

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
AUGU FIZIOLOĢIJAS KATEDRA

GUMIŅBAKTĒRIJU SIMBIOZES UN AUGU MIJIEDARBĪBAS IETEKME UZ DIVU  
ĀBOLIŅA SUGU REAKCIJU UZ AUGSNES SĀĻUMU

Maģistra darbs

Autors: Kārlis Dūmiņš

Stud. apl. Nr. kd12035

Darba vadītājs: Dr. hab. biol., prof. Ģederts Ieviņš

Recenzents: Dr. biol., asoc. prof. Uldis Kondratovičs

RĪGA 2017

## KOPSAVILKUMS

Lielākā daļa ekoloģisko pētījumu ir veikti brīvā dabā, bet tai pat laikā ir maz pētījumu par starpsugu konkurenci un to mijiedarbību kontrolētos veģetācijas eksperimentos, lai gan ir iemesls uzskatīt, ka kopkultivācija var ietekmēt augu atbildes reakciju pret biotiskiem un abiotiskiem faktoriem. Eksperimentam izvēlējās Latvijā bieži sastopamo ložņu āboliņu un reti sastopamo, īpaši aizsargājamo zemeņāboliņu, kuru sēklas ievāca no iesāļas pļavas Liepājas ezera krastā.

Darba mērķis bija noteikt kā mainās divu āboliņa sugu reakcija pret augsnes sāļumu augu mijiedarbības un gumiņbaktēriju simbiozes ietekmē.

Eksperimentam ierīkoja 90 veģetācijas traukus, kopā 18 dažādus variantus, kas atšķīrās pēc sugu sastāva, baktēriju inokulanta un apstrādes ar pakāpeniski pieaugošas koncentrācijas sālsūdeni, kas beigās sasniedza 400 mM koncentrāciju. Paralēli apstrādei ar sāls šķīdumu veica hlorofila koncentrācijas, hlorofila  $\alpha$  fluorescences, augsnes elektrovadītspējas, lapu  $\text{Na}^+$  koncentrācijas mērījumus, kā arī eksperimenta beigās noteica augu svaigo un sauso masu, kā arī analizēja peroksidāzes, polifenoloksidāzes aktivitāti un ar membrānu bojājumu pakāpi saistīto savienojumu koncentrāciju augu lapās.

Sāls ietekme palielināja zemeņāboliņa, bet samazināja vai neietekmēja ložņu āboliņa svaigo un sauso masu. Inokulanti bija efektīvi, ko apliecina augu masu būtiskās izmaiņas, kā arī hlorofila koncentrācija atšķirības starp variantiem. Kopkultivācija pastiprināja augu atbildes reakcijas, un to ietekme ir izteiktāka kopkultivācijas variantos.

Eksperimentu veica no 2016. gada septembra līdz 2017. gada aprīlim Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātes Augu fizioloģijas katedrā Valsts pētījumu programmas EVIDEnT ietvaros.

Atslēgvārdi: *Trifolium repens*, *Trifolium fragiferum*, gumiņbaktērijas, kopkultivācija, sālsizturība.

## SUMMARY

There are only a few studies about competition between different plant species in controlled vegetation conditions. However, there are reasons to think that cocultivation can influence plant responses to biotic and abiotic factors. For this experiment two legume species were chosen: the widespread white Clover and the rare species of strawberry Clover. The seeds were harvested in a wet salt-water affected meadow on the shore of Lake Liepājas.

The aim of this study was to determine the effect of symbiotic bacteria and cocultivation in response to soil salinity.

For this experiment, 90 plastic vegetation containers filled with autoclaved garden soil (Biolon) were prepared and two plants per container were used. In total 18 treatments were made, as a biological factor N-fixing bacteria isolated from the white Clover and the strawberry Clover were used. As an abiotic stress factor treatment with increasing concentrations of NaCl was applied (400 mM). During this study leaf chlorophyll concentration and chlorophyll  $\alpha$  fluorescence were analyzed. At the end the fresh and dry mass of the plant were measured.

NaCl increased fresh and dry mass of the strawberry Clover and decreased mass of the white Clover, and both N-fixing bacteria inoculants were effective. Cocultivation affects plant responses.

**Key words:** cocultivation, competition, symbiotic N-fixing bacteria, *Trifolium fragiferum*, *Trifolium repens*.

# SATURS

IEVADS.....	5
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	6
1.1. Jēdziens par retajām augu sugām .....	6
1.2. Augsnes sājums un tā fizioloģiskā ietekme .....	6
1.3. Gumiņbaktēriju simbiozes nozīme augu adaptācijā .....	9
1.4. Sugu mijiedarbība: konkurence un veicināšana.....	11
2. MATERIĀLI UN METODEDES.....	15
2.1. Pētījumā izmantoto sugu raksturojums.....	15
2.1.1. Zemeņāboliņš.....	15
2.1.2. Ložņu āboliņš.....	16
2.2. Sēklu ievākšana, diedzēšana un izejmateriāla audzēšana .....	17
2.3. Eksperimentu iekārtošana, uzturēšana un novākšana.....	17
2.4. Mērījumu veikšana.....	19
2.4.1. Fluorescences un hlorofila koncentrācijas noteikšana .....	19
2.4.2. Na <sup>+</sup> jonu kvantitatīvā noteikšana.....	19
2.4.3. Augsnes elektrovadītspējas noteikšana .....	19
2.4.4. Gvajakola peroksidāzes un polifenoloksidāzes aktivitātes noteikšana .....	20
2.4.5. Malondialdehīda (TBARS) noteikšana .....	21
3. REZULTĀTI .....	22
3.1. Augsnes elektrovadītspējas izmaiņas eksperimenta gaitā.....	22
4. DISKUSIJA .....	39
SECINĀJUMI.....	42
PATEICĪBAS .....	43
LITERATŪRAS SARAKSTS.....	44

## IEVADS

Savstarpējām simbiotiskajām un konkurējošajām attiecībām starp dažādiem dzīvajiem organismiem ir ļoti būtiska nozīme jebkurā ekosistēmā, tomēr empīrisku pierādījumu simbiotisko baktēriju ietekmei uz augu sabiedrību veidošanās procesu ir salīdzinoši maz, galvenokārt eksperimentu ierobežojumu dēļ. Bez tam, starpsugu konkurences pētījumi kontrolētos apstākļos ir veikti salīdzinoši maz, lai gan ir pamats uzskatīt, ka kopkultivācija izmaina augu atbildes reakciju uz dažādiem biotiskiem un abiotiskiem faktoriem.

Šajā darbā izvēlētās sugas ir tuvradnieciskas, pasaulē ekonomiski nozīmīgas lauksaimniecības tauriņziežu dzimtes sugas, kas veido simbiotiskas attiecības ar slāpekli fiksējošām baktērijām, kur viena - ložņu āboliņš *Trifolium repens* ir plaši izplatīta visā Latvijas teritorijā, bet otra – zemeņāboliņš (*Trifolium fragiferum*) – ir reti un salveidīgi sastopama, un ierakstīta Latvijas Sarkanās grāmatas pirmajā īpaši aizsargājamo sugu kategorijā.

Eksperimentā izmantoto augu sēklas ievāca Liepājas ezera krastā mitrā pļavā to dabiskajā piejūras augtenē, kur tās līdzās pastāvēja vienā augu sabiedrībā, un tās ietekmēja dažādi biotiski un abiotiski faktori, tādi kā N<sub>2</sub> fiksējošo gumiņbaktēriju simbioze, augsnes ķīmiskā sastāva heterogenitāte, periodiska applūšana ar iesāļu (Baltijas jūras) ūdeni, kas var ietekmēt starpsugu konkurenci dažādās sāls un applūšanas tolerances dēļ. Pēc literatūrā atrodamās informācijas zemeņāboliņš ir tolerantāks pret paaugstinātu NaCl koncentrāciju augsnē salīdzinot ar ložņu āboliņu, lai gan nav viena uzticama kritērija, pēc kura varētu noteikt izturīgākas vai mazāk izturīgas sugas pret sāls ietekmi vai varietātes. Turklāt slāpekli fiksējošajām baktērijām varētu būt nozīmīga loma sugu savstarpējā līdzāspastāvēšanā un konkurencē.

Darba mērķis ir noteikt, kā mainās divu āboliņa sugu reakcija uz augsnes sāļumu augu mijiedarbības un gumiņbaktēriju simbiozes ietekmē, kā arī noskaidrot, vai laboratorijas apstākļos var noteikt kritērijus, kurus varētu izmantot ekoloģiskajos pētījumos brīvā dabā.

Darba uzdevumi:

1. Noteikt, vai dažādu sugu kopkultivācija ietekmē to fizioloģiskās atbildes reakcijas uz gumiņbaktēriju simbiozi un augsnes sāļainumu.
2. Noskaidrot, vai baktēriju inokulanti ir sugu specifiski, un kā tie ietekmē auga atbildes reakcijas uz sāls inducētu stresu.
3. Aprobēt destruktīvu un nedestruktīvu metožu pielietošanu ekofizioloģijas pētījumos.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Jēdziens par retajām augu sugām

Bioloģiskās daudzveidības un augu saglabāšana uz Zemes, un tiem piemērotu biotopu aizsargāšana ir galvenais dabas aizsardzības uzdevums. Īpašu uzmanību velta tām sugām, kuru areālu izplatības robeža ir Latvija un Baltija, jo parasti pie areālu robežām sugu atradnes pakāpeniski izsīkst un sarūk līdz minimumam, kā arī ir mazāk sastopamas tās sugas, kas apdzīvo reti sastopamos biotopus (Andrušaitis 2003). Nelielām augu populācijām ir tendence izmirt, kas ir saistīta ar vairākiem cēloņiem, tādiem kā ģenētiskās variācijas samazināšanās ģenētiskā drifta dēļ, tuva radniecīgā krustošanās un pašapputeksnēšanās (Honnay & Jacquemyn 2007).

Latvijā retās sugas iedala piecās kategorijās, kuru saraksts ir apkopots Latvijas Sarkanajā grāmatā, taču tai nav juridiska spēka.

Ar 0. kategoriju apzīmē izzudušās sugas, kas nav konstatētas Latvijā pēdējos 50 gados, bet kuras, iespējams, vēl atrodas brīvā dabā, nebrīvē vai kā kultūraugi. Tām nepieciešama īpaša valsts veidota aizsardzības likumdošana.

1. kategorijā ietilpstošām sugām draud drīza iznīkšana, tās ir satopamas ļoti reti, un populāciju un indivīdu skaits samazinājies līdz kritiskai robežai. Sugas tālākai pastāvēšanai valsts teritorijā nepieciešama īpaša valsts aizsardzība. Pie šīs kategorijas pieder arī darbā izmantotā suga: zemeņu āboliņš.

2. kategorijā ietilpstošo sugu indivīdu skaits pakāpeniski samazinās. Šīs kategorijas sugām nepieciešams indivīdu skaita izmaiņu monitorings, kā arī valsts likumdošana to aizsardzībai.

3. kategorijai pieder retās sugas, kurām tuvākajā laikā nedraud izzušana, bet indivīdu skaits ir tik neliels, vai apdzīvo ierobežotas un specifiskas teritorijas, ka var ātri iznīkt, kā arī šīm sugām ir nepieciešama valsts likumdošanas aizsardzība.

4. kategorijas sugas ir maz izpētītas, tās, iespējams, var iznīkt, bet nepietiekamās informācijas dēļ nevar noteikt šo sugu stāvokli, līdz ar to ir nepieciešama papildus izpēte (Andrušaitis 2003).

## 1.2. Augsnes sāļums un tā fizioloģiskā ietekme

Augsnes sāļumu veido ūdenī izšķīdušo sāļu jonu koncentrācija augsnē. Jonus pēc lādiņa iedala anjonos un katjonos. Augsni par sāļainu uzskata, ja augsnes elektriskā vadītspēja ir

vienāda vai lielāka par 4 dS/m, kas ir aptuveni līdzvērtīgi 40 mM NaCl, kā arī rada 0,2 MPa lielu osmotisko spiedienu (Munns & Tester 2008).

Paaugstināts sāls daudzums augsnē izraisa dažādas augu atbildes reakcijas, kuras ietekmē tas, cik ilgi augs ir pakļauts šiem apstākļiem, kā arī, cik liela ir sāls koncentrācija (Munns & Tester et al. 2008). Pārāk lielai sāls koncentrācijai augsnē ir divas galvenās augu nelabvēlīgi ietekmējošās sekas: augsnē palielinās osmotiskais potenciāls, līdz ar to ir apgrūtināta ūdens un barības vielu uzņemšana, otra ir tiešs  $\text{Na}^+$  un  $\text{Cl}^-$  izraisīts toksiskums, kas sākas, kad vecajās lapās uzkrājas joni, sasniedzot toksisku līmeni (Munns & Tester et al. 2008). Vairumam sugu  $\text{Na}^+$  ātrāk nekā  $\text{Cl}^-$  sasniedz toksisko līmeni (Storey & Walker 1999). NaCl ietekmē auga metabolismu (Munns & Tester et al. 2008, Staudinger et al. 2012, cit. pēc Bennani & Bendaou 2014). Visiem augiem piemīt spēja zināmā līmenī regulēt NaCl uzņemšanu, kā arī uzņemt jonus, kas parasti augsnē ir zemākā koncentrācijā, piemēram,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ; vienīgi dažādām augu sugām ir atšķirības, cik lielā sāls koncentrācijā tie spēj augt (Munns 2005). Auga saknes nepieļauj  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  uzņemšanu kopā ar ūdeni līdz zināmai sāls koncentrācijai augsnē (Munns 2005), pēc kuras pārsniegšanas rodas  $\text{Na}^+$  un  $\text{Cl}^-$  inducētās izmaiņas gēnu ekspresijā (Sanchez et al. 2008)

Pirmā izteiktā auga atbildes reakcija uz paaugstinātu augsnes sāļainumu ir atvārsnīšu atvēruma samazināšanās, kam seko lokāla abscizskābes sintēze, pēc tam samazinās transpirācijas līmenis, bet ar laiku abscizskābes līmenis samazinās līdz sākotnējam (Fricke et al. 2004), kā arī samazinās enerģiju patērējošo bioķīmisko ceļu aktivitāte (Burg et al. cit. pēc Manchada & Greg 2008), bet pētījumā ar *Arabidopsis* norāda, ka pirmā atbildes reakcija uz palielinātu  $\text{Na}^+$  koncentrāciju ap saknēm ir paaugstināta  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrācija sakņu citoplazmā (Kiegle et al. 2000). Saknes ārējās šūnas daļu  $\text{Na}^+$  uzreiz izvada atpakaļ ārā caur plazmatiskās membrānas  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  transportieriem (Tester & Davenport 2003).

Osmotiskā spiediena pieaugums augsnē izraisa pārejošu augu šūnu tilpuma samazināšanos zaudētā ūdens dēļ, bet ar laiku šūnas atgūst savu tilpumu (Yeo et al. 1999., Passioura & Munns 2000, Fricke & Peters 2002). Tādēļ augu augšanas ātruma samazināšanos var iedalīt divās fāzēs. Pirmā ir osmotiskā spiediena izraisīta, kas sākas, tiklīdz sāls koncentrācija pārsniedz kritisko robežu, lielākajai daļai augu tā ir aptuveni 40 mM NaCl (Munns & Tester et al. 2008), kā rezultātā palēninās auga augšana, jo augam resursi jāpatērē homeostāzes uzturēšanā (Manchanda & Garg 2008), piemēram, lai sintezētu ar līdzvērtīgu osmotisko potenciālu organiskos savienojums, ir nepieciešams par kārtu lielāks skaits ATF molekulu (Raven 1985).

Laika gaitā ir veikti samērā daudzi pētījumi, kas norāda, ka sāls ietekmē samazinās augu augšana, piemēram, dažādām āboliņu sugām augsnes sāļums būtiski samazina virszemes vasas sauso masu (Galloway et al. 2010, Ballhorn & Elias 2014, Bennani & Bendaou 2014). Zemeņāboliņa augi izaug būtiski mazāki, īsāki, to sausā masa ir mazāka (Rumbaugh et al. 1993), un vislielākais sausās masas kritums ir lapu kātu sausajai masai (Wang et al. 2010). Augsnes sāļums negatīvi ietekmē arī fotosintēzi un transpirāciju (Poorter et al. 2012), jo samazinās lapu skaits un to laukums (Manchanda & Garg 2008, Bennani & Bendaou 2014). Viens no iemesliem, kādēļ samazinās augu lapu augšana, varētu būt izmaiņas šūnapvalka sastāvā (Cramer & Bowman 1991). Sāls ietekme saīsina lapu dzīves ilgumu un negatīvi ietekmē pašu fotosintēzi un transpirāciju. Fotosintēzes aktivitātes samazināšanās veicina aktīvo skābekļa formu veidošanos, ko izraisa ierobežota CO<sub>2</sub> fiksācija, kuru samazina tādi faktori kā sausums, sāls un temperatūras izraisītais stress (Manchanda & Garg 2008).

Daļa augu pie paaugstināta sāļuma uzkrāj dažādus stresa metabolītus, kas nodrošina lielāku izturību. Augi sintezē un satur dažādus organiskos savienojumus, piemēram, dažādus cukurus, betaīnus, aminoskābes, no kuriem daļa uzkrājas augā, ja augsnē pieaug sāls koncentrācija, bet šis process ir augu sugām specifisks. Organiskie savienojumi sāls stresa apstākļos palīdz nodrošināt nepieciešamo osmotisko balansu (White et al. 2014). Pieaugot osmotiskajam potenciālam augsnē, palielinās lipīdu peroksidācija (Gomez et al. 1999), uz ko norāda ar tobarbiturskābi reaģējošo savienojumu (TBARS) koncentrācijas pieaugums, kā arī palielinās gvajakola peroksidāzes aktivitāte, piemēram, *Cucumis sativus* (Zhu et al. 2004), ložņu āboliņa lapās (Wang et al. 2011), kviešiem (Sairam & Srivastava 2002). Sāls ietekmē uzkrājas tādi atbildes reakciju metabolīti kā serīns, treonīns un ononitols (Sanchez et al. 2011), prolīns (Kant et al. 2006), kas ļauj šūnās palielināt osmolaritāti. Piemēram miežu sakņu uzmavā ir konstatēti prolīna specifiski transportieri, kurus inducē sāls izraisītais stress (Verslues & Sharma 2010, White et al. 2014), bet samazinās organisko skābju, tādu kā citronskābe, sukcināta, malāta un treonāta līmenis (Sanchez et al. 2011). Augam ir nepieciešama enerģija, lai varētu sintezēt nepieciešamos organiskos savienojumus, kas var attiecīgi negatīvi ietekmēt auga augšanu (Raven 1985).

Augu antioksidatīvā sistēma sastāv no karotinoīdiem – askorbāta, glutaciona, tokoferola un enzīmiem, kā superoksīda dismutāzes, katalāzēm, glutaciona peroksidāzes, askorbāta peroksidāzes un citiem (Jimenez et al. 1997). Askorbāts un glutations ir būtiski neenzimātiski organiskie savienojumi, kas pasargā augu no oksidatīvā stresa. Askorbāts reaģē ar O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH<sup>-</sup> (Mehlhorn et al. 1996), glutations reaģē ar O<sub>2</sub> aktīvo formu un ar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un funkcionē kā antioksidants un redox potenciāla regulators (Logan 2008, Wang et al. 2011). Arī mannitols

pasargā hloroplastus pret paaugstinātu sāls daudzumu (Munns & Tester 2008). Sāls ietekmē palielinās arī polifenolu oksidāzes reakcijas aktivitāte, jo tā ir viena no atbildes reakcijām uz biotisku un abiotisko stresu (Dixon & Paiva 1995).

Ir dažas tauriņziežu sugas, kas ir ļoti jutīgas pret sāli, bet tajā pašā laikā ir ļoti izturīgas augu sugas, piemēram, *Atriplex* spp., kas aug augsnes sāļumā, kas ir lielāks pat par jūras ūdens sāļumu (Flowers et al. 1977). Viens no iemesliem mazākai sāls izturībai varētu būt zemāka aktivitāte un eksperesija superoksīda dismutāzes un H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sadalošajiem enzīmiem, kā arī mazākā līmenī inducēta glutationa reduktāze un askorbāta peroksidāze, kā rezultātā pieaug oksidatīvais stress, par ko liecina paaugstinātā H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> un TBARS koncentrācija un samazināta hlorofila koncentrācija (Sairam & Srivastava 2002, Agarawaland & Pandey 2004). Ir noteikts, ka pastāv negatīva korelācija starp Cl<sup>-</sup> koncentrāciju dzinumos un sāls toleranci tauriņziežiem (Sanchez et al. 2011) un ložņu āboliņa jaunajās lapās Cl<sup>-</sup> koncentrācija ir būtiski mazāka, nekā lapu kātos vai jau izaugušās lapās (Rogers et al. 1997). Zemeņu āboliņam paaugstināta Na un Cl satura apstākļos augsnē rodas Ca, Zn, un Cu uzkrāšanās, bet samazinās Mn un Fe uzkrāšanās lapās (Karlsons 2012). Atklāts arī, ka ložņu āboliņa apstrāde ar sāli palielina cianogēnēzes potenciālu, kas ir vairāk zināms, kā viens no aizsardzības mehānismiem pret zālēdājiem (Ballhorn & Elians 2014). Sāls izturības atšķirības starp tuvām radniecīgām sugām var skaidrot ar atšķirīgu spēju ieslēgt nevēlamos jonus vakuolās (Staal 1991, Sairam & Srivastava 2002).

Vairākām sugām ir konstatētas sāls tolerantas populācijas ar pielāgotu genotipu, kas atļauj augt, piemēram, piekrastes zonās. Šīs populācijas uztur salīdzinoši augstu Na<sup>+</sup> un Cl<sup>-</sup> koncentrāciju saknēs un dzinumos vecajās lapās, līdz ar to, uzturot zemāku Na<sup>+</sup> un Cl<sup>-</sup> koncentrāciju aktīvi augošajās jaunajās lapās un meristēmās (Rogers et al. 1997). Bez tam, lipīdu peroksidācija var atšķirties starp šādām populācijām, piemēram, nelielas sāls koncentrācijas apstākļos palielinās augu biomasas pieaugums un samazinās TBARS koncentrācija, bet otras populācijas pārstāvjiem tai pat laikā novērojams tieši pretējs efekts, līdz ar to samazināta TBARS koncentrācija var norādīt, ka augi ir labāk pielāgojušies paaugstinātai sāls koncentrācijai augsnē (Ksouri et al. 2007).

Paaugstinātā sāls koncentrācija var izraisīt agrāku ziedēšanu un samazinātu ziedu skaitu (Muuns & Tester 2008).

### 1.3. Gumiņbaktēriju simbiozes nozīme augu adaptācijā

Rizobijas ir augsnes gram-negatīvu gaisa slāpekli fiksējošu baktēriju grupa, kas var iemānot noteiktu tauriņziežu sugu saknēs, kā rezultātā veidojas simbiotiskas struktūras,

gumiņi. Aprēķini parāda, ka tās veido simbiotiskas attiecības ar 15 000 tauriņziežu sugām (Marcel et al. 2006), kur tās eksistē kā daļēji iekšūnu simbionti, kas pārveido gaisa slāpekli augiem pieejamajā amonijā, bet pretī iegūst augu sintezētās organiskās skābes un citus savienojumus (Perret et al. 2000, Maj et al 2009). Dažādiem rizobiju celmiem var krasi atšķirties augu sugu skaits, kuru saknes tās spēj apdzīvot, piemēram, *Rhizobium* sp. celms NGR234 veido simbiotiskas attiecības ar 122 krustziežu ģintīm (Pueppke & Broughton 1999), bet *Rhizobium leguminosarum* varietāte *trifolii* veido gumiņus tikai ar āboliņu ģints sugām (Denarie et al. 1992). Lielākoties savstarpējā mijiedarbība starp augu un baktēriju nenotiek, jo organismi neatpazīst viens otra signālsavienojumus, taču ir gadījumi, kad izveidojas gumiņš, bet tur neiedzīvojas baktērijas, vai arī tās nespēj fiksēt slāpekli (Greenwood 1964 cit. pēc Miller et al. 2007). Simbioze starp organismiem ir specifiska, un baktērijas, kas veido simbiozi ar āboliņiem, ir normāla augsnes mikrobioma sastāvdaļa, un simbiozi veido viskonkurētspējīgākais celms vai biovari. Augsnē ir plaši sastopami dažādi *Rhizobium leguminosarum* biovari *trifolii* (Svenning et al. 2001). Daļa veikto pētījumu norāda, ka *Trifolium repens* izolāti ir sugu specifiski, un veido gumiņus šai sugai specifiski (Marcel et al. 2006), bet citu tauriņziežu sugu izolāti veido gumus dažādām sugām (Marcel et al. 2006).

Baktērijas un tās saimniekauga specifiskums definējas simbiozes attīstības sākuma posmā, kad notiek savstarpējā dažādu ķīmisku signālu savienojumu sintēze un uztvere (Jane et al. 1985). Vairāki pētījumi liecina, ka gumiņu veidošanās ir strikti specifisks daudzpakāpju process, kas ietver savstarpēju signālvielu sūtīšanu un uztveršanu starp baktērijām un augu. Vispirms augs izdala specifiskas signālmolekulas – flavonoīdus, un baktērijas sintezē signālvielas lipohitooligosaharīdus (LCOs), kuras dēvē par Nod faktoriem (Maj et al. 2009). Savstarpējā signālu apmaiņa izraisa atbildes ķēdes reakciju auga sakņu epidermas, mizas un pericikla šūnās, kā rezultātā sāk veidoties gumiņi (Heidstra & Bisseling 1996). Gumiņā baktērijas modificējas endosimbiotiskajā formā, kur sāk fiksēt un pārveidot gaisa slāpekli augam izmantojamajā amonija formā (Jones et al. 2007).

Arī starp dažādiem rizobiju celmiem notiek savstarpēja konkurence, līdz ar to simbiotiskās attiecības var veidoties nevis ar visefektīvāk slāpekli fiksējošo, bet gan ar to celmu, kas labāk pielāgojies konkrētajai situācijai (Maj et al. 2010), piemēram, dažādu rizobiju infekciozitāte un efektivitāte ložņu āboliņam savstarpēji nekorelē (Chanway et al. 1985).

Slāpekli fiksējošās rizobiju baktērijas ir viens no noteicošajiem faktoriem augu sabiedrības struktūras un bioloģiskās dažādības veidošanā. Vairāki pētījumi parāda, ka daļa

tauriņziežu sugu ir tieši atkarīgas no simbiotisko baktēriju fiksētā slāpekļa gan brīvā dabā, gan eksperimentālos apstākļos (Marcel et al. 2006). Slāpekli fiksējošās rizobijas var palielināt augu produktivitāti, spēju saistīt slāpekli, kā arī veicina tauriņziežu izdzīvošanu pļavās. Augu sabiedrību struktūru nosaka dažādi faktori: minerālelementu pietiekamība un pieejamība, klimatiskie apstākļi, vēsturiskie apstākļi, noganīšanās, augsnes uzbūve, tās sastāvs, kā arī organismu savstarpējās attiecības ekosistēmās. Slāpekļa nodrošinājuma veicinātā tauriņziežu augšana maina augu savstarpējo konkurenci (Marcel et al 2006). Bieži vien augsnē vietās, kur iepriekš auguši āboliņi, ir daudzveidīgas simbiotisko baktēriju *Rhizobium leguminosarum* biovari *trifolii* celmu populācijas, kuras var inficēt un izraisīt gumiņu veidošanos. Šīs kopējās simbiozes spēja saistīt slāpekli var krasi atšķirties robežās no 10 līdz 130 %, atkarībā no tā, cik efektīva ir saimniekorganisma un attiecīgā celma kombinācija (Melino et al. 2012).

Viens no veidiem, kā rizobijas ietekmē augu sabiedrības, ir palielinātā simbiotā augu produktivitāte, līdz ar to arī augšana. Pētījumi parāda, ka inokulācija ar rizobiju baktērijām būtiski palielina ložņu āboliņa un citu tauriņziežu biomasu, salīdzinot ar augiem, kuri auguši augsnē bez šīm baktērijām (Svenning et al. 2001, Melino et al. 2012), kā arī lielāku biomasu ieguva tie augi, kas bija inokulēti ar dažādu *Rhizobium* maisījumu (Svenning et al. 2001). Turklāt ir konstatēta pozitīva korelācija starp auga un kopējo gumiņu masu, bet nav būtiskas korelācijas starp gumiņu skaitu un slāpekli auga saknēs, kā arī korelācija starp gumiņu skaitu un auga masu ir maznozīmīga. (Melino et al. 2012).

Rizobiju ietekmē novēro agrāku ziedu attīstību, kā arī virszemes daļās ir novērots, ka slāpekļa daudzums tauriņziežiem inokulētos variantos ir būtiski augstāks nekā kontroles augiem. Pētījumi ar slāpekļa izotopiem parāda, ka bez baktērijām tauriņzieži izmanto tos pašus slāpekļa avotus, ko pārējie augi, bet simbiozes ar rizobijām rezultātā pat 97% no patērētā slāpekļa var būt tieši baktēriju saistītais (Marcel et al. 2006).

Sāļainās augsnēs samazinās uz saknēm veidojošos gumiņu skaits un to masa, kā arī samazinās nitrogenāzes efektivitāte (Manchada & Garg 2008). Pētījumi parāda, ka sāls stress negatīvi ietekmē simbiotisko sistēmu spēju augā uzņemt slāpekli tādiem augiem kā *Glycine javanica*, sojas pupiņa un sējas lucerna (Berstein & Ogata 1966), bet gumiņi satur neliela izmēra molekulas, kas var funkcionēt kā aktīvo skābekļa formu neitralizētāji, līdz ar to mazināt NaCl radīto negatīvo ietekmi (Comba et al. 1998).

#### **1.4. Sugu mijiedarbība: konkurence un veicināšana**

Augu savstarpējā konkurence nosaka floras bioloģisko daudzveidību un konkrēto sugu populācijas lielumu konkrētajā dzīvotnē, kā arī lauksaimniecības zemēs ietekmē potenciāli

iespējamo ražu. Augam vispirms ir jānosaka apkārtesošie konkurenti, lai varētu veikt iespējamās atbildes reakcijas, to var panākt uztverot dažādus signālus, kā gaismas intensitātes un spektra izmaiņas, augsnes minerālelementu sastāva izmaiņas, šķīstošo sakņu izdalījumu un gaistošo savienojumu uztvere, un atbildes reakcijas var būt dažādas, piemēram, izvairīšanās no ēnas, sakņu sazarošanās un augšanas virziena maiņa un alelopātija. (Pierik et al. 2013). Vietās ar lielu apaugumu samazinās sarkanās gaismas un sarkanās gaismas viļņa garums 700-800 nm diapazonā (F/FR), ko uztver fitohroma fotoreceptori, kā rezultātā tiek stimulēti augšanu veicinošie gēni (Pierik et al. 2013).

Augu sabiedrību veidošanās ekoloģijā viena no nozīmīgākajām tēmām ir augu savstarpējās mijiedarbības nozīme, kas nodrošina to līdzās pastāvēšanu (Bruno et al. 2003). Dabiski veidojušās augu sabiedrībās pastāv abpusēji izdevīgas attiecības, un tās arī uzskata par vienu no galvenajiem ekosistēmas attīstības virzītājspēkiem (Bruno et al. 2003. cit. pēc Naestre & Cortina 2004). Teorētiskie modeļi norāda, ka savstarpējā konkurence un ietekme mainās apgriezti proporcionāli abiotisko faktoru izraisītajam stresa gradientam (Naestre & Cortina 2004).

Mijiedarbība un savstarpējā ietekme starp sugām var būt intensīva, vāja vai principā nepastāvēt, jo sugas atšķiras gan pēc to morfoloģijas gan tām nepieciešamo resursu patēriņa (Armas & Pugnaire 2011), piemēram, dzīvotnēs ar lielāku starp sugu konkurenci *A. petiolata* izdala vairāk toksiskus alelopātsiskus savienojumu (Lankau 2012).. Savstarpējā augu sakņu mijiedarbība ietekmē augsnē pieejamo elementu pieejamību. To var uzlabot gan samazināt, un augsnes resursu samazināšanos parasti uzskata par galveno mehānismu, kas nosaka vai augu saknes savstarpēji konkurē (Armas & Pugnaire 2011) Piemēram, pētījumi parāda, ka ložņu āboliņš var izdalīt augsnē slāpekli, un to atkal uzņemt cits augs (Ayres et al. 2007). Saknes var tieši bremsēt vai inhibēt cita auga sakņu augšanu, tās var izvairīties no citām saknēm vai to ietekmē intensīvāk augt un zaroties, kā arī auga atbildes reakcija var mainīties vai saknes sastopas ar savām vai cita auga saknēm (Armas & Pugnaire 2011), jo augi spēja atšķirt savas saknes no cita auga saknēm, kas var būt viens no faktoriem, kas tieši ietekmē konkurenci pār augšanai nepieciešamajiem resursiem (Chen et al. 2012), līdz ar to saknes cenšas augsnē izplatīties straujāk, ja tajā sastopamas citu augu saknes (Kroon 2007), ko apliecina arī pētījumi kontrolētos apstākļos (Chen et al. 2012).

Apkārtējā vidē augi sintezē un izdala ķīmiskus savienojumus, kas var ietekmēt tuvumā augošos augus līdz ar to noris alelopātijas process. Šiem ķīmiskajiem savienojumiem ir arī citas ekoloģiskