikšanai (līdz trīs mēnešiem).

### Augsnes agrokīmisko rādītāju mērījumi

Augsnes paraugus analizēja izmantojot divas dažādas metodes. Augsnes elektrovadītspēju, pH, Na, K,  $\text{NO}_3^-$  un Ca noteica ar Horiba LAQUAtwin mērītājiem. Paraugam pievienoja  $\text{dH}_2\text{O}$  attiecībā 1:1 50 mL centrifūgas stobriņā, sakratīja un atstāja istabas temperatūrā 24 h. Augsnes paraugus centrifugēja, augsnes analīzēm izmantoja šķīduma virsējo daļu. Mērījumam izmantoja 0.1 mL parauga. Mērījumus ar veica trīs atkārtojumos.

Fosfātu ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) saturu augsnē noteica LBTU Augsnes un augu zinātnu institūta laboratorijā pēc Egnera-Rīma metodes (LV ST ZM 82-97).

### Augsnes agrokīmisko rādītāju rezultātu datu apstrāde

Augsnes agrokīmisko rādītāju analīžu rezultātus apskatīja gan pēc izdalīto gumiņbaktēriju saimniekaugiem, gan pēc identificētajām baktēriju ģintīm/sugām. Datu vizualizācijai izmantoja *MS Excel* programmas kastveida un nogriežņa procentīlu diagraumas, uzrādot datu izkliedi konkrētās grupas ietvaros. Statistiskās analīzes veica programmā *MS Excel*, ar brīvpieejas spraudni *XLSTAT*. Pētāmo pazīmju lineārās sakarības ciešuma noteikšanai izmantoja Pīrsona korelācijas analīzi:  $0 - 0.299 =$  vāja sakarība;  $0.3 - 0.699 =$  vidēji ciešā sakarība;  $0.7 - 1.0 =$  ciešā sakarība. Lai noteiktu augsnes analīžu rādītāju ietekmi savā starpā, veica PCA (galveno komponentu analīze) analīzi, konstruējot augsnes analīžu rādītāju slodzes grafiku.

## PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA

### LBTU kolekcijā esošo gumiņbaktēriju celmu inventarizācija

Pētījumā veica LBTU vēsturiskās gumiņbaktēriju kolekcijas un no jauna izdalīto gumiņbaktēriju celmu inventarizāciju, rezultātā iegūstot baktēriju tūrkultūras un apkopojot pieejamo informāciju par šiem celmiem. Vēsturiskā gumiņbaktēriju kolekcija saturēja 34 gumiņbaktēriju celmus (1. tab.). Pēc inventarizācijas kolekcijā atrodas 46 attīrīti vēsturiskās kolekcijas celmi un 143 jauni baktēriju celmi. Kopumā atjaunotajā gumiņbaktēriju kolekcijā atrodas 189 celmi, izdalīti no 1962.–2019. g., no 14 dažādām tauriņziežu ģintim – 59 celmi no lauka pupām, 32 no sojas, 23 no āboliņa, 22 zirņiem un 15 celmi no lucernas. Savukārt no atlikušajiem 10 ģinšu pārstāvjiem no katras izdalīti mazāk par 10 gumiņbaktēriju celmiem. Kolekcijas celmi izdalīti no 15 dažādiem novadiem Latvijā, kā arī 3 teritorijām ārpus Latvijas.

### Gumiņbaktēriju celmu ģenētiskā identifikācija

Gumiņbaktēriju celmu taksonomiskās piederības noteikšanai analizēja pilnu 16S rRNA gēnu, to amplificējot trīs atsevišķos fragmentos. Katru fragmentu sekvencēja, izmantojot gan tiešo, gan atgriezenisko praimeri. Kopumā analizēja 173 gumiņbaktēriju celmus, veicot 1038 sekvencēšanas reakcijas. Kvalitatīvus hromatogrammas rezultātus uzrādīja 146 baktēriju celmi. Visi identificētie celmi uzrādīja  $\geq 99\%$  līdzību ar datubāzē pieejamo organismu sekvencēm. Baktēriju celmus ar identiskām sekvencēm apvienoja vienā genotipā, iegūstot 62 unikālus genotipus. Identificētie celmi (4. tab.) pieder pie četrām baktēriju klasēm –  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -proteobacteria un *Bacilli*. Lielākā daļa identificēto paraugu (96 celmi) pieder  $\alpha$ -, 15 celmi –  $\beta$ -, bet 28 celmi –  $\gamma$ -proteobaktēriju klasei. Septiņi identificētie celmi pieder *Bacilli* klasei. Visu identificēto baktēriju celmu sekvences deponēja NCBI GenBank datubāzē.

Identificēto celmu genotipu taksonomisko piederību pārbaudīja ar SILVA būrviejas datubāzi. Gints līmenī 92% genotipu identitāte sakrita abās datubāzēs. No tiem 76% uzrādīja identiskus rezultātus; 8%, kuri GenBank identificēti gints līmenī, SILVA datubāzē identificēti sugars līmenī; 2% sakrita identificētās gints, bet atšķīras sugars identitāte. Atšķirīgu taksonomisko piederību noteica 8% genotipu (RhSP05–RhSP09). Pēc GenBank datubāzes datiem šie genotipi identificēti kā *Rhizobium*, savukārt pēc SILVA – kā *Agrobacterium* ģintij piederoši. Zināms, ka *Rhizobium* un *Agrobacterium* ir tuvradnieciskas un bieži gūti atšķiramas ģintis. Tāpēc identificējot taksonomisko piederību, jāņem vērā arī fenotipiskās pazīmes, veicot paraugu ievākšanu.

4. tabula / Table 4

**No tauriņiežu gumiņiem izdalīto baktēriju ģenētiskā identifikācija,  
izmantojot pilna garuma 16S rRNA gēna sekвences /**

*Genetic identification of bacteria strains isolated from legume nodules, using full-length 16S rRNA gene sequences*

Nr. / Nr.	Genotips (paraugu grupas kods filoģētiskajā kokā) / Genotype (sample group code in the phylogenetic tree)	Genotipā iekļauto baktēriju celmu skaits / Number of strains included in the genotype	Taksono- miskais iedalījums (klase) / Taxonomic category (Class)	Taksonomiskā piedeरība / Taxonomic affiliation
1	RhL01	31	<i>α-proteobacteria</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> / <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> / <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>
2	RhL05	1		<i>R. leguminosarum</i>
3	RhL03	1		<i>R. leguminosarum</i> / <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>
4	RhL06	1		<i>R. leguminosarum</i>
5	RhL02	6		<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>
6	RhSP01	1		<i>Rhizobium</i> sp. / <i>Bradyrhizobium</i> sp. / <i>R. leguminosarum</i>
7	RhSP02	1		<i>Rhizobium</i> sp. / <i>Bradyrhizobium</i> sp. / <i>R. leguminosarum</i>
8	RhG01	4		<i>Rhizobium gallicum</i>
9	RhL04	1		<i>Rhizobium leguminosarum</i>
10	ShSP01	1		<i>Ensifer adhaerens</i> <i>Sinorhizobium</i> sp.
11	RhSP03	1		<i>Rhizobium</i> sp.
12	RhSP04	1		<i>Rhizobium</i> sp.
13	RhSP05	16		<i>Rhizobium</i> sp.
14	RhSP07	13		<i>Rhizobium</i> sp.
15	RhSP08	1		<i>Rhizobium</i> sp.
16	RhSP09	1		<i>Rhizobium</i> sp.
17	RhSP06	7		<i>Rhizobium</i> sp.
18	NhG01	3		<i>Neorhizobium galegae</i>
19	MhSP01	1		<i>Mesorhizobium</i> sp.
20	MhSP02	1		<i>Mesorhizobium</i> sp.
21	ASP01	1		<i>Azospirillum</i> sp.
22	BhJ01	1		<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
23	RhSP10	1		<i>Rhizobium</i> sp.

4. tabulas turpinājums / continuation of Table 4

Nr. / Nr.	Genotips (paraugu grupas kods filoģētiskajā kokā) / Genotype (sample group code in the phylogenetic tree)	Genotipā iekļauto baktēriju celmu skaits / Number of strains included in the genotype	Taksono -miskais iedalīju ms (klase) / Taxono mic category (Class)	Taksonomiskā piederība / Taxonomic affiliation
24	PbT01	3	$\beta$ -proteobacteria	<i>Paraburkholderia terricola</i>
25	PbT02	1		<i>Paraburkholderia terricola</i>
26	PbT03	2		<i>Paraburkholderia terricola</i>
27	PbT04	1		<i>Paraburkholderia terricola</i>
28	BSP04	3		<i>Burkholderia</i> sp.
29	BSP05	1		<i>Burkholderia</i> sp.
30	BSP06	1		<i>Burkholderia</i> sp.
31	PbC01	1		<i>Paraburkholderia caledonica</i>
32.	BSP07	1		<i>Burkholderia</i> sp.
33	AcSP01	1		<i>Achromobacter</i> sp.
34	RA01	2	$\gamma$ -proteobacteria	<i>Rahnella aquatilis</i>
35	RA02	3		<i>Rahnella aquatilis</i>
36	RA03	1		<i>Rahnella aquatilis</i>
37	SrP01	1		<i>Serratia plymuthica</i>
38	SrP02	1		<i>Serratia plymuthica</i>
39	SrP04	1		<i>Serratia plymuthica</i>
40	ESP01	1		<i>Enterobacter</i> sp.
41	ESP02	1		<i>Enterobacter</i> sp.
42	ESP03	1		<i>Enterobacter</i> sp.
43	ESP04	1		<i>Enterobacter ludwigii</i>
44	EA01	1		<i>Enterobacter asburiae</i>
45	EL01	1		<i>Enterobacter ludwigii</i>
46	PnA01	1		<i>Pantoea agglomerans</i>
47	PnA02	1		<i>Pantoea agglomerans</i>
48	PnSP01	1		<i>Pantoea agglomerans</i>
49	SrP03	1		<i>Serratia plymuthica</i>
50	SrP05	1		<i>Serratia plymuthica</i>
51	PSP01	1		<i>Pseudomonas</i> sp.
52	PSP02	1		<i>P. frederiksbergensis</i>
53	PSP04	2		<i>Pseudomonas</i> sp.
54	PSP05	1		<i>Pseudomonas</i> sp.
55	PSP06	1		<i>Pseudomonas</i> sp.
56	PSP07	1		<i>Pseudomonas</i> sp.
57	PSP08	1		<i>Pseudomonas</i> sp.

4. tabulas nobeigums / end of Table 4

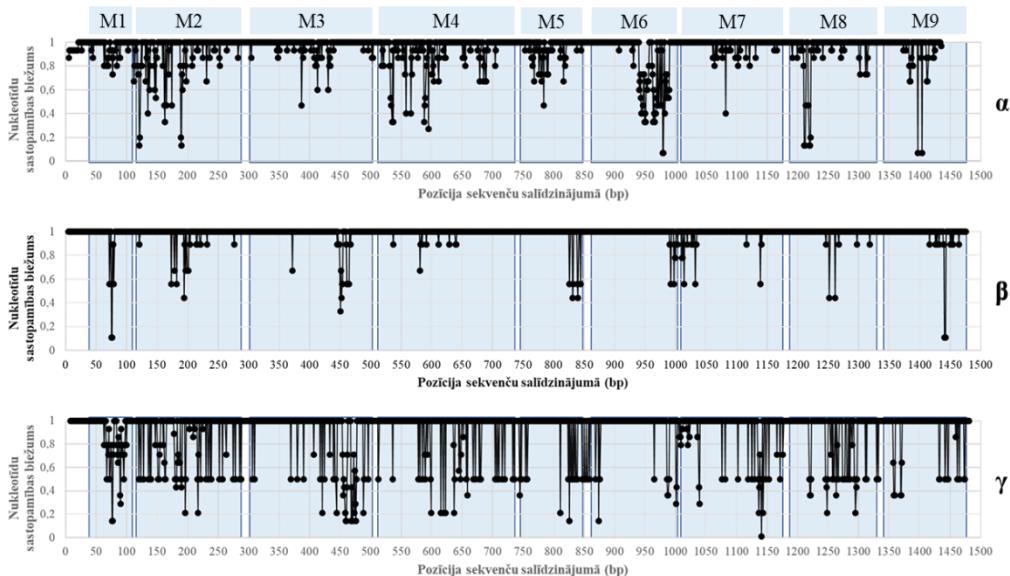
Nr. / Nr.	Genotips (paraugu grupas kods filoģētiskajā kokā) / Genotype (sample group code in the phylogenetic tree)	Genotipā iekļauto baktēriju celmu skaits / Number of strains included in the genotype	Taksono -miskais iedalīju ms (klase) / Taxono mic category (Class)	Taksonomiskā piederība / Taxonomic affiliation
58	PaSP05	2	Bacilli	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
59	PaSP01	2		<i>Paenibacillus polymyxa</i>
60	PaSP02	1		<i>Paenibacillus peoriae</i>
61	PaSP03	1		<i>Paenibacillus polymyxa</i>
62	PaSP04	1		<i>Paenibacillus polymyxa</i>

### Gumiņbaktēriju celmu 16S rRNS gēna konservatīvie un mainīgie reģioni

Pētījumā noteica 16S rRNS gēna mainīgos un konservatīvos reģionus, salīdzinot rezultātus starp trīs pētāmajām proteobaktēriju klasēm, kā arī tos salīdzinot ar literatūras datiem (3. att.). Vistuvākā atbilstība mainīgajiem reģioniem ir  $\alpha$ -proteobaktērijām. Sekvenču mainīgums  $\beta$ -proteobaktērijām novērojams mazāk, tomēr tas atrodas tajos pašos reģionos, kā minēts literatūras datos. Savukārt  $\gamma$ -proteobaktēriju mainīgie reģioni bieži pārklājas ar literatūrā norādītajiem konservatīvajiem reģioniem. Literatūras avotos līdz šim nav atrodama šāda veida informācija par ģenētiskajām atšķirībām 16S rRNS gēna mainīgajos reģionos starp dažādām gumiņbaktēriju ģintīm. Identificējot gumiņbaktērijas, nezinot to klases piederību, kā arī nemot vērā pretrunīgo informāciju literatūras datos, būtu riskanti izmantot konkrētus mainīgos reģionus. Sie rezultāti apstiprina 16S rRNS pilna garuma gēna sekvencēšanas nozīmi arī turpmāk veicot no gumiņiem izdalīto baktēriju celmu identifikāciju.

### Gumiņbaktēriju celmu daudzveidība

Līdz šim Latvijā gumiņbaktēriju pētījumos apskatītas tikai  $\alpha$ -proteobaktēriju klasses gumiņbaktērijas, pārsvarā *Rhizobium* ģints. Šajā pētījumā pirmo reizi Latvijā no gumiņiem izdalītas baktērijas, kas pieder arī pie  $\beta$ - un  $\gamma$ -proteobaktēriju klasēm. Filoģētiskajās analīzēs izmantoja katru genotipa (kopā 62 genotipi) (4. tab.) reprezentatīvo celmu 16S rRNS gēna sekvences. Daļa no šiem genotipiem ir unikāli atsevišķiem celmiem, savukārt daļa apvieno vairākus celmus ar identiskām 16S rRNS gēna sekvencēm. Filoģētiskajā kokā, kurā ietverti visu genotipu reprezentatīvie paraugi (4. att.), kā arī atsauces celmi, genotipi sagrupēti četros klasteros. Paraugu genotipi nav sagrupējušies pēc

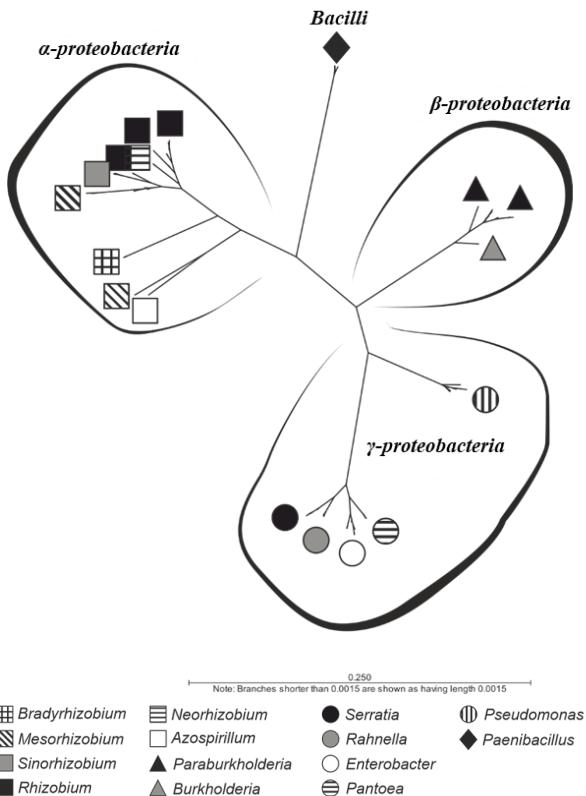


**3. att. Identificēto baktēriju celmu 16S rRNA gēna konservatīvie un mainīgie reģioni / Fig. 3. Conserved and hypervariable regions of rhizobia strain 16S rRNA gene**

Mainīgie reģioni (M1–M9) iekrāsoti gaiši zilā krāsā, balstoties uz literatūras datiem. Atsevišķi analizēti  $\alpha$ - $,$   $\beta$ - un  $\gamma$ -proteobaktēriju klasēm piederošie celmi (" $\alpha$ ", " $\beta$ " un " $\gamma$ ") / Hypervariable regions (M1–M9) are colored light blue, according to literature data. Bacteria strains from  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -proteobacteria (" $\alpha$ ", " $\beta$ ", " $\gamma$ ") were analyzed separately.

nejaušības principa, bet gan atbilstoši to taksonomiskajam iedalījumam –  $\alpha$ -proteobacteria,  $\beta$ -proteobacteria,  $\gamma$ -proteobacteria un Bacilli. No 96 identificētajiem baktēriju celmiem, kas pieder  **$\alpha$ -proteobaktēriju** klasei, 88 celmi ir *Rhizobium* sp. ģints pārstāvji – 43 no tiem *R. leguminosarum* un četri *R. gallicum* savukārt atlikušo celmu piederību varēja identificēt tikai ģints līmenī. Starp identificētajiem 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  **$\beta$ -proteobaktēriju** klasei – septiņi *Paraburkholderia terricola*, viens *P. caledonica*, pieci *Burkholderia* sp. un viens *Achromobacter* sp. ģintij piederošs baktēriju celms. No 28 baktēriju celmiem, kas pieder  **$\gamma$ -proteobaktēriju** klasei: septiņi celmi ir *Enterobacter* ģints pārstāvji, no kuriem trīs *E. ludwigii* un viens *E. asburiae*; astoņi celmi ir *Pseudomonas* sp. ģints pārstāvji, no kuriem viens celms identificēts kā *P. frederiksbergensis*; seši *Rahnella aquatilis*; četri *Serratia plymuthica* un trīs celmi identificēti kā *Pantoea agglomerans*. Septiņi identificētie baktēriju celmi pieder ***Bacilli*** klasei, no tiem seši *Paenibacillus polymyxa* un viens *Paenibacillus peoriae*.

Padziļinātai tuvradniecīgu baktēriju celmu ģenētiskajai salīdzināšanai, izveidoja filogenētiskos kokus katrai proteobaktēriju klasei. **Alfa-proteobaktēriju klases** gumīnbaktēriju celmi veido dendrogrammu (5. att.) ar 11 klasteriem. **Klasterī I** atrodas tikai divi gumīnbaktēriju celmi – abi izdalīti 2016. g., identificēti kā *R. leguminosarum*. **Klasteris II** ietver trīs genotipus, kas apvieno vēsturiskās kolekcijas un jaunizdalītos baktēriju celmus. Šis klasteris ietver skaitliski visvairāk vēsturiskās kolekcijas celmus. Dendrogrammas zaru garums starp genotipiemi ir salīdzinoši lielāks, norādot uz lielāku evolucionāro attālumu starp celmiem šajā klasterī. RhSP05 genotips ietver 16 *Rhizobium* sp. celmus, kas izdalīti no plaša spektra tauriņziežiem (1973.–2018.). Genotips RhSP06 ietver septiņus *Rhizobium* sp. celmus – trīs vēsturiskās kolekcijas celma “407” izolāti (1972. g.; lauka pupas) un četri izdalīti 2016. g. (sējas lucerna, zirņi, lupīna). RhSP07, evolucionāri vistālākais no pārējiem klastera genotipiemi, ietver 13 ģenētiski identiskus *Rhizobium* sp. celmus, no kuriem tikai divi celmi ir no jauna izdalīti (2016. g.), bet atlikušie 11 ir vēsturiskās kolekcijas celmi (1963.–2015. g.). **Klasteris III** ietver divus genotipus – RhSP04 un RhSP03, kas atbilst diviem *Rhizobium* sp. gumīnbaktēriju celmiem (2016. g.). **Klasteris IV** ietver vienu *Ensifer adhaerens/Sinorhizobium* sp. genotipu, kas atbilst vienam celmam (2016. g.; vanagnadziņš). **Klasteris V** ietver genotipus ASP01 un BhJ01, kā arī *Bradyrhizobium japonicum* atsauces genotipu. ASP01 atbilst vēsturiskajam BhJ01 ietver vienu no sojas izdalītu *B. japonicum* celmu (RSBASF/S), kas izdalīts 2019. gadā lauka izmēģinājumā, kurā sojas sēklas pirms sēšanas apstrādātas ar BASF firmas *HiStick® Soybean* gumīnbaktēriju preparātu. **Klasteris VI** ietver divus genotipus – MhSP01 un MhSP02 (2018. g.; soja), kā arī *Mesorhizobium loti* atsauces celmu. **Klasteris VIII** ietver *Neorhizobium*



4. att. Pilna 16S rRNA gēna filoģēnētiskais koks / Fig. 4. Full-length 16S rRNA gene phylogenetic tree

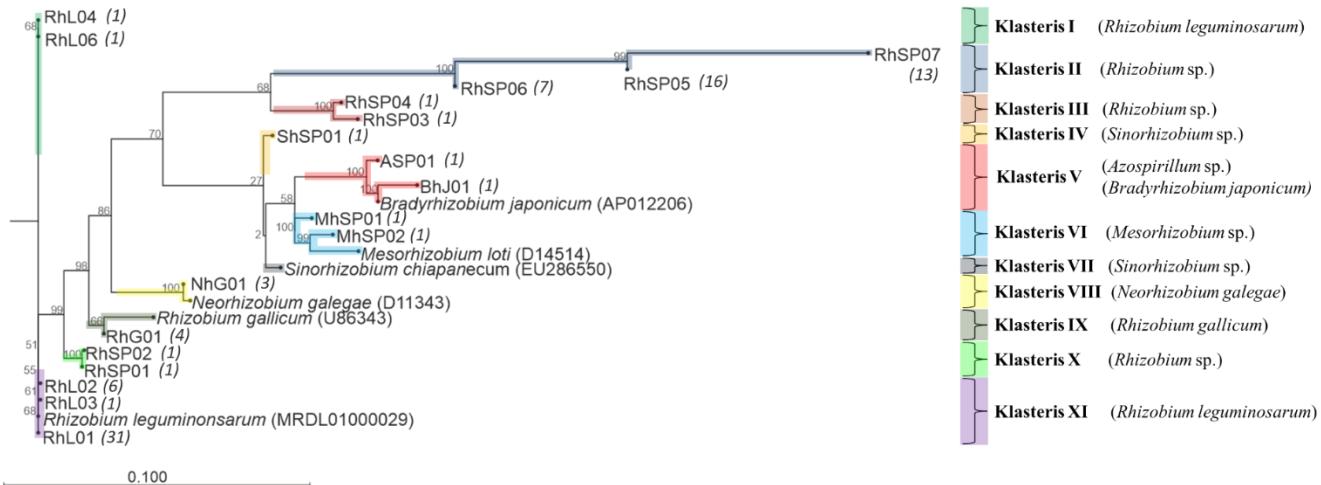
Filoģēnētiskais koks norāda uz kopējo no tauriņziežu gumijiem izdalīto un identificēto baktēriju daudzveidību Latvijā. Filoģēnētiskajā analīzē izmantoti reprezentatīvi celmu genotipi. Filoģēnētiskais koks veidots izmantojot *Neighbor Joining* dendrogrammas konstrukcijas metodi / *The phylogenetic tree represents the total diversity of bacteria isolated from legume nodules grown in Latvia. Representative strain genotypes were used for the phylogenetic analysis. The phylogenetic tree is composed using Neighbor Joining dendrogram method.*

*galegae* atsaucēs celmu un NhG01 genotipu, kas apvieno trīs *N. galegae* celmus *Azospirillum* sp. celmam “422a” (RM24502; 1971. g.; sējas lucerna); (2016., 2018. g.; *galega*). **Klasteris IX** ietver divus genotipus – RhG01 un *R. gallicum* atsaucēs celmu. RhG01 genotips atbilst četriem *R. gallicum* gumīnbaktēriju celmiem (2016. g., 2018. g.; ābolīňš, lupīna, soja). **Klastera X** genotips RhSP01 atbilst vienam gumīnbaktēriju celmam, identificēts gan kā *Rhizobium* sp., gan *Bradyrhizobium* sp., gan *R. leguminosarum* – ar vienādu ticamību (99%

sekvenču līdzība). Arī RhSP02 genotips atbilst vienam paraugam, kas, lai gan ģenētiski atšķiras no RhSP01, arī identificēts kā *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., kā arī *R. leguminosarum* ar 99% sekvenču līdzību. **Klasteris XI** apvieno genotipus – RhL01, RhL02, RhL03 un *R. leguminosarum* atsauses celmu – visi identificēti kā *R. leguminosarum*. RhL01 ir visvairāk pārstāvētais genotips šajā pētījumā – ietver 31 celmu (2016., 2018., 2019. g.; zirņi, lauka pupas, pļavas dedestiņa, vanagnadziņš, dārza pupiņas, sējas lucerna, lopbarības pupas, āboliņš un lauku blaktene). Šie gumiņbaktēriju celmi izdalīti no dažādām teritorijām Latvijā. Genotips RhL02 apvieno sešus *R. leguminosarum* gumiņbaktēriju celmus. Atšķirībā no RhL01 genotipa, kurš aptvert tikai jaunizdalītos celmus, RhL02 ietver gan vēsturiskās kolekcijas celmus (RP023Y, RP02301, RP023Z; 1964. g.), gan 2016. gadā izdalītus celmus. Genotips RhL03 atbilst vienam *R. leguminosarum* bv. *trifolii* gumiņbaktēriju celmam (2016. g.).

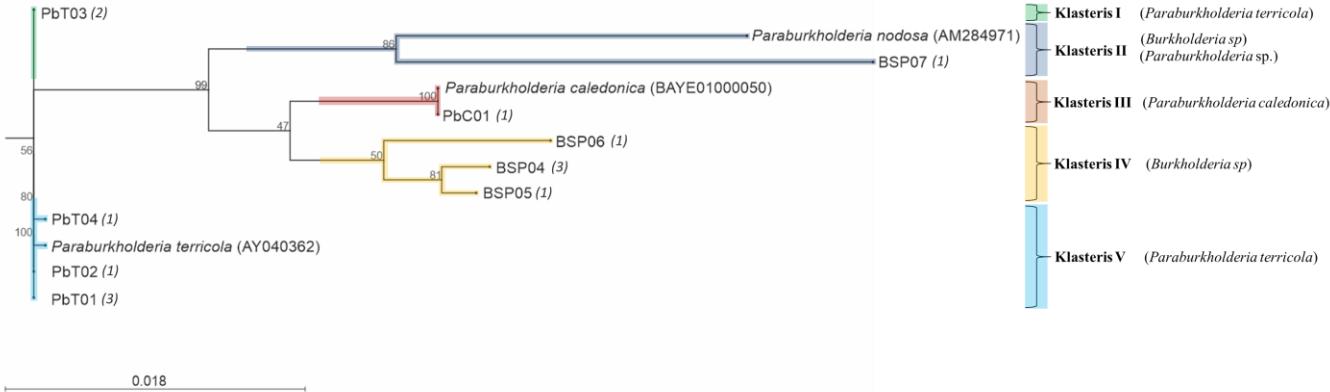
Filogenētiskajā analīzē 14 **β-proteobaktēriju klases** celmi veido dendrogrammu ar 5 klasteriem (6. att.). Šie celmi izdalīti no sojas (8 celmi), lauka pupām (5 celmi) un lucernas (1 celms) no 2016.–2019. gadam. **Klasteris I** iekļauj genotipu Pb03 (2018., 2019. g.; soja), **Klasteris II** – *P. nodosa* atsauses celmu un genotipu BSP07 (*Burkholderia* sp.). Šis celms RS2030/19 izdalīts 2019. g. veģetācijas trauku izmēģinājumā, kur sojas sēklu apstrādei izmantots celms RS2030, kas savukārt identificēts kā *Mesorhizobium* sp. **Klasteris III** ietver *P. caledonica* atsauses celmu un genotipu PbC01 (*P. caledonica*; 2019. g., lauka pupas). **Klasteris IV** ietver trīs ģenētiski atšķirīgus genotipus, visi identificēti kā *Burkholderia* sp. **Klasteris V** atbilst *P. terricola* atsauses celmam un trīs *P. terricola* genotipiem.

Baktēriju celmi, kas identificēti **γ-proteobaktēriju** klasei piederoši, filogenētiskajā kokā (7. att.) veido septiņus klasterus. 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 pārstāvētie celmi izdalīti no 2016.–2019. g., no plaša saimniekaugu spektra. Visbiežāk pārstāvētais saimniekaugs ir soja. **Klasteris I** ietver genotipus EA01 (*E. asburiae*) un ESP03 (*Enterobacter* sp.) – katrs atbilst vienam gumiņbaktēriju celmam (2019. g., saimniekaugs – soja). **Klasteris II** apvieno sešus dažādus genotipus un ietver *Pseudomonas putida* atsauses celmu. Šajā klasterī var izšķirt divus apakšklasterus, katrs ietver 3 tuvradnieciskus (bet ne identiskus) genotipus. Viens apakšklasteris apvieno genotipus PSP04 (*Pseudomonas* sp.; 2016., 2018. g.; āboliņš, soja), PSP02 (*P. frederiksbergensis*; 2018. g.; amoliņš) un PSP01 (*Pseudomonas* sp.; 2018. g.; sējas lucerna). Otrs apakšklasteris ietver genotipus PSP05, PSP06 un PSP07 – visi identificēti kā *Pseudomonas* sp. (2016. g.; āboliņš, vanagu vīķis, soja). **Klasteris III** ietver *Rahnella aquatillis* atsauses celmu un genotipus Ra02 (2018. g.; zirņi, lucerna) un Ra01 (2016., 2019. g.; lauka pupas). **Klasteris IV** ietver *Serratia plymuthica* atsauses celmu un genotipus SrP04, SrP02 (2016. g.; lupīnas) un SrP01 (2019.



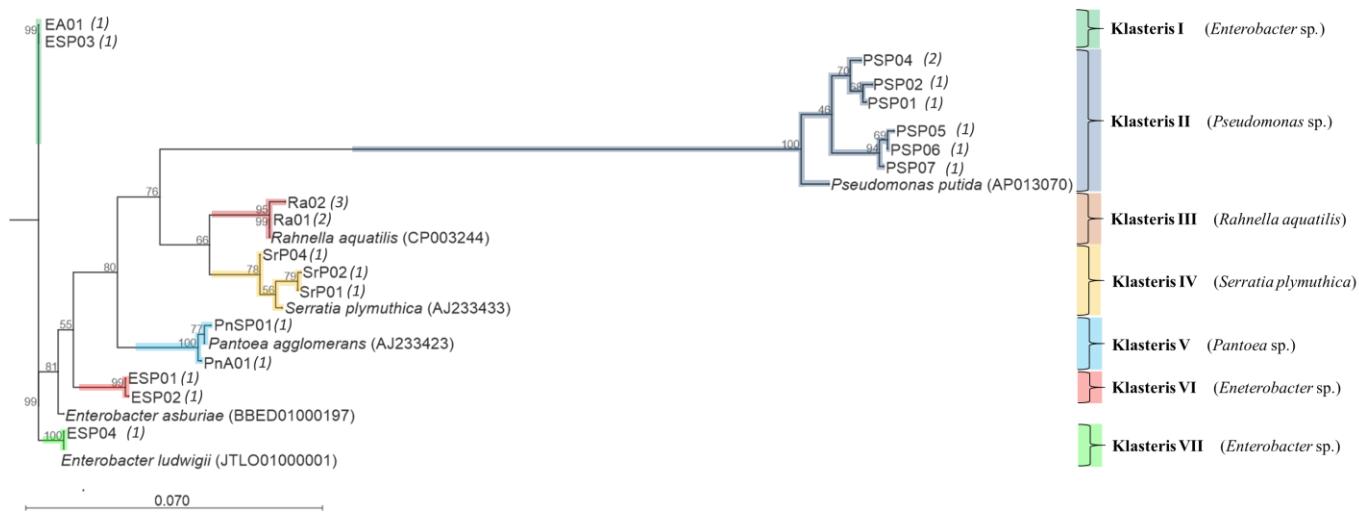
5. att. Alfa-proteobaktēriju pilna 16S rRNA gēna filoģētiskais koks / Fig. 5. Alfa-proteobacteria full-length 16S rRNA gene phylogenetic tree

Filoģētiskais koks veidots, izmantojot *Neighbor Joining* filoģētiskās dendrogrammas konstrukcijas metodi. Bootstrapa metodes analīzes vērtības, kas  $\geq 70\%$ , norādītas mezglos, un uzrāda filoģētiskā koka zarojuma ticamību. Atsauces paraugu genotipu GenBank piešķirtie kodi norādīti iekavās. Iekavās kursīvā norādīts genotipa identisko izolātu skaits. Mēroga skala norāda nukleotīdu substitūciju skaitu pozīcijā / The phylogenetic tree is composed using *Neighbor Joining* phylogenetic dendrogram method. Bootstrap analysis values that are  $\geq 70\%$  are shown in the nodes and represent the reliability of the branching. Reference strain GenBank codes are shown in the brackets. The number of identical strains within the genotype is indicated in italics. The scale indicates the number of nucleotide substitutions in the position.



6. att. **Beta-proteobaktēriju pilna 16S rRNA gēna filoģenētiskais koks / Fig. 6. Beta-proteobacteria full-length 16S rRNA gene phylogenetic tree**

Filoģenētiskais koks veidots, izmantojot *Neighbor Joining* filoģenētiskās dendrogrammas konstrukcijas metodi. Butstrapa 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 izolātu skaits. Mēroga skala norāda nukleotīdu substitūciju skaitu pozīcijā / The phylogenetic tree is composed using *Neighbor Joining* phylogenetic dendrogram method. Bootstrap analysis values that are  $\geq 70\%$  are shown in the nodes and represent the reliability of the branching. Reference strain GenBank codes are shown in the brackets. The number of identical strains within the genotype is indicated in italics. The scale indicates the number of nucleotide substitutions in the position.



7. att. Gamma-proteobaktēriju pilna 16S rRNS gēna filoģenētiskais koks / Fig. 7. Gamma-proteobacteria full-length 16S rRNA gene phylogenetic tree

Filoģenētiskais koks veidots, izmantojot *Neighbor Joining* filoģenētiskās dendrogrammas konstrukcijas metodi. Bootstrapa 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 izolātu skaits. Mēroga skala norāda nukleotīdu substitūciju skaitā pozīcijā / The phylogenetic tree is composed using *Neighbor Joining* phylogenetic dendrogram method. Bootstrap analysis values that are  $\geq 70\%$  are shown in the nodes and represent the reliability of the branching. Reference strain GenBank codes are shown in the brackets. The number of identical strains within the genotype is indicated in italics. The scale indicates the number of nucleotide substitutions in the position.

g.; lauka pupas). **Klasteris V** ietver *Pantoea agglomerans* atsauces celmu un genotipus PnSP01 (2018. g.; amoliņš) un PnA01 (2019. g.; soja). **Klasteris VI** ietver divus *Enterobacter* sp. genotipus – ESP01 un ESP02 (2019. g.; soja). **Klasteris VII** – *E. ludwigii* atsauces celmu un genotipu ESP04 (2019. g.; soja).

Vēl nesen tikai  $\alpha$ -proteobaktērijas klasei piederošas gumiņbaktērijas tika uzskatītas par simbiotiskajām baktērijām, kas veido gumiņus uz tauriņziežu saknēm un saista slāpekli. Arī šajā pētījumā 65% no visiem identificētajiem baktēriju celmiem pieder  $\alpha$ -proteobaktēriju klasei. Tomēr kopējā baktēriju daudzveidība ir lielāka, nekā sākotnēji gaidīts – identificētie baktēriju celmi pieder pie  $\alpha$ -,  $\beta$ -, un  $\gamma$ -*proteobacteria*, kā arī *Bacilli* klasēm (4. tab.). Aizvien vairāk pētījumos, kuros nosaka gumiņbaktēriju daudzveidību, novēro līdzīgu taksonomisko daudzveidību, kāda identificēta šajā pētījumā, norādot uz to, ka baktēriju un tauriņziežu simbiotiskās attiecības ir plašāks fenomens, kā uzskatīts iepriekš (Moulin et al., 2001). Gumiņbaktēriju grupas papildināšana ar  $\beta$ -proteobaktēriju klasses celmiem ir salīdzinoši jauns atklājums (kopš 2000. gadu sākuma), salīdzinājumā ar vairāk nekā simts gadus ilgiem gumiņbaktēriju pētījumiem.

Pārveidot atmosfēras slāpekli amonjakā, kā arī veidot simbiotiskas attiecības ar tauriņziežiem spēj ne tikai gumiņbaktērijas, bet arī citas endofītiskās baktērijas. Piemēram, *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). Daudzas no baktērijām, kuras identificētas arī šajā pētījumā (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Rahnella Paenibacillus*, *Pantoea*, *Enterobacter* un *Pseudomonas* spp.), pētījumos uzrādījušas augu augšanu un attīstību uzlabojošas īpašības, šķēdinot augsnē esošā fosfora rezerves (Timofeeva, Sedykh, 2022; Zineb et al., 2019). Pateicoties baktēriju daudzveidībai ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -*proteobacteria*, *Bacilli*), gumiņus var uzskatīt par unikālu ekoloģisko nišu, kas dod “mājvietu” plašam spektram saderīgu mikroorganismu, norādot uz to, ka tauriņziežu inokulācijā būtu jāizmanto ne tikai  $\alpha$ -proteobaktērijas, bet būtu jāiekļauj arī baktēriju celmi no dažādām, bet savstarpēji saderīgām baktēriju klasēm.

### Izmaiņas gumiņbaktēriju daudzveidībā laika gaitā

Tika pārbaudīts, vai starp šajā pētījumā iekļautajiem celmiem, kas izdalīti laika posmā no 1962.–2019. g., var novērot daudzveidības atšķirības. Rezultāti  $\alpha$ -proteobaktēriju klasses gadījumā neuzrāda pārliecinošus pierādījumus šādām daudzveidības atšķirībām. Novērots, ka lielākā daļa  $\alpha$ -proteobaktēriju filoģēnētiskā koka klasteri satur gan vēsturiskās kolekcijas celmus, gan jaunizdalītos celmus. Piemēram,  $\alpha$ -proteobaktēriju klasteris II ietver visvairāk vēsturiskās kolekcijas celmus, tomēr šis klasteris ietver arī jaunizdalītos celmus.

Tomēr ir atsevišķi  $\alpha$ -proteobaktēriju genotipi, kas atbilst tikai vēsturiskās kolekcijas celmiem, piemēram – RhSP09 un ASP01.

Visi septiņi *Paenibacillus* sp. izolāti ir vēsturiskās gumiņbaktēriju kolekcijas celmi. Savukārt neviens no vēsturiskās kolekcijas celmiem netika identificēts kā  $\beta$ - vai  $\gamma$ -proteobaktēriju klasei piederošs. Šo proteobaktēriju klasu celmu neesamība vēsturiskajā kolekcijā varētu būt saistīta ar baktēriju fenotipiskajām īpašībām. Arī baktēriju kultivēšanā izmantotajām barotnēm varētu būtu selektīva ietekme. Vēsturiskās kolekcijas baktērijas sākotnēji tika izdalītas un uzglabātas, izmantojot balto pupiņu un pelēko zirņu barotnes, nevis YMA barotnes. Šie varētu būt iespējamie iemesli tam, ka baktēriju celmi, kas izdalīti Latvijā laika posmā no 2016.–2019. g., uzrāda lielāku daudzveidību visās trīs –  $\alpha$ -,  $\beta$ - un  $\gamma$ -proteobaktēriju klasēs.

### Saimniekaugu un identificēto baktēriju specifiskums

Lai noteiktu saimniekaugu un identificēto baktēriju specifiskumu, izvērtēta no konkrētā saimniekauga gumiņiem izdalīto baktēriju daudzveidība (5. tab.). No lauka pupām (*Vicia faba*) izdalīto baktēriju celmu skaits, kas identificēts ar molekulārās ģenētikas metodēm: 35, no kuriem 20 celmus identificēja kā *Rhizobium* sp. (no tiem 10 genotipa RhL01 *R. leguminosarum* celmi, izdalīti 2016.–2019. g.). Viens no celmiem, kas identificēts kā *R. leguminosarum*, ar tik pat lielu ticamību identificēts kā *Bradyrhizobium* sp. 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. Baktēriju celmi, kas nepieder pie  $\alpha$ -proteobaktēriju klases, ir baktēriju celmi, kas izdalīti no 2016.–2019. g. Izņēmums ir *Paenibacillus polymyxa* RV06902 celms, izdalīts 1970. g.

No **sojas** (*Glycine max*) izdalīto un identificēto baktēriju celmu skaits: 26 (5. tab.), no kuriem 9 pieder  $\alpha$ -proteobaktēriju klasei (*Rhizobium* sp., *R. gallicum*, *Mesorhizobium* sp., *Bradyrhizobium japonicum*) un septiņi pieder  $\beta$ -proteobaktēriju klasei (*Burkholderia* sp., *Paraburkholderia terricola*). Atlikušie 10 celmi pieder  $\gamma$ -proteobaktēriju klasei (*Pseudomonas* sp., *Pantoea agglomerans* un *Enterobacter* sp.). No **zirņiem** (*Pisum sativum*) izdalīto un identificēto baktēriju celmu skaits – 18, no kuriem 15 ir *Rhizobium* sp., divi *Rahnella aquatilis* un viens *Paenibacillus peoriae*. No **āboļiņa** (*Trifolium* sp.) izdalīto un identificēto baktēriju celmu skaits – 17, no kuriem 13 identificēti kā *Rhizobium* ģintij piederoši. Salīdzinoši daudzi no šiem celmiem uzrāda identiskas 16S rRNA gēna sekvences. Trīs celmi identificēti kā *Pseudomonas* sp. (visi ģenētiski atšķirīgi), viens – *Serratia plymuthica*. No **lucernas** (*Medicago* sp.) izdalīto un identificēto baktēriju celmu skaits – 12, no kuriem 7 *Rhizobium* sp. Atlikušie celmi identificēti kā – *Azospirillum* sp., *Paraburkholderia* sp.,

5. tabula / Table 5

**Baktēriju daudzveidība biežāk sastopamo saimniekaaugu gumiņos /***Bacterial diversity isolated in commonly grown host-plants*

Identificētās baktēriju ģints / Genus of identified bacteria	Identificēto baktēriju celmu skaits / Number of identified bacteria strains				
	Vicia faba	Glycine max	Pisum sativum	Trifolium spp.	Medicago 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 konkrētās baktēriju ģints sastopamības biežumu / The color brightness indicates the frequency of the specific bacteria genus.

*Pseudomonas* sp., *Rahnella* sp., *Paenibacillus* sp. – pa vienam celmam no katras ģints. No **vanagu vīķa** (*Vicia cracca*) izdalīto un identificēto baktēriju celmu skaits – 5, no kuriem 4 *R. leguminosarum* un viens *Pseudomonas* sp. No **sējas vīķa** (*Vicia sativa*) un **plavas dedestīņas** (*Lathyrus pratensis*) izdalīto un identificēto baktēriju celmu skaits – 4 (2 no katra) – visi *R. leguminosarum*. No **galegas** (*Galega* sp.) izdalīto un identificēto baktēriju celmu skaits – 5, no kuriem 2 *Rhizobium* sp. un trīs –*Neorhizobium galegae*. No **lupīnām** (*Lupinus* sp.) izdalīto un identificēto baktēriju celmu skaits – 9, no kuriem pieci *Rhizobium* sp., viens *R. gallicum* un viens *Serratia plymuthica*. No **vanagnadziņiem** (*Lotus* sp.) izdalīto un identificēto baktēriju celmu skaits – 4, no kuriem 3 *Rhizobium* sp. un viens *Ensifer adhaerens/Sinorhizobium* sp. Tikai viens celms, kas izdalīts no **pērkonamoliņa** (*Anthyllis* sp.) identificēts ar molekulārās ģenētikas metodēm – *Rhizobium* sp. No **pupiņām** (*Phaseolus vulgaris*) identificēto baktēriju celmu skaits – 5, no kuriem viens *Rhizobium* sp., divi *R. leguminosarum* un divi *Paenibacillus polymyxa*. No **vignas** (*Vigna* sp.) izdalīto un identificēto baktēriju celmu skaits – 2, no kuriem viens *R. leguminosarum*, otrs – *Paenibacillus polymyxa*. Vēsturiskajā Gumiņbaktēriju kolekcijā iepriekš nebija no **amoliņa** (*Melilotus* sp.) izdalītu baktēriju celmu. Pētījumā identificēti četri celmi –

*Rhizobium* sp., *Pantoea* sp., *Rahnella* sp. un *Pseudomonas* sp. – pa vienam celmam no katras ģints. No **blaktenes** (*Ononis arvensis*) izdalītais baktēriju celms identificēts kā *R. leguminosarum*, un pieder pie visplašākās filoģētiskās grupas – RhL01.

Baktēriju celmu un saimniekaugu specifiskums atšķiras starp  **$\alpha$ -proteobaktēriju** klasteriem (4. tab.; 5. att.): II un IX klasteri, kas identificēti kā *Rhizobium* sp. un *R. leguminosarum*, izdalīti no visplašākā saimniekaugu klāsta, kas liecina par šo genotipu zemo saimniekaugu specifiskumu. Visaugstāko saimniekaugu specifiskumu uzrāda celmi no sekojošajiem  $\alpha$ -proteobaktēriju filoģētiskā koka klasteriem: IV klasteris (*Sinorhizobium* sp.; saimniekaugs *Lotus* sp.); VI klasteris (*Mesorhizobium* sp.; *Glycine max*); VIII klasteris (*Neorhizobium galegae*; *Galega* sp.). Turpretim  **$\beta$ -proteobaktēriju** klasei piederošie celmi uzrādīja salīdzinoši lielāku saimniekaugu specifiskumu (4. tab.; 6. att.). Septiņi no 14 celmiem izdalīti no *Glycine max*, seši no *Vicia faba* un viens no *Medicago sativa*. Turklat soja bija vienīgais saimniekaugs baktēriju celmiem, kas pieder  $\beta$ -proteobaktēriju filoģētiskā koka klasteriem I un II, savukārt lauka pupas bija vienīgais saimniekaugs III klastera celmiem. Klasteri VI un V uzrādīja mazāku saimniekaugu specifiskumu. **Gamma-proteobaktēriju** filoģētiskās analīzes neuzrādīja lielu saimniekaugu specifiskumu (4. tab.; 7. att.). Jāņem vērā, ka šajā proteobaktēriju klāsē novērota lielāka genotipiskā fragmentācija – lielākā daļa šīs genotipu ieklāva tikai vienu baktēriju celmu. Tomēr visi baktēriju celmi, kas identificēti kā *Enterobacter* sp., izdalīti no *Glycine max* sakņu gumijiem. Citi  $\gamma$ -proteobaktēriju celmi neuzrādīja tik lielu saimniekaugu specifiskumu.

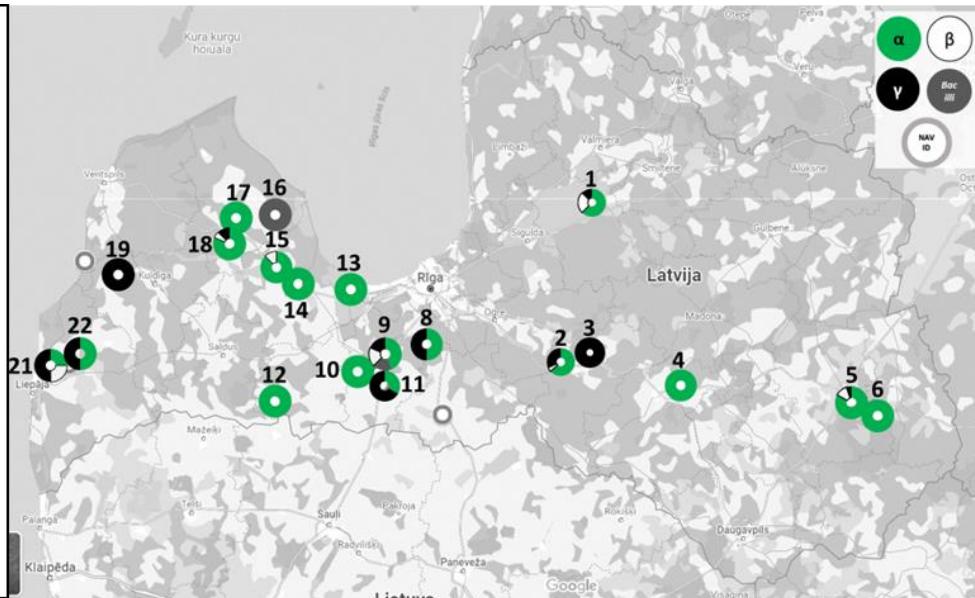
## Identificēto gumiņbaktēriju izplatība Latvijas augsnēs

### No tauriņziežiem izdalīto baktēriju daudzveidība Latvijas novados

Kolekcija papildināta ar jauniem gumiņbaktēriju celmiem vadoties pēc dažādu apsvērumu kopuma – gumiņbaktērijas izdalītas no esošiem izmēģinājumiem galvenokārt no lauka pupām, zirņiem un sojas. Savukārt pārējās tauriņziežu sugas izvēlētas, lai paplašinātu kolekciju esošo gumiņbaktēriju celmu daudzveidību, izdalot tos gan no lauka, veģetācijas trauku izmēģinājumiem, kā arī citām ražošanas platībām. Pieejamie tauriņziežu izmēģinājuma lauki atradās Zemgalē, Kurzemē un Latgalē, tāpēc baktēriju celmi lielākoties izdalīti no šiem Latvijas reģioniem (8. att.).

Vēsturiskās kolekcijas celmi, kas iegūti no 1962.–1973. g., izdalīti Jelgavas, Dobeles un Talsu novados (8. att.). Celmi, kas izdalīti no 2006.–2015. g., lielākoties izdalīti Stendes lauka izmēģinājumos, atsevišķi celmi – Jelgavā, Augsnes un augu zinātnu institūta izmēģinājumu ietvaros, kā arī lauka izmēģinājumā Skrīveros. Kolekcijā atrodas arī gumiņbaktēriju celmi, kas izdalīti

1. Priekuļi; 2. Skrīveri; 3. Kokneses nov.; 4. Kūkas pag.; 5. Griškānu pag.; 6. Stoļerovas pag.; 7. Bauska; 8. Olaines nov.; 9. Jelgava; 10. Dimzas; 11. Pēterlauki; 12. Vecauce; 13. Jūrmala; 14. Tumes pag.; 15. Pūre; 16. Plavas; 17. Talsi; 18. Stende; 19. Ēdoles pag.; 20. Jūrkalnes pag.; 21. Medzes pag.; 22. Tadaiku pag. / 1. Priekuļi; 2. Skrīveri; 3. Kokneses Municipality; 4. Kukas Parish; 5. Griskani Parish; 6. Stolerova Parish; 7. Bauska; 8. Olaine Municipality; 9. Jelgava; 10. Dimzas; 11. Peterlauki; 12. Vecauce; 13. Jūrmala; 14. Tume Parish; 15. Pure; 16. Plavas; 17. Talsi; 18. Stende; 19. Edoles Parish; 20. Jurkalnes Parish; 21. Medze Parish; 22. Tadaiki Parish.



8. att. No tauriņziežu gumiņiem izdalīto baktēriju daudzveidība Latvijas teritorijā / Fig. 8. Diversity of rhizobia isolated from legume nodules in Latvia

Aplā diagrammā proporcionāli norādīta identificēto proteobaktēriju klase konkrētajā paraugu ievākšanas vietā (zaļa –  $\alpha$ -, balta –  $\beta$ -, melna –  $\gamma$ -proteobaktērijas; pelēka – *Bacilli* sp.; gaiši pelēka krāsa – nav paraugu, kas identificēti ar molekulārās ģenētikas metodēm) / The percentage of the circle chart indicates the bacteria class in each sampling site (green –  $\alpha$ -, white –  $\beta$ -, black –  $\gamma$ -proteobacteria; gray – *Bacilli* sp.; light gray – no samples identified with molecular genetics methods).

ārpus Latvijas – 1982. un 2008. g. izdalīti celmi no galegas saknēm Igaunijā, kā arī vēsturiskās gumiņbaktēriju kolekcijas celms “422a” (RM24502, RM24503, RM24505), iegūts 1972. gadā no “Leņingradas kolekcijas”. Celmi RVLTSKR un RVLTSR izdalīti Lietuvā 2019. g. sadarbības pētījuma ietvaros.

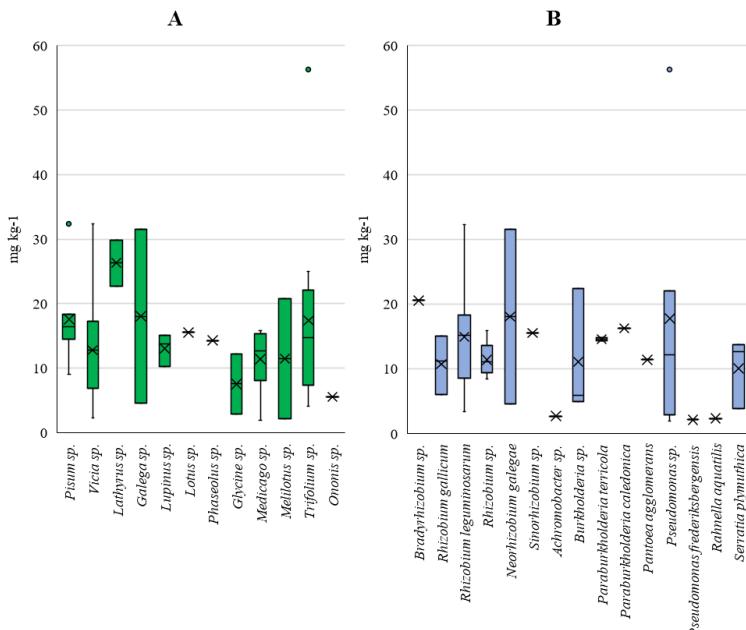
Vērtējot identificēto gumiņbaktēriju kolekcijas celmu izplatību pēc to piedeļbas pie konkrētās proteobaktēriju klases, var novērot, ka  $\alpha$ -proteobaktērijas ir iegūtas gandrīz visās paraugu ievākšanas vietās (17 no 20), savukārt  $\beta$ -proteobaktērijas identificētas 7 no 20 paraugu vietām. Šajās atradnes vietās  $\beta$ -proteobaktērijas bijušas proporcionāli mazāk nekā pārējo baktēriju klašu pārstāvji. Savukārt  $\gamma$ -proteobaktērijas identificētas 11 no 20 vietām. Jāņem vērā, ka, ievāktu paraugu skaits izdalīšanas vietās ir atšķirīgs, tāpēc rezultāti jāvērtē kontekstā ar saimniekaugiem, no kuriem šīs baktērijas ir izdalītas.

### Augsnes abiotiskie apstākļi gumiņbaktēriju izdalīšanas vietās

Apkārtējās vides apstākļi ietekmē ne tikai tauriņziežu augšanu un attīstību, bet arī gumiņbaktērijas – ietekmējot gumiņu veidošanos un slāpekļa saistīšanas efektivitāti (O’Hara, 2001). Šajā pētījumā analizēja augsnes paraugus, kas ievākti kopā ar tauriņziežu saknēm (2016.–2019. g.). Novērtēja augsnes paraugos esošo kāliju, kalciju, nitrātu, fosfātu, nātrija saturu, pH, kā arī augsnes elektrovadītspēju. Datus sagrupēja pēc 1) saimniekaugiem, kas atradās augsnes paraugā un 2) identificētajām baktēriju sugām/gintīm, kuras izdalītas no šiem saimniekaugiem, analizējot un salīdzinot datu izkliedi katrā no šīm grupām. Vismazākā datu izkliede **kālija** saturam novērojama *Lupinus* sp. un *Glycine max* (līdz 40 mg kg<sup>-1</sup>) paraugiem. Vislielāko K izkliedi uzrāda *Trifolium* sp. paraugi (10–180 mg kg<sup>-1</sup>). Vērtējot rezultātus pēc identificētajām baktērijām, vismazāko datu izkliedi uzrāda *Burkholderia* sp. paraugi (7–23 mg kg<sup>-1</sup>), lielāko – *Pseudomonas* sp. paraugi (6–126 mg kg<sup>-1</sup>). Kopumā rezultāti uzrāda nepietiekošu (loti zems  $\leq 50$  vai zems 50–100 mg kg<sup>-1</sup>) K saturu augsnē. **Kalcija** saturs augsnes paraugos, analizējot pēc saimniekaugiem, variēja no 61–2700 mg kg<sup>-1</sup>. Vismazākā rezultātu izkliede novērojama *Lathyrus* sp. (2033 un 2200 mg kg<sup>-1</sup>). Vērtējot rezultātus pēc identificētajiem baktēriju celiem, viszemākais Ca saturs (līdz 1000 mg kg<sup>-1</sup>) bija *Burkholderia* sp., *Serratia plymuthica* un *Rhizobium gallicum*. Visaugstāko Ca rezultātu uzrādīja augsnes paraugs variantā, kur *Pseudomonas* sp. celms izdalīts no *Trifolium* sp. Pietiekošu Ca saturu augsnē (>1000 mg kg<sup>-1</sup>) uzrādīja 44.5% paraugu.

**Nitrātu** (NO<sub>3</sub>) daudzums augsnē norāda uz augiem pieejamo slāpekli. Augsnes paraugu nitrātu daudzums variēja no 1.8–56 mg kg<sup>-1</sup> (9. att.). 30% paraugu uzrādīja nepietiekošu (<10 mg kg<sup>-1</sup>) nitrātu saturu. Daļa no šiem paraugiem ievākti teritorijās, kuras netiek izmantotas lauksaimniecības vajadzībām. Vairāk nekā puse no celiem, izdalīti no šajās augsnēs augošajiem tauriņziežiem, identificēti kā  $\alpha$ -proteobaktēriju klasei piederoši (*Rhizobium gallicum*, *R. leguminosarum*, *Neorhizobium galegae*). 49% augsnes paraugu

saturēja apmierinošu ( $10\text{--}20 \text{ mg kg}^{-1}$ ) un 20% paraugu – pietiekošu ( $20\text{--}40 \text{ mg kg}^{-1}$ ) nitrātu daudzumu. Vērtējot rezultātus pēc saimniekaugiem un identificētajiem baktēriju celmiem, visos variantos var novērot datu izkliedi. Vislielākā izkliede novērojama *Galega* sp. un no tiem izdalīto *Neorhizobium galegae* celmu variantos ( $4.5\text{--}31.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Lielākā daļa *Glycine max* baktēriju celmi tika izdalīti no augsnēm ar nepietiekošu nitrātu daudzumu.

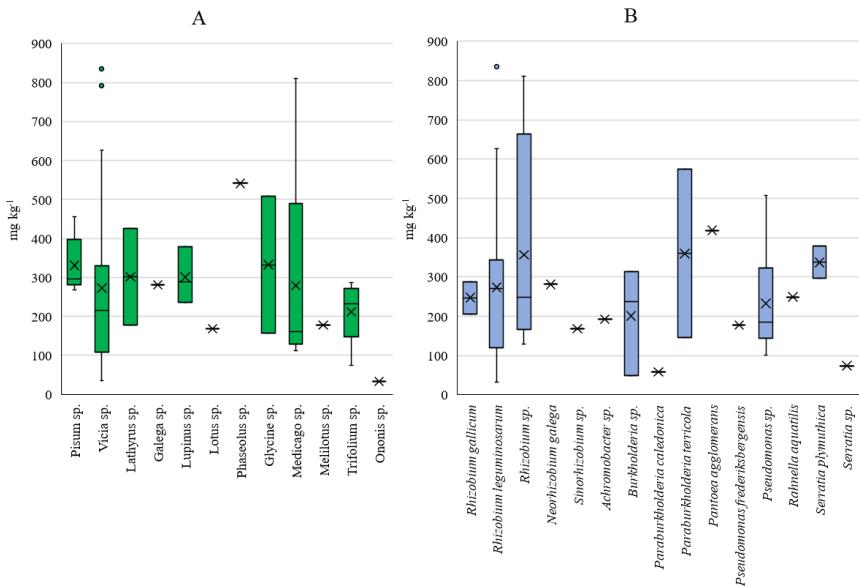


9. att. Nitrātu saturs augsnes paraugos ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) / Fig. 9. Nitrate content in soil samples ( $\text{mg kg}^{-1}$ )

Iekrāsotais rezultātu stabīņš uzrāda nitrātu ( $\text{NO}_3^-$ ) satura rezultātu datu izkliedi konkrētā saimniekauga (A) un baktēriju ģints/sugas (B) ietvaros. Līnija (-) norāda uz datu mediānas vērtību; krustiņš (x) norāda datu vidējo vērtību; stabīnu nogriežņi apzīmē maksimālos un minimālos konkrētā stabīņa datus; izteikti neiederīgie dati tiek atzīmēti ar atbilstošās krāsas aplīti / The colored result bars show nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) data distribution within the particular host-plant (A) and identified bacteria genus/species (B) groups. Line (-) indicates data median value; cross (x) indicates date mean value; bar whiskers indicate the max and min values; data outliers are marked with a colored circle.

Vidējais kopējais **fosfora** savienojumu daudzumus augsnē literatūras avotos norādīts  $200\text{--}1500 \text{ mg kg}^{-1}$  – lielākā daļa augiem neuzņemamā formā. Fosfora (P) savienojumus šķīdinošie mikroorganismi palielina augsnes nešķīstošā P biopieejamību augiem (Alori, Glick, Babalola, 2017). Šajā pētījumā

fosfātu ( $P_2O_5$ ) daudzums augsnes paraugos variēja no 33 mg–835 mg  $kg^{-1}$  (10. att.). Vismazāko izkliedi, skatoties pēc identificētajām baktērijām, var novērot *Rhizobium gallicum* un *Serratia plymuthica* variantos. Vislielākā datu izkliede novērojama *Rhizobium* sp. grupā. Atsevišķas augsnes baktērijas spēj šķīdināt augsnē esošos P savienojumus, padarot tos augam pieejamus. Tāpēc iespējams, ka paraugos, kur baktērijas veikušas veiksmīgu P savienojumu šķīdināšanu, tas bijis pieejams augiem, un tāpēc var novērot mazāku P daudzumu, kā paraugos, kur baktērijas nav spējīgas šķīdināt P savienojumus.



10. att. Fosfora saturs augsnes paraugos ( $mg\ kg^{-1}$ ) / Fig. 10. Phosphorus content in soil samples ( $mg\ kg^{-1}$ )

Iekrāsotais rezultātu stabīņš uzrāda fosfora ( $P_2O_5$ ) satura rezultātu datu izkliedi konkrētā saimniekauga (A) un baktēriju ģints/sugas (B) ietvaros. Līnija (-) norāda uz datu mediānas vērtību; krustiņš (x) norāda datu vidējo vērtību; stabīņu nogriežņi apzīmē maksimālos un minimālos konkrētā stabīņa datus; izteikti neiederīgie dati tiek atzīmēti ar atbilstošās krāsas aplīti / The colored result bars show phosphorus ( $P_2O_5$ ) data distribution within the particular host-plant (A) and identified bacteria genus/species (B) groups. Line (-) indicates data median value; cross (x) indicates date mean value; bar whiskers indicate the max and min values; data outliers are marked with a colored circle.

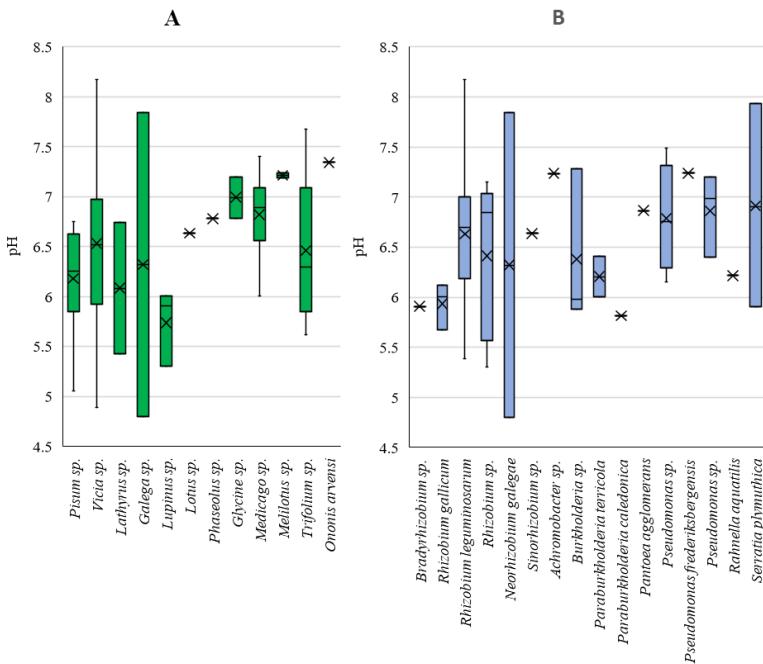
Analizējot rezultātus pēc paraugu ievākšanas vietām, var pārliecināties par atsevišķu celmu P savienojumu šķīdināšanas potenciālu. Paraugi, kurus izdalīja lauka izmēģinājumā Grobiņas nov., 2019. g. no lauku pupām, uzrāda

atšķirības fosfātu saturā starp paraugiem. Paraugi RV19/P5, RV19/P4 un RV19/P6 (*Burkholderia* sp., *Paraburkholderia caledonica* un *Rhizobium leguminosarum*) uzrāda salīdzinoši zemu augsnes fosfātu saturu (34.50–49.83 mg kg<sup>-1</sup>). Savukārt atlikušie identificētie paraugi šajā izmēģinājumā – RV19/K5, RV19/K12, RV19.3/5 un RV19/K10 (*Burkholderia* sp., *Achromobacter* sp., *Rahnella aquatilis* un *Pantoea agglomerans*), izdalīti no augsnes paraugiem, kas satur salīdzinoši lielāku fosfātu daudzumu (192.50–419.00 mg kg<sup>-1</sup>).

Novērots, ka tieši **augsnes pH** ir nozīmīgākais rādītājs augsnes mikroorganismu daudzveidības noteikšanai. Visaugstākā mikroorganismu daudzveidība novērota augsnēs ar neitrālu pH, savukārt vismazākā – augsnēs ar zemu (<4.5) vai augstu (>8.0) pH (Lauber et al., 2009; Rousk et al., 2010). Optimālais pH, kas nepieciešams ne tikai tauriņziežu augšanai, bet arī tauriņziežu-gumiņbaktēriju efektīvas simbiozes izveidošanai – 6.0–7.0 (Somasegaran, Hoben, 1994). Šo apstiprina pH rezultāti (11. att.), jo lielāko daļu celmu izdalīja no augsnēm ar pH 6.0–7.5, turklāt nevienam no paraugiem pH nebija <4.5 vai >8.0. Vislielākā pH izkliede novērojama *Galega* sp., kur paraugi ievākti no augsnēs ar pH 4.8 un 7.8, un *Vicia* sp. (pH 4.8–8.2). Liela daļa baktēriju, kuras izdalīja no saimniekaugu saknēm no augsnēm pH <6, netika veiksmīgi kultivētas, norādot uz pH kā limitējošu faktoru optimālai gumiņbaktēriju augšanai. Atsevišķus baktēriju celmus (*Rhizobium* sp., *R. leguminosarum* un *Neorhizobium galegae*) izdalīja no augsnēm ar zemu pH. Tā piemēram, baktēriju celms RG00401 (*N. galegae*) būtu izmantojams izmēģinājumos ar *Galega* sp. augsnēs ar zemu pH.

**Augsnes elektrovadītspēja** norāda uz kopējo šķīstošo sālu daudzumu augsnē. Visi augsnes paraugi uzrāda augiem un gumiņbaktērijām atbilstošu elektrovadītspēju (150–3000 µS cm<sup>-1</sup>), izņemot paraugu, kas izdalīts no *Vicia faba* un identificēts kā *R. leguminosarum* (RVLT60). Šo celmu varētu izmantot izmēģinājumos augsnēs ar paaugstinātu kopējo šķīstošo sālu daudzumu. Pētījumos novērots, ka izturība pret sāls stresu var atšķirties celmiem vienas ģints ietvaros (Amarger, Macheret, Laguerre, 1997). To uzrāda arī iegūto rezultātu izkliede ģints vai sugars ietvaros. Vislielākā datu izkliede novērojama augsnes paraugiem, no kuriem izdalīti *Pseudomonas* ģints celmi.

Kopumā augsnes analīžu rezultāti nenorāda uz kādu būtisku augsnes apkārtējās vides faktora ietekmi, kas ierobežotu rizosfēras baktēriju daudzveidību. Lielākoties novērojama liela datu izkliede vienas baktēriju ģints vai pat sugars ietvaros. Augsnes pH ir vienīgais rādītājs ar salīdzinoši mazāko datu izkliedi. Arī literatūrā minēts, ka tieši augsnes pH ir noteicošais faktors augsnes mikroorganismu daudzveidībā (Andrés et al., 2012; Lauber et al., 2009; Rousk et al., 2010). Paraugu agrokīmisko rādītāju analīžu rezultāti norāda uz vairāku baktēriju celmu potenciālu augsnes P savienojumu šķīdināšanā, tomēr par šo baktēriju celmu īpašību nepieciešams pārliecināties turpmākos pētījumos.



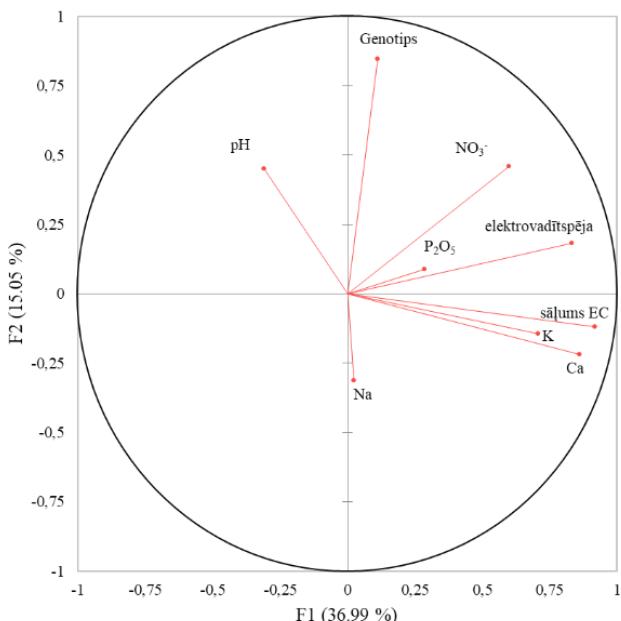
11. att. Augsnes paraugu pH līmenis / Fig. 11. Soil sample pH level

Iekrāsotais rezultātu stabīšus uzrāda datu izkliei konkrētā saimniekauga (A) un baktēriju ģints/sugas (B) ietvaros. Līnija (-) norāda uz datu mediānas vērtību; krustiņš (x) norāda datu vidējo vērtību; stabīju nogriežņi apzīmē maksimālos un minimālos konkrētā stabīja datus / The colored result bars show data distribution within the particular host plant (A) and identified bacteria genus/species (B) groups. Line (-) indicates data median value; cross (x) indicates date mean value; bar whiskers indicate the max and min values.

### Augsnes agrokīmisko rādītāju korelatīvās sakārības

Augsnes agrokīmisko rādītāju savstarpējo sakārību noteikšanai veica Pīrsona korelācijas analīzi. Ciešu korelāciju novēroja starp augsnes elektrovadītspēju un sālumu, kā arī starp kalcija saturu un augsnes sālumu. Gumiņbaktēriju genotipam nenovēroja korelāciju ar augsnes agrokīmiskajiem rādītājiem. Rādītāju ietekmi savā starpā noteica, veicot galveno komponentu analīzi un rādītāju savstarpējās ietekmes sakārību slodzes analīzi (12. att.). Vislielākā ietekme uz galvenajiem komponentiem novērota genotipam, nitrātu saturam, augsnes elektrovadītspējai, augsnes sālumam un augsnes kalcija sastāvam. Visciešāko saistību starp rādītajam uzrāda augsnes fosfātu saturs un augsnes elektrovadītspēja; augsnes sālums un kālija saturs augsnē; kālija un kalcija saturs augsnē. Augsnes agrokīmisko rādītāju slodzes analīzes rezultāti

neuzrāda citu rādītāju būtisku ietekmi uz gumiņbaktēriju genotipu. Tomēr var novērot pH un nitrātu ietekmi uz celmu genotipu, salīdzinājumā ar pārējiem pētāmajiem rādītājiem.



**12. att. Augsnes agrokīmisko analīžu rādītāju slodze uz galvenajiem komponentiem, un rādītāju savstarpējās sakarības / Fig. 12. Factor loading of soil agrochemical parameters on principal components, and the effect between the indicators**

Sarkanās līnijas norāda rādītāju ietekmes slodzi uz citu attiecīgā komponenta rādītāju izkliedi. Jo tuvāk sarkanā līnija atrodas riņķa līnijai, jo lielāka attiecīgā rādītāja ietekme uz citu komponentu rādītāju izkliedi. Leņķis starp līnijām norāda uz sakarības ciešumu starp rādītājiem – jo mazāks leņķis, jo ciešāka šī saistība / Red lines indicate parameter factor loading on other principal component dispersion. The closer the red line is to the circle line, the greater the effect of the corresponding indicator on the dispersion of other components. The angle between the lines indicates the closeness of the relationship between the indicators – the smaller the angle, the closer the relationship

# **Gumiņbaktēriju un endofītisko baktēriju daudzveidība, efektivitāte un potenciālais pielietojums tauriņziežu inokulācijā**

## **Iepriekšējo gumiņbaktēriju pētījumu rezultāti ģenētisko analīžu kontekstā**

Izmantojot iegūtos rezultātus, var veikt iepriekšējo pētījumu rezultātu interpretāciju, kur tauriņziežu sēklu inokulācijai izmantotas LBTU kolekcijas gumiņbaktēriju celmu tūrkultūras. Salīdzinoši daudz gumiņbaktēriju efektivitātes pētījumos inokulētas lauka pupas un soja ar gumiņbaktēriju celmiem: RP023, RV407, RV408, RV501 un RV505. Promocijas darbā šie celmi identificēti kā attiecīgie genotipi: RhL02, RhSP06, RhSP07, RhSP05 un RhSP07. Rezultāti parāda, ka celmi RV408 un RV505 ir identiski. Tuvradniecisks šiem celmiem ir arī RV501, kā arī RV408. Savukārt RP023 genotips RhL02 ir ģenētiski visattālākais (5. att.). Pētījumos RP023 un RV407 celmi, kuriem ir būtiski atšķirīgas pilna 16S rRNS gēna sekvences, visbiežāk uzrādījuši efektivitātes atšķirības (Dubova, Šenberga, Alsiņa, 2015; Dubova et al., 2015; Dubova, 2020; Šenberga et al., 2017). Atsevišķos pētījumos (piem., Dubova et al., 2016) nav novērotas atšķirības efektivitātē starp RV407 un RV505, kas pēc filogenētiskajām analīzēm ir identificēti kā tuvradnieciski.

## **Tauriņziežu sēklu inokulācijas preparāta izveide**

Optimālā tauriņziežu sēklu inokulācijas preparāta sastāvā būtu jābūt 1)  $\alpha$ -proteobaktēriju gumiņbaktēriju celmam, atbilstoši saimniekaugam; 2)  $\beta$ -proteobaktēriju gumiņbaktēriju celmam; 3) endofītisko baktēriju celmam (6. tab.). Alfa-proteobaktēriju gumiņbaktēriju celms sēklu inokulācijas preparāta sastāvā iekļauts galvenokārt, lai tas izveidotu uz tauriņzieža saknēm gumiņus, kuros varētu iekļauties arī citas baktērijas, kas netiek klasificētas kā gumiņbaktērijas. Arī primāro slāpekļa saistīšanas funkciju veic  $\alpha$ -proteobaktēriju celmi. Spēju izveidot gumiņus uz tauriņziežu saknēm, kā arī spēju uzlabot slāpekļa saistīšanas kapacitāti, inokulējot augus kopā ar  $\alpha$ -proteobaktēriju celmiem uzrādījušas arī  $\beta$ -proteobaktērijas (Shiraishi, Matsushita, Hougetsu, 2010). Atsevišķi  $\beta$ -proteobaktēriju celmi uzrādījuši arī spēju šķīdināt rizosfērā esošos P savienojumus. Preparāta papildināšana ar endofītisko baktēriju celmiem no  $\gamma$ -proteobaktēriju klases, nodrošinātu augsnē esošo P savienojumu šķīdināšanu, uzlabotu gumiņu veidošanās procesu, kā rezultātā uzlabojot saimniekauga augšanu un attīstību (Naveed et al., 2015; Shiraishi, Matsushita, Hougetsu, 2010). Veidojot tauriņziežu inokulācijas preparātu, izmantojot dažādus gumiņbaktēriju un citus endofītiskos baktēriju celmus, tiek palielināta veiksmīgas un efektīvas simbiozes iespējamība.

6. tabula / Table 6

**Baktēriju celmi tauriņziežu sēklu inokulācijas preparātu izveidošanai /**  
**Recommended bacteria strains for creating legume seed inoculum**

Saimniekaugs / Host plant	$\alpha$ -proteobaktēriju genotips (I) / $\alpha$ -proteobacteria genotype (I)	$\alpha$ -proteobaktēriju genotips (II) / $\alpha$ -proteobacteria genotype (I)	$\beta$ -proteobaktēriju genotips / $\beta$ -proteobacteria genotype	$\gamma$ -proteobaktēriju genotips / $\gamma$ -proteobacteria genotype
<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–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

Plānojot tauriņziežu sēklu inokulācijas preparāta papildināšanu ar fosfora savienojumu šķīdinošajām baktērijām, jāņem vērā, ka fosfora šķīdināšanas efektivitāte, tajā skaitā spēja šķīdināt dažādus fosfora avotus, var atšķirties starp baktēriju celmiem. Šo atšķirību pamatā ir baktēriju ģīnšu rizosferā izdalītie specifiskie organiskie savienojumi, piemēram, laktāti, oksalāti, citrāti un glikonāti, kas veic fosfora savienojumu šķīdināšanu (Ibrahim et al., 2022; Timofeeva, Sedykh, 2022). Tauriņziežu preparāts, kas apvienotu ne tikai gumīnbaktērijas, kas izveido gumīnus un veic atmosfēras slāpekļa saistīšanu, bet arī baktēriju celmus, kas veic rizosferā esošā, bet augiem nepieejamā fosfora rezervju šķīdināšanu, būtu vērtīgs ieguldījums ilgtspējīgā lauksaimniecībā.

Pateicoties šādam preparātam, varētu ierobežot ne tikai pārlieku lielo minerālā slāpekļa mēslojuma izmantošanu, bet arī samazināt nepieciešamību pēc kīmiskā fosfora mēslojuma pielietošanas. Rezultātā atstājot pozitīvu ietekmi uz apkārtējo vidi. Šī pētījuma rezultāti sniedz būtisku ieguldījumu šāda preparāta izveidē, nosakot no gumijiem izdalīto celmu taksonomisko piedeību 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 rRNA pilna garuma gēns ir atbilstošs marķieris, lai veiktu no tauriņziežu gumiņiem izdalīto baktēriju tūrkultūru ģenētisko identifikāciju un veiktu filogenētiskās 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:  $\alpha$ - $\beta$ - un  $\gamma$ -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  $\beta$ - un  $\gamma$ -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 agrokīmisko rādītāju rezultāti (augsnes elektrovadītspēja, augsnes kālīja, 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  $\alpha$ -proteobaktēriju klases celmus (gumiņu veidošanai un slāpekļa saistīšanai), bet arī  $\beta$ - un  $\gamma$ -proteobaktēriju celmus – uzlabotai slāpekļa saistīšanai, kā arī augsnes fosfora savienojumu šķīdināšanai. (*6. tēze*)

## PATEICĪBAS

Pētījums veikts pateicoties projektiem EUROLEGUME (“Tauriņziežu audzešanas 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).

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

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

Paldies Dr. biol. Vilhelminai 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.

## **TOPICALITY OF THE RESEARCH**

In recent years legumes have become the center of attention of scientists, farmers and consumers all over the world. Legumes play an important role enriching the soil with nitrogen, improving soil fertility and protecting it from erosion (Giller, Herridge, Sprent, 2016; Voisin et al., 2014). Currently, the EU does not grow enough legumes to meet the local demand for food and fodder. Most of the legumes consumed as food in the EU, similar to legumes used for fodder, are imported from other countries outside EU. The arable land in the EU devoted to the cultivation of legumes has decreased from 4.6% to 1.8% in the last fifty years (Zander et al., 2016). An increase in local legume production is recommended to reduce Europe's dependency on imported protein for animal feed (Watson et al., 2017).

An important role in the cultivation of legumes is played by rhizobia – soil bacteria that attach to the roots of legumes and, in the case if a successful symbiosis, form nodules and fix atmospheric nitrogen, which plants can use in protein production, receiving nutrients from the plants in return (Wang et al., 2019a). Rhizobia bacteria differ in the atmospheric nitrogen-fixing efficiency, and these differences are observed not only between different rhizobia species, but also between different strains of the same species. A successful legume-rhizobia symbiosis requires a compatible legume and rhizobia strain combination (Giller, Herridge, Sprent, 2016). It is essential to conduct research with local rhizobia bacteria strains that are appropriate for the environmental conditions of the specific area. In addition, these strains of rhizobia isolated from native soil will be more suitable for establishing a symbiosis with native legume cultivars. The most suitable rhizobia strains for commercial legume cultivation, can be best selected, based on the basis of scientific research. Although many studies have been conducted on the effectiveness of rhizobia bacteria in Latvia and elsewhere in the world, contradictory results have been observed. One of the reasons is that there is a lack of information on the diversity of rhizobia bacteria. In Latvia, the taxonomic affiliation of the rhizobia bacteria of the LBTU collection has not been yet determined using genetic analyses. Phylogenetic studies of rhizobia bacteria are necessary to complement the knowledge of rhizobia diversity, while at the same time providing research-based knowledge for selecting the appropriate rhizobia strains for the production of commercial legume seed inoculum.

### **The aim of the thesis**

To evaluate the taxonomic affiliation and diversity of rhizobia bacteria strains in the LBTU collection and the newly isolated rhizobia strains.

## **Research objectives**

1. To carry out an inventory of rhizobia strains in the Rhizobium Collection of LBTU.
2. To supplement the Rhizobia Collection of LBTU with new rhizobia strains isolated from legumes grown in Latvian soils.
3. To identify the taxonomic affiliation of the existing and newly isolated rhizobia strains in the Rhizobium Collection of LBTU.
4. To determine the diversity of identified rhizobia strains.
5. To analyze the diversity of identified rhizobia strains depending on host plants and soil agrochemical indicators.

## **Hypothesis of the thesis**

Different genera of rhizobia bacteria are found in nodules of legumes grown in the soils of Latvia, the diversity of which is influenced not only by the host plant, but also by the agrochemical indicators of the soil.

## **Thesis statements**

1. The full-length 16S rRNA gene is an appropriate marker for the identification of legume symbiont diversity
2. Bacteria from different classes of proteobacteria are found in legume nodules.
3. There are differences in diversity between the historical collection rhizobia and newly isolated strains.
4. Host plants, from which nodules the bacteria are isolated, have a significant influence on the diversity of rhizobia strains.
5. The abiotic conditions of the soil (pH, soil electrical conductivity, availability of mineral elements) affect the diversity of rhizobia.
6. It is recommended to use a mixture of bacteria from various genera when creating legume seed inoculum.

## **Approbation of research results**

Eight publications have been prepared on the results of this research, 6 of which are indexed in Scopus or Web of Science databases (see pages 5–6). The results have been also summarized in 3 conference proceeding articles, as well as 6 oral presentations and 17 poster presentations at scientific conferences (see page 6 for the most significant ones).

## MATERIALS AND METHODS

The research was carried out in several steps (Fig. 1): inventory of the Rhizobia Collection of the LBTU Institute of Soil and Plant Sciences (hereinafter – the historical collection); isolation of new rhizobia strains; collection of soil samples and analysis of agrochemical parameters; determination of the taxonomic affiliation of the historical collection rhizobia and newly isolated strains, using molecular biology methods; determination of the diversity of the identified strains. The results of the taxonomic affiliation and diversity of rhizobia, as well as the results of soil agrochemical parameter analysis, were used to determine the most appropriate strain associations for legume seed inoculum.

### Rhizobia strains

Part of the bacterial samples used in the study are rhizobia strains from the historical collection (1962–2015; Table 1; Fig. 2), part – bacterial strains isolated during this study (2016–2019; Fig. 2). To isolate new bacterial strains, the host plant was dug up and lifted out of the soil without damaging the root system or losing root nodules. The root part of the plant and the soil sample were placed in a plastic bag for further analysis. All nodules from one plant were stored in a single centrifuge tube containing silica gel and cotton wool (1:1).

#### Isolation of bacterial strains from nodules

Nodules were placed in a container with distilled water ( $dH_2O$ ) for 24 h at 20 °C before isolation of rhizobia. Surface sterilization was done for 1 min in 70% alcohol solution, 2–4 min in 3–5% hypochlorite solution; rinsed 3–5 times in sterile  $dH_2O$ , ground with a sterile glass rod into a drop of  $dH_2O$  in a microcentrifuge tube, and the suspension smeared onto YMA Petri plate.

#### Obtaining pure cultured of rhizobia

To obtain pure cultures of bacteria, YMA Petri plates were supplemented with indicator dyes – Congo red or bromothymol blue. Petri plates were incubated in the dark at 25–30 °C for 3–10 days. The dilution method was used to obtain pure cultures: 1  $\mu$ L of the bacterial sample was dissolved in 1 mL sterile  $H_2O$ ; 100  $\mu$ L was transferred to the next tube containing 900  $\mu$ L sterile  $H_2O$ , dissolved and 100  $\mu$ L was again transferred to the next tube. This was continued until five tubes with different dilutions were obtained. 100  $\mu$ L of each dilution was transferred to a new YMA Petri plate; incubated in the dark at 25–30 °C for 5 days. Such purification was performed at least twice. The pure strains were transferred to a new YMA Petri plate once a year. A uniform system of collection codes was created for all strains.

## Rhizobia strain identification

### DNA extraction

Pure bacterial cultures were used for the identification of rhizobia strains using molecular biology methods: 1 µL of the sample was placed in a 1.5 mL centrifuge tube containing 100 µL *PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent* solution for DNA extraction. The sample was mixed by shaking at 30 Hz for 30 s, heated for 10 min at 100 °C. After heating, it was cooled for 2 min at room temperature and centrifuged at 14,000 × g for 2 min. After centrifugation, 50 µL of the supernatant was transferred to a new 1.5 mL microcentrifuge tube.

### Amplification and sequencing of the 16S rRNA gene

To obtain full-length 16S rRNA gene sequence, it was amplified in three separate PCR reactions using the *MicroSeq® Full Gene 16S rDNA Bacterial Identification PCR* kit. Rhizobia DNA was diluted 1:50 using nuclease free H<sub>2</sub>O. 7 µL of DNA was mixed with 7 µL *MicroSEQ™ PCR* solution. Three reactions with three different PCR mixes (MM 1, MM 2, MM 3) were prepared per DNA sample. Each PCR mix contained the appropriate primer pairs to amplify a specific fragment of the 16S rRNA gene. Control samples – *E. coli* (positive control) and nuclease free H<sub>2</sub>O (negative control) were also included in the amplification. Amplification of DNA fragments (Table 2) was performed in a PCR machine using the 9600-emulation mode.

The quality of the PCR product was checked using an agarose gel. Samples in which the amplified DNA fragment was not detectable or flanking areas could be observed, were not used for further analysis. The amplified PCR product (5 µL) was purified by adding 1.5 µL of a mixture containing 0.5 µL exonuclease (20-units µL<sup>-1</sup>) and 1 µL alkaline phosphatase (1-unit µL<sup>-1</sup>), treated at 37 °C for 15 min and 85 °C for 15 min. The sequencing reaction of the purified PCR product was performed using the *MicroSeq® Full Gene 16S rDNA Bacterial Identification Sequencing* kit. This kit includes reagents for sequencing three different fragments of 16S rRNA gene with both forward and reverse primers. The reaction mixture was prepared according to the kit instructions. The sequencing reaction (Table 3) was performed in a PCR machine using 9600-emulation mode.

Sequencing PCR products were purified using *MicroSEQ™ ID Sequencing Clean-up Cartridges*, following the manufacturer's instructions. Electrophoresis of these PCR products was performed using Sanger 3500 genetic analyzer with capillary length 50 cm and polymer POP-7™. In a 96-well plate, 10 µL of *Hi-Di™* formamide and 10 µL of purified sequencing PCR sample were added to each well.

## **Analysis of 16S rRNA gene sequencing results**

Sequencing results were analyzed using *CLC Main Workbench 20.0.2.* program. All sequences were manually checked and corrected by comparing the obtained chromatogram peaks with the nucleotides identified by the program. All obtained 16S rRNA gene fragment sequences of one sample were assembled into a single sequence that was used for strain identification as well as phylogenetic analyses. The taxonomic affiliation of rhizobia strains was determined using BLAST®, a publicly available NCBI GenBank standard nucleotide database search engine. From the results of the database, the organism that showed the closest sequence similarity to the strain under study was used. The taxonomic affiliation of the genotypes was additionally checked using the open access database SILVA.

## **Statistical analysis of 16S rRNA gene sequencing data**

The full-length 16S rRNA gene sequences of all strains were analyzed by multiple sequence alignment using *CLC Main Workbench 20.0.2.* (parameters: *gap open cost = 10.0; gap extension cost = 1.0; end gap cost = as any other; alignment mode = very accurate*). Reference strains were included in the sequence alignment. For construction of the phylogenetic tree, strains with identical sequences were excluded from the sequence alignment, leaving one representative sample for each genotype. The phylogenetic tree was constructed using the Neighbor Joining phylogenetic dendrogram construction method and Kimura 80 nucleotide substitution model. To test the significance and the evolutionary reliability of the phylogenetic tree, the bootstrap analysis method was used in 1000 repetitions.

## **Conserved and hypervariable regions of the 16S rRNA gene**

The hypervariable and conserved regions of the full-length 16S rRNA gene were determined by calculating how often the most frequent nucleotide is at a given position (bp) in a multiple sequence alignment of the studied rhizobia strains:

$$\text{frequency} = \frac{a*k}{n}, \quad (1)$$

where:

a = occurrence of the nucleotide at the given position in the sequence comparison;

k = maximum frequency index (=1);

n = total number of samples in the sequence alignment.

## **Soil analysis**

Soil samples were collected simultaneously with the isolation of new rhizobia strains. These samples were stored in plastic bags, in a dry room, at room temperature until analysis (up to three months).

### **Measurements of soil agrochemical indicators**

Soil samples were analyzed using two different methods. Soil electrical conductivity, pH, Na, K,  $\text{NO}_3^-$  and Ca were determined with Horiba LAQUAtwin meters. dH<sub>2</sub>O was added to the soil sample in a ration 1:1 in a 50 mL centrifuge tube, shaken and left at room temperature for 24h. Soil samples were centrifuged and supernatant was used for analyses. 0.1 mL sample was used for the measurement. Measurements were performed in three replicates.

The phosphate ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) content in the soil was determined in the LBTU laboratory of the Institute of Soil and Plant Sciences according to the Egner-Reihm method (LV ST ZM 82-97).

### **Data processing of the results of soil agrochemical indicators**

The results of the soil agrochemical indicator analysis were reviewed both according to the host plants of the isolated rhizobia strains and according to the identified genera of species of rhizobia strain. For data visualization, MS Excel program Box and Whisker diagrams were used, showing the variability of data within the given group. Statistical analyzes were performed in MS Excel with open access *XLSTAT* plug-in. Pearson's correlation analysis was used to determine the closeness of the linear relationship between the investigated characteristics: 0–0.299 = weak correlation; 0.3–0.699 = moderately close correlation; 0.7–1.0 = close correlation. In order to determine the influence of soil analysis indicators on each other, a principal component analysis was performed by constructing a factor-loading graph of the soil agrochemical indicators.

## RESULTS AND DISSCUSSION

### Inventory of LBTU rhizobia strain collection

Inventory of LBTU historical collection of rhizobia bacteria and newly isolated strains was carried out, obtaining rhizobia strain pure cultures with collected available information about these strains. The rhizobia historical collection contained 34 bacterial strains (Table 1). After the inventory, the collection contains 46 historical strain pure cultures and 143 new bacterial strains. In total, the renewed rhizobia collection contains 189 strains, isolated from 1962–2019, from 14 different genera of legumes – 59 strains from faba beans, 32 from soya, 23 from clover, 22 from peas and 15 strains from alfalfa. From the remaining 10 genera, less than 10 strains from each host plant were isolated. Rhizobia strains have been isolated from 15 different municipalities in Latvia, as well as 3 territories outside Latvia.

### Genetic identification of rhizobia strains

The full-length 16S rRNA gene was analyzed to determine the taxonomic affiliation of rhizobia strains by amplifying it in three separate fragments. Each fragment was sequenced using both forward and reverse primers. A total of 173 rhizobia strains were analyzed in 1038 sequencing reactions. 146 bacterial strains showed qualitative chromatogram results. All identified strains showed qualitative chromatogram results, and  $\geq 99\%$  sequence similarity with the organism available in the database. Bacterial strains with identical sequences were combined into one genotype, resulting in 62 unique genotypes. The identified strains (Table 4) belong to four bacteria classes –  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -proteobacteria and *Bacilli*. Most of the identified samples (96 strains) belong to  $\alpha$ -, 15 strains to  $\beta$ -, and 28 strains to  $\gamma$ -proteobacteria class. Seven identified strains belong to *Bacilli* class. The sequences of all identified bacterial strains were deposited in the NCBI GenBank database.

The taxonomic affiliation of all identified genotypes was checked with the SILVA open access database. At the genus lever, 92% of genotype identities matched in both databases. Of these, 76% showed identical results, 8% identified at the genus level in GenBank are identified at the species level in the SILVA database; 2% identified genera matched, but species identity differed. A different taxonomic affiliation was determined for 8% of the genotypes (RhSP05–RhSP09). According to the GenBank data, these genotypes were identified as *Rhizobium*, while according to SILVA – as *Agrobacterium* spp. *Rhizobium* and *Agrobacterium* are known to be closely related genera that are often hard to

distinguish. Therefore, when identifying taxonomic affiliation, phenotypic features should also be considered, when collecting samples.

### Conserved and hypervariable regions of the rhizobia 16S rRNA gene

This study determined the hypervariable and conserved regions of the 16S rRNA gene by comparing the results between the three studied classes of proteobacteria, as well as by comparing them with literature data (Fig. 3). The closest match for the hypervariable regions is in the case of  $\alpha$ -proteobacteria. Sequence variability is observed less in  $\beta$ -proteobacteria; however, it is in the same regions as mentioned in literature data. The variable regions of  $\gamma$ -proteobacteria often overlap with the conserved regions indicated in the literature. So far, no information of this kind can be found in the literature about the genetic differences in the variable regions of the 16S rRNA gene between different genera of rhizobia. It would be risky to use specific variable regions of 16S rRNA gene when identifying rhizobia without knowing their class affiliation, as well as considering the conflicting information in the literature on this matter. These results confirm the importance of sequencing the full-length 16S rRNA gene for further from nodules isolated strain identification.

### Diversity of rhizobia strains

Until now, only bacteria belonging to  $\alpha$ -proteobacteria class, mostly *Rhizobium* genus, have been considered as rhizobia in Latvia. In this study, for the first time in Latvia, bacteria that belong to  $\beta$ - and  $\gamma$ -proteobacteria classes, were isolated from legume nodules. The 16S rRNA gene sequences of the representative strains of each genotype (62 in total) (Table 4) were used in the phylogenetic analyses. Some of these genotypes are unique to individual strains, while some combine several strains with identical 16S rRNA gene sequences. In the phylogenetic tree, which includes the representative samples of all genotypes (Fig. 4), as well as the reference strains, the genotypes are grouped into four clusters. The genotypes of these samples were not grouped randomly, but according to their taxonomic classification –  $\alpha$ -proteobacteria,  $\beta$ -proteobacteria,  $\gamma$ -proteobacteria and *Bacilli*. Of the 96 identified bacterial strains belonging to the  **$\alpha$ -proteobacteria** class, 88 strains belong to *Rhizobium* genus – 43 of them are *R. leguminosarum* and four *R. gallicum*, while the affiliation of the remaining strains could only be identified at the genus level. Among the identified strains, one is identified as *Ensifer adhaerens*, three *Neorhizobium galegae*, two *Mesorhizobium* sp., one *Azospirillum* sp. and one *Bradyrhizobium japonicum* strain. 14 identified bacterial strains belong to the  **$\beta$ -proteobacteria** class – seven *Paraburkholderia terricola*, one *P. caledonica*, five *Burkholderia* sp. and one *Achromobacter* sp. Of the 28 bacterial strains belonging to the  **$\gamma$ -proteobacteria** class, seven strains are members of the *Enterobacter* genus (of which three are *E. ludwigii* and one *E. asburiae*), eight strains are members of *Pseudomonas*

genus (of which one strain is identified as *P. frederiksbergensis*), six *Rahnella aquatilis*; four *Serratia plymuthica* and three strains are identified as *Pantoea agglomerans*. Seven identified strains belong to the ***Bacilli*** class, of which six are *Paenibacillus polymyxa* and one *Paenibacillus peoriae*.

For in-depth genetic comparison of closely related bacterial strains, phylogenetic trees were created for each class of proteobacteria. **Alfa-proteobacteria class** strains form a dendrogram (Fig. 5) with 11 clusters. **Cluster I** contain only two rhizobia strains – both isolated in year 2016, identified as *R. leguminosarum*. **Cluster II** includes three genotypes that combine historical collections and newly isolated bacterial strains. This cluster includes the numerically largest number of strains from the historical collection. The branch lengths of the dendrogram are relatively larger between genotypes, indicating greater evolutionary distance between strains in this cluster. The RhSP05 genotype includes 16 *Rhizobium* sp. strains isolated from a wide range of legumes isolated in 1973–2018. Genotype RhSP06 includes seven *Rhizobium* sp. strains – three isolates of strain “407” from the historical collection (1972; faba beans) and four isolated in 2016 (alfalfa, peas, lupine). RhSP07, the evolutionary most distant compared to other genotypes in this cluster, includes 13 genetically identical *Rhizobium* sp. strains, of which only two strains are newly isolated (in 2016), and the remaining 11 are historical collection strains (1963–2015). **Cluster III** includes two genotypes – RhSP04 and RhSP03, corresponding to two *Rhizobium* sp. bacteria strains (2016). **Cluster IV** includes one *Ensifer adhaerens/Sinorhizobium* sp. genotype corresponding to one strain (2016; birdsfoot trefoil). **Cluster V** includes genotypes ASP01 and BhJ01, as well as the *Bradyrhizobium japonicum* reference genotype. ASP01 corresponds to the historical *Azospirillum* sp. strain “422a” (RM24502; 1971; alfalfa); BhJ01 includes one strain of *B. japonicum* (RSBASF/S) isolated in 2019 in a field trial in which soya beans were treated with BASF’s *HiStick® Soybean* rhizobia inoculum before sowing. **Cluster VI** includes two genotypes – MhSP01 and MhSP02 (soya; 2018), as well as a *Mesorhizobium loti* reference strain. **Cluster VIII** includes the *Neorhizobium galegae* reference strain and the NhG01 genotype, which combines three *N. galegae* strains (2016, 2018; galega). **Cluster IX** includes two genotypes – RhG01 and *R. gallicum* reference strain. The RhG01 genotype corresponds to four strains of *R. gallicum* (2016, 2018; clover, lupine, soya). **Cluster X** genotype RhSP01 corresponds to one rhizobia strain, identified both as *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., and *R. leguminosarum* – with equal sequence similarity of 99%. The RhSP02 genotype also corresponds to a single sample that, although genetically distinct from RhSP01, also identified as *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., as well as *R. leguminosarum* with 99% sequence similarity. **Cluster XI** combines genotypes – RhL01, RhL02, RhL03 and *R. leguminosarum* reference strain, all identified as *R. leguminosarum*. RhL01 is the most represented genotype in this study – including 31 strains

(2016, 2018, 2019; peas, faba beans, meadow vetchling, birdsfoot trefoil, common bean, alfalfa, vigna, clover and field restarrow). These rhizobia strains were isolated from different areas in Latvia. Genotype RhL02 combines six strains of *R. leguminosarum* bacteria. Unlike the RhL01 genotype, which covers only newly isolated strains, RhL02 includes both historical collection strains (RP023Y, RP02301, RP023Z; 1964) and strains isolated in 2016. Genotype RhL03 corresponds to one *R. leguminosarum* bv. *trifolii* bacteria strain isolated in 2016.

In the phylogenetic analysis, 14 strains of the  **$\beta$ -proteobacteria class** form a dendrogram with 5 clusters (Fig. 6). These strains were isolated from soya (8 strains), faba beans (5 strains) and alfalfa (1 strain) from 2016–2019. **Cluster I** include genotype Pb03 (2018, 2019; host plant – soya). **Cluster II** – *P. nodosa* reference strain and genotype BSP07 (*Burkholderia* sp.). This strain RS2030/19 was isolated in 2019, in pot trials, where soya beans were treated with strain RS2030, which in turn was identified as *Mesorhizobium* sp. **Cluster III** includes the *P. caledonica* reference strain and genotype PbC01 (*P. caledonica*; 2019; faba beans). **Cluster IV** includes three genetically distinct genotypes, all identified as *Burkholderia* sp. **Cluster V** corresponds to the *P. terricola* reference strain and three *P. terricola* genotypes.

Bacterial strains identified as belonging to the  **$\gamma$ -proteobacteria class** form seven clusters in the phylogenetic tree (Fig. 7). A total of 28 bacterial strains were identified as *Enterobacter* sp. (including *E. asburiae* and *E. ludwigii*), *Pseudomonas* sp. (including *P. frederiksbergensis*), *Rahnella aquatillis*, *Serratia plymuthica* and *Pantoea agglomerans*. All the represented strains were isolated from 2016–2019, from a wide range of host plants. The most frequently represented host plant is soya. **Cluster I** include genotypes EA01 (*E. asburiae*) and ESP03 (*Enterobacter* sp.) – each corresponding to one rhizobia strain (2019; host plant – soya). **Cluster II** combines six different genotypes and includes the reference strain *Pseudomonas putida*. Two sub-clusters can be distinguished within this cluster, each comprising three closely related (but not identical) genotypes. One sub-cluster combines genotypes PSP04 (*Pseudomonas* sp.; 2016, 2018; clover, soya), PSP02 (*P. frederiksbergensis*; 2018; melilot) and PSP01 (*Pseudomonas* sp.; 2018; alfalfa). The second sub-cluster includes genotypes PSP05, PSP06 and PSP07 – all identified as *Pseudomonas* sp. (2016; clover, cow vetch, soya). **Cluster III** includes *Rahnella aquatillis* reference strain and genotypes Ra02 (2018; peas, alfalfa) and Ra01 (2016, 2019; faba bean). **Cluster IV** includes *Serratia plymuthica* reference strain and genotypes SrP04, SrP02 (2016; lupine) and SrP01 (2019; faba bean). **Cluster V** includes *Pantoea agglomerans* reference strain and genotypes PnSP01 (2018, melilot) and PnA01 (2019; soya). **Cluster VI** includes two genotypes of *Enterobacter* sp. – ESP01 and ESP02 (2019; soya). **Cluster VII** – *E. ludwigii* reference strain and genotype ESP04 (2019; soya).

Until recently, only rhizobia bacteria belonging to the class  $\alpha$ -proteobacteria were considered as symbiotic bacterium that form nodules on legume roots and fix nitrogen. In this study as well 65% of all identified strains belong to the  $\alpha$ -proteobacteria class. However, the total diversity of bacteria is greater than initially expected – the identified bacteria strains belong to  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -*proteobacteria*, as well as *Bacilli* classes (Table 4). A growing number of studies quantifying the diversity of rhizobia are detecting diversity similar to that identified in this study, indicating that the symbiotic relationship between bacteria and legumes is a broader phenomenon than previously thought (Moulin et al., 2001). The addition of strains of the  $\beta$ -proteobacteria class to the group of rhizobia bacteria is a relatively new discovery (since early 2000s), compared to more than hundred years of research on rhizobia bacteria.

Not only rhizobia, but also other endophytic bacteria are capable of transforming atmospheric nitrogen into ammonia, as well as forming symbiotic relationships with legumes. For example, *Serratia* sp. together with rhizobia improve the ability to form nodules on legume roots, showing higher number of nodules as well as increased size of nodules, improving the biomass and root system of legumes (Naveed et al., 2015). Many of the bacteria also identified in this study (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Rahnella Paenibacillus*, *Pantoea*, *Enterobacter* and *Pseudomonas* spp.) have shown properties to improve plant growth and development by dissolving phosphorus reserves in the soil (Timofeeva, Sedykh, 2022; Zineb et al., 2019). Due to the diversity of bacteria ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -*proteobacteria*, *Bacilli*), nodules can be considered a unique ecological niche that gives “home” to a wide range of compatible microorganisms, indicating that not only  $\alpha$ -proteobacteria should be used in legume seed inoculum, but it should also include bacterial strains from different but mutually compatible classes of bacteria.

### **Changes in the diversity of rhizobia over time**

It was tested whether among the strains included in this study isolated from 1962–2019 diversity differences could be observed. The results for the class  $\alpha$ -proteobacteria do not show strong evidence for such differences in diversity. Most of the clusters in the phylogenetic tree of  $\alpha$ -proteobacteria were observed to contain both historical strains and newly isolated strains. For example, cluster II of the  $\alpha$ -proteobacteria class includes the most strains from the historical collection, however, this cluster also includes newly isolated strains. Nevertheless, there are some  $\alpha$ -proteobacteria genotypes that correspond only to the strains of historical collection, for example – RhSP09 and ASP01.

All seven *Paenibacillus* sp. isolates are strains of the rhizobia historical collection. On the other hand, none of the strains from the historical collection were identified as belonging to the  $\beta$ - or  $\gamma$ -*proteobacteria* class. The absence of strains of these classes of proteobacteria in the historical collection could be

related to the phenotypic characteristics of the bacteria. The media used in the cultivation of the bacteria could also have a selective effect. The bacteria from the historical collection were originally isolated and cultivated using white bean and gray pea agar media rather than YMA media. These could be possible reasons for the fact that bacterial strains isolated in Latvia in the period from 2016–2019, show greater diversity in all three classes – α-, β- and γ-proteobacteria.

### Host plants and specificity of identified bacteria

In order to determine the specificity of the host plant and the identified bacteria, the diversity of bacteria isolated from nodules of the specific host plant was evaluated (Table 5). Number of bacterial strains isolated from **faba beans** (*Vicia faba*) identified using molecular genetic methods: 35, of which 20 strains were identified as *Rhizobium* sp. – 10 of which were genotype RhL01 *R. leguminosarum* strains, isolated in 2016–2019. One of the strains identified as *R. leguminosarum* was identified with equal confidence as *Bradyrhizobium* sp. The strains isolated from *V. faba* were also identified as *Rahnella aquatilis* (2 strains), *Serratia plymuthica* (2 strains), *Pantoea agglomerans* (1 strain), *Achromobacter* sp. (1 strain), *Paenibacillus* sp. (2 strains), *Paraburkholderia* sp. (2 strains) and *Burkholderia* sp. (3 strains). All bacterial strains identified as *Burkholderia* sp. were isolated from the same trial field. Bacterial strains that do not belong to the α-proteobacteria class are strains isolated from 2016–2019. An exception is the strain *Paenibacillus polymyxa* RV06902, isolated in 1970.

The number of bacterial strains isolated and identified form **soya** (*Glycine max*): 26 (Table 5), of which 9 belong to α-proteobacteria class (*Rhizobium* sp., *R. gallicum*, *Mesorhizobium* sp., *Bradyrhizobium japonicum*) and seven belong to β-proteobacteria class (*Burkholderia* sp., *Paraburkholderia terricola*). The remaining 10 strains belong to the γ-proteobacteria class (*Pseudomonas* sp., *Pantoea agglomerans* and *Enterobacter* sp.). The number of bacterial strains isolated and identified from **peas** (*Pisum sativum*) is 18, of which 15 are *Rhizobium* sp., two *Rahnella aquatilis* and one *Paenibacillus peoriae*. The number of bacterial strains isolated and identified from **clover** (*Trifolium* sp.) – 17, of which 13 were identified as belonging to the genus *Rhizobium*. Relatively many of these strains show identical 16S rRNA gene sequences. Three strains were identified as *Pseudomonas* sp. (all genetically different), one – *Serratia plymuthica*. The number of bacterial strains isolated and identified from **alfalfa** (*Medicago* sp.) is 12, of which 7 are *Rhizobium* sp. The remaining strains were identified as – *Azospirillum* sp., *Paraburkholderia* sp., *Pseudomonas* sp., *Rahnella* sp., *Paenibacillus* sp. – one strain from each genus. The number of bacterial strains isolated and identified from **cow vetch** (*Vicia cracca*) – 5, of which 4 are *R. leguminosarum* and one *Pseudomonas* sp. The number of bacterial strains isolated and identified from **common vetch** (*Vicia sativa*) and **meadow**

**vetchling** (*Lathyrus pratensis*) – 4 (2 from each) – all *R. leguminosarum*. The number of bacterial strains isolated and identified from **galega** (*Galega* sp.) – 5, of which two identified as *Rhizobium* sp. and three as *Neorhizobium galegae*. Number of bacterial strains isolated and identified from **lupins** (*Lupinus* sp.) – 9, of which five are *Rhizobium* sp., one *R. gallicum* and one *Serratia plymuthica*. The number of strains isolated and identified from **birdfoot trefoil** (*Lotus* sp.) – 4, of which 3 *Rhizobium* sp. and one *Ensifer adhaerens/Sinorhizobium* sp. Only one strain isolated from **vetch** (*Anthyllis* sp.) has been identified using molecular genetics methods – *Rhizobium* sp. The number of strains isolated and identified from **common beans** (*Phaseolus vulgaris*) – 5, from which one is *Rhizobium* sp., two *R. leguminosarum* and two *Paenibacillus polymyxa*. The number of strains isolated and identified from **vigna** (*Vigna* sp.) – 2, from which one is *R. leguminosarum* and the other is *Paenibacillus polymyxa*. In the historical rhizobia collection, there were no bacterial strains previously isolated from **melilot** (*Melilotus* sp.). This study identified four strains – *Rhizobium* sp., *Pantoea* sp., *Rahnella* sp. and *Pseudomonas* sp. – one strain from each genus. The bacterial strain isolated from the **field restarrow** (*Ononis arvensis*) was identified as *R. leguminosarum* and belongs to the most extensive phylogenetic group – RhL01.

Bacterial strain and host plant specificity differ between clusters of  **$\alpha$ -proteobacteria** (Table 4; Fig. 5): Clusters II un IX, identified as *Rhizobium* sp and *R. leguminosarum*, isolated from the widest range of host plants, indicating the low specificity of these host plants. The highest host plant specificity is shown by strains from the following clusters of  $\alpha$ -proteobacteria phylogenetic tree: Cluster IV (*Sinorhizobium* sp.; host plant *Lotus* sp.); Cluster VI (*Mesorhizobium* sp.; *Glycine max*); Cluster VIII (*Neorhizobium galegae*; *Galega* sp.). In contrast, strains belonging to the  **$\beta$ -proteobacteria** class showed relatively higher host plant specificity (Table 4; Fig. 6). Seven of the 14 strains were isolated from *Glycine max*, six from *Vicia faba* and one from *Medicago sativa*. In addition, soya was the only host plant for bacterial strains belonging to clusters I and II of  $\beta$ -proteobacterial phylogenetic tree, while faba bean was the only host plant for strains in Cluster III. Clusters VI and V showed lower host plant specificity. Phylogenetic analyzes of  **$\gamma$ -proteobacteria** did not show high host plant specificity (Table 4; Fig. 7). It should be noted that greater genotypic fragmentation was observed in this class of proteobacteria – most of the genotypes included only one bacterial strain. However, all bacterial strains identified as *Enterobacter* sp. were isolated from root nodules of *Glycine max*. Other  $\gamma$ -proteobacteria strains did not show such high host plant specificity.

## Distribution of identified rhizobia strains in Latvian soils

### Diversity of bacteria isolated from legumes in various regions in Latvia

The collection was supplemented with new strains of rhizobia based on a set of different considerations – rhizobia bacteria were isolated from existing trial fields, mainly from faba beans, peas and soya. In addition, other legume species were chosen in order to expand the diversity of rhizobia bacteria strains in the collection, by isolating them from field trials, pot experiments, as well as other production areas. The available legume field trials were located mostly in Zemgale, Kurzeme and Latgale, therefore bacterial strains were mostly isolated from these regions (Fig. 8).

Historical collection strains obtained from 1962–1973 were isolated in the municipalities of Jelgava, Dobele and Talsi (Fig. 8). Strains isolated from 2006–2015, mostly were isolated in field trials in Stende, but also in Jelgava, within the experimental trials of the Institute of Soil and Plant Sciences, as well as from field trials in Skrīveri. The collection also contains rhizobia strains that were isolated outside Latvia – in 1982 and 2008 strains isolated from galega root nodules in Estonia, as well as strain “422a” (RM24502, RM24503, RM24505) of the historical rhizobia collection, obtained in 1972 from the “Leningrad Collection”. Strains RVLTSKR and RVLT60 were isolated in Lithuania in 2019 within the framework of collaborative research project.

Evaluating the distribution of the identified rhizobia strains according to their affiliation to a specific class of proteobacteria, it can be observed that  $\alpha$ -proteobacteria were obtained in almost all sample collection sites (17 no 20), while  $\beta$ -proteobacteria were identified in 7 out of 20 sampling sites. In these deposit sites,  $\beta$ -proteobacteria were proportionally less abundant than representatives of the other bacterial classes. Gamma-proteobacteria were identified in 11 out of 20 sites. It should be noted that the number of samples collected at the sampling sites is different, so the results should be evaluated in the context of the host plant from which these bacteria have been isolated.

### Soil abiotic conditions at the isolation sites of rhizobia bacteria

Environmental conditions affect not only the growth and development of legumes, but also rhizobia bacteria, affecting nodule formation and nitrogen fixation efficiency (O’Hara, 2001). This study analyzed soil samples collected together with legume roots (2016–2019). The content of soil potassium, calcium, nitrates, phosphates, sodium, pH, as well as soil electrical conductivity were evaluated. Data were grouped by 1) host plants present in the soil sample and 2) identified bacterial species/genera isolated from these host plants, analyzing and comparing the variability of data within each of these groups. The smallest data variability for **potassium** content can be observed in *Lupinus* sp. and *Glycine max* samples (up to 40 mg kg<sup>-1</sup>). The highest data variability of potassium is

shown by *Trifolium* sp. samples ( $10\text{--}180 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Evaluating the results according to the identified bacteria, *Burkholderia* sp. samples show the smallest data variability ( $7\text{--}23 \text{ mg kg}^{-1}$ ), the largest – *Pseudomonas* sp. samples ( $6\text{--}126 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Overall, the results show insufficient (very low  $\leq 50$  or low  $50\text{--}100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) potassium content in the soil. **Calcium** composition in soil samples, analyzed by host plants, varied from  $61\text{--}2700 \text{ mg kg}^{-1}$ . The smallest data variability can be observed in *Lathyrus* sp. ( $2033$  and  $2200 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Evaluating the results by the identified bacterial strains, the lowest calcium content (up to  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) was in the case of *Burkholderia* sp., *Serratia plymuthica* and *Rhizobium gallicum*. The highest calcium result was shown by the soil sample variant where *Pseudomonas* sp. strain was isolated from *Trifolium* sp. Sufficient calcium content in the soil ( $>1000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) was detected in  $44.5\%$  of soil samples.

The amount of **nitrate** ( $\text{NO}_3^-$ ) in the soil indicates the nitrogen available to plants. Soil nitrate content varied from  $1.8\text{--}56 \text{ mg kg}^{-1}$  (Fig. 9).  $30\%$  of samples showed insufficient ( $<10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) nitrate content. Some of these samples were collected in areas that are not used for agricultural purposes. More than half of the strains isolated from legumes growing in these soils were identified as belonging to the class of  $\alpha$ -proteobacteria (*Rhizobium gallicum R. leguminosarum*, *Neorhizobium galegae*).  $49\%$  of soil samples contained satisfactory ( $10\text{--}20 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and  $20\%$  of samples – sufficient ( $20\text{--}40 \text{ mg kg}^{-1}$ ) nitrate content. When evaluating the results by host plants and identified bacteria strains, data variability can be observed in all variants. The greatest data variation is observed in *Galega* sp. and in variants of *Neorhizobium galegae* strains ( $4.5\text{--}31.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ), that were isolated from these host plants. Most strains of *Glycine max* bacteria were isolated from nitrate deficient soils.

The average total amount of **phosphorus** in the soil, indicated in literature, is  $200\text{--}1500 \text{ mg kg}^{-1}$  – most of it in a form that is not observed by plants. Phosphate solubilizing microorganisms increase the bioavailability of the insoluble soil phosphorus for plants (Alori, Glick, Babalola, 2017). In this study, the amount of phosphate ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) in soil samples varied from  $33 \text{ mg--}835 \text{ mg kg}^{-1}$  (Fig. 10). The smallest data variability, according to identified bacterial strains, can be observed in soil samples of *Rhizobium gallicum* and *Serratia plymuthica* variants. The largest data variability is observed in *Rhizobium* sp. group. Certain soil bacteria are able to dissolve soil phosphates, making phosphorus available for the plant. Therefore, it is possible that in the samples where the bacteria successfully dissolved soil phosphate, it was therefore available for the plants, thus a lower amount of it can be observed than in the samples where the bacteria are not able to dissolve phosphates.

Analyzing the results according to the sample collection sites, one can ascertain the phosphate solubilizing potential of individual strains. Samples isolated in the field trials in Grobina Municipality in 2019 from faba beans, show

differences in the amount of phosphate between samples. Samples RV19/P5, RV19/P4 and RV19/P6 (*Burkholderia* sp., *Paraburkholderia caledonica* and *Rhizobium leguminosarum*) show relatively low soil phosphate (34.50–49.83 mg kg<sup>-1</sup>). However, the remaining identified samples in this field trial – RV19/K5, RV19/K12, RV19.3/5 and RV19/K10 (*Burkholderia* sp., *Achromobacter* sp., *Rahnella aquatillis* and *Pantoea agglomerans*), were isolated from soil samples containing relatively higher amount of phosphate (192.50–419.00 mg kg<sup>-1</sup>).

It has been observed that **soil pH** is the most important indicator for determining the diversity of soil microorganisms. The highest diversity of microorganisms can be observed in soils with neutral pH, while the lowest – in soils with low (<4.5) or high (>8.0) pH (Lauber et al., 2009; Rousk et al., 2010). The optimal pH, which is necessary not only for the growth of legumes, but also for the establishment of an effective legume-rhizobia symbiosis is 6.0–7.0 (Somasegaran, Hoben, 1994). This is supported by the pH results (Fig. 11), as most of strains were isolated from soils with pH 6.0–7.5, and none of the samples had a pH of <4.5 or >8.0. The largest pH variation can be observed in *Galega* sp., where samples were collected from soil with pH 4.8 and 7.8, and *Vicia* sp. (pH 4.8–8.2). A large proportion of bacteria isolated from host plant roots from soils with pH <6 was not successfully cultured, indicating pH as a limiting factor for optimal growth of rhizobia bacteria. Certain bacterial strains (*Rhizobium* sp., *R. leguminosarum* and *Neorhizobium galegae*) were isolated from soils with low pH. Therefore, for example, the bacterial strain RG00401 (*N. galegae*) could be used in trials with *Galega* sp. in soils with low pH.

**Soil electrical conductivity** indicated the total amount of soluble salts in the soil. All soil samples show electrical conductivity appropriate for legumes as well as for rhizobia (150–3000 µS cm<sup>-1</sup>), except for one sample isolated from no *Vicia faba* and identified as *R. leguminosarum* (RVLT60). This strain could be used in trials in soils with elevated total soluble salt content. Studies have observed that resistance to salt stress can vary among strains within the same genus (Amarger, Macheret, Laguerre, 1997). This is also shown by the data variability of the obtained results within the genus or species level. The greatest data variation can be observed for soil samples from which *Pseudomonas* sp. strains were isolated.

In general, soil analyses do not indicate significant influence of any of the analyzed parameters that would limit the diversity of rhizosphere bacteria. Mostly, a large data variation is observed within a single bacterial genus or species. Soil pH is the only factor with the least data variation. It is also shown in literature that soil pH is the determining factor in the diversity of soil microorganisms (Andrés et al., 2012; Lauber et al., 2009; Rousk et al., 2010). The results of the soil agrochemical parameters indicate the potential of several bacterial strains that could be used for soil phosphate solubilizing, however, the characteristics of these bacterial strains need to be confirmed in further research.

## **Correlative relationships of soil agrochemical indicators**

Pearson's correlation analysis was performed to determine the interrelationships of soil agrochemical indicators. A close correlation was observed between soil electrical conductivity and salinity, and between calcium and soil salinity. No correlation was observed for rhizobia bacteria genotype with soil agrochemical indicators. The influence of indicators on each other was determined by principal component analysis and factor-loading analysis of the indicator interrelationships (Fig. 12). The greatest influence on the main components was observed for genotype, nitrate content, soil electrical conductivity, soil salinity and soil calcium content. The closest relationship between parameters can be detected between soil phosphate and the electrical conductivity; soil salinity and soil potassium content; soil potassium and calcium content. The factor-loading results do not show a significant influence of any of the parameters on the rhizobia genotype. However, the effect of pH and nitrates can be observed on the genotype, compared to the other investigated parameters.

## **Diversity, efficiency and potential application of rhizobia and endophytic bacteria in legume inoculation**

### **Results of previous studies of rhizobia in the context of the genetic analyses**

Using the obtained results, the findings of previous studies can be interpreted, where pure cultures of rhizobia strains from the LBTU rhizobia collection have been used for legume seed inoculation. Relatively many rhizobia strain efficiency studies have used strains RP023, RV407, RV408, RV501 and RV505 for faba bean, soya, and pea seed inoculation. In this study, these strains were identified as the respective genotypes: RhL02, RhSP06, RhSP07, RhSP05 and RhSP07. The results show that strains RV408 and RV505 are identical. Strains RV501 as well as RV408 are also closely related. While RP023 genotype RhL02 is genetically the most distant (Fig. 5). In studies, RP023 and RV407 strains, which have significantly different full-length 16S rRNA gene sequences, most often showed differences in efficiency (Dubova, Šenberga, Alsiņa, 2015; Dubova et al., 2015; Dubova, 2020; Šenberga et al., 2017). Individual studies (e.g., Dubova et al., 2016) have not observed differences in efficiency between strains RV407 and RV505, which have been identified as closely related, based on phylogenetic analysis.

### **Establishment of legume seed inoculum**

The composition of the optimal legume seed inoculum should include 1)  $\alpha$ -proteobacteria rhizobia strain, according to the host plant; 2)  $\beta$ -proteobacteria rhizobia strain; 3) endophytic bacteria strain (Table 6). The  $\alpha$ -proteobacteria

rhizobia strain is included in the legume seed inoculum mainly in order to form legume root nodules, where other bacteria that are not classified as rhizobia could integrate. The primary nitrogen-fixation is also performed by  $\alpha$ -proteobacteria strains. Beta-proteobacteria have also shown the ability to form nodules on legume roots, as well as the ability to improve nitrogen-fixing capacity, by inoculating plants together with  $\alpha$ -proteobacteria strains (Shiraishi, Matsushita, Hougetsu, 2010). Certain strains of  $\beta$ -proteobacteria have also shown the ability to solubilize soil phosphate. Supplementing the inoculum with endophytic bacteria strains from the  $\gamma$ -proteobacteria class would ensure the solubilization of phosphate in the soil, improve nodule formation process, resulting in improved growth and development of the host plant (Naveed et al., 2015; Shiraishi, Matsushita, Hougetsu, 2010). Creating legume seed inoculum using a variety of rhizobia bacteria and other endophytic bacterial strains increases the likelihood of successful and effective symbiosis.

When planning to supplement legume seed inoculum with phosphate solubilizing bacteria, it should be considered that the efficiency of this solubilization, including the ability to dissolve different sources of phosphorus, may differ between bacterial strains. These differences are based on the specific organic compounds, such as lactates, oxalates, citrates, and gluconates, released in the rhizosphere by the bacterial strains, that dissolve soil phosphates (Ibrahim et al., 2022; Timofeeva, Sedykh, 2022). Legume seed inoculum combining not only rhizobia strains that fix atmospheric nitrogen, but also bacterial strains that solubilize phosphorus reserves in the rhizosphere, would be a valuable contribution to sustainable agriculture. The use of such an inoculum, would possibly limit not only the excessive use of mineral nitrogen fertilizers, but also reduce the need for the use of chemical phosphorus fertilizers. As a result, having a positive impact on the surrounding environment. The results of this study make a significant contribution to the creation of such an inoculum by determining the taxonomic affiliation and diversity of the strains isolation from legume nodules.

## CONCLUSIONS

1. As a result of the inventory, 46 rhizobia strains from the historical collection were obtained, isolated from 1962–2015.
2. The Rhizobia Collection of LBTU Institute of Soil and Plant Sciences has been supplemented with 142 new bacterial strains isolated from 2016–2019. The renewed Rhizobia Collection contains 189 bacterial strains isolated from 14 different legume genera.
3. The study confirmed that the full-length 16S rRNA gene is a suitable marker for genetic identification and phylogenetic analysis of bacterial pure cultures isolated from legume nodules. This marker is particularly useful in studies where unknown rhizosphere bacteria are identified to determine the diversity of these microorganisms. (*Thesis 1*)
4. The taxonomic affiliation of 146 bacterial strains was determined. This study identified a wide range of bacteria within the collection:  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -proteobacteria, as well as strains belonging to the *Bacillus* class. (*Thesis 2*)
5. Within the  $\alpha$ -proteobacteria class, no significant differences in the diversity of bacterial genotypes were observed between the historical collection and the newly isolated strains. However, all identified strains of  $\beta$ - and  $\gamma$ -proteobacteria are newly isolated strains, isolated from 2016–2019. Thus, in general, greater bacterial diversity can be observed among newly isolated strains, compared to strains of the historical collection. (*Thesis 3*)
6. Analyzing the distribution of identified rhizobia strains according to their belonging to the proteobacteria class, it was observed that the diversity of bacteria is not affected by the geographical location of sample collection, but by the host plants from which the bacterial strains were isolated (*Thesis 4*)
7. The only abiotic factor that significantly limits the diversity of rhizobia strains is soil pH. The rest of the studied agrochemical indicators (soil electrical conductivity, soil potassium, calcium, nitrate, and phosphate content) showed a large data variation, both when evaluated by host plants and by the isolated and identified bacteria. (*Thesis 5*)
8. When creating legume seed inoculum, one should follow the recommendations developed in this work, including in the inoculum not only host-plant-appropriate rhizobia strains from  $\alpha$ -proteobacteria class (for nodule formation and nitrogen fixation), but also strains from  $\beta$ - and  $\gamma$ -proteobacteria classes – for improved nitrogen fixation, as well as for soil phosphate solubilization. (*Thesis 6*)

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The research was carried out thanks to the projects EUROLEGUME ("Enhancing of legumes growing in Europe through sustainable cropping for protein supply for food and feed"), LegumeGap ("Increasing productivity and sustainability of European plant protein production by closing the grain legume yield gap") and the ESF project ES29 ("Improving the academic staff of LLU", No. 8.2 .2.0/18/A/014).

I express my gratitude to the colleagues of the Department of Plant Biology, Institute of Soil and Plant Sciences, LBTU, especially Dr. agr. Laila Dubova for helping with the experiments.

My gratitude to the students of the Faculty of Agriculture of LBTU and other cooperation partners for welcoming and giving permission to collect samples in the field trials.

Thanks to Dr. biol. Vilhelmine Šteinberga for help and training in working with the collection of rhizobia bacteria, and many thanks to Dr. biol. Vizma Nikolajeva for consulting on microbiology issues.

I express my gratitude to Dr. agr. Zinta Gaile, Dr. biol. Biruta Bankina and Dr. agr. Līga Lepse for the useful suggestions and corrections in the creation of the thesis.

Big thanks go to my family and especially to my husband Māris for the moral support during the writing process, as well as to my daughter for her patience and endurance during the creation of this work.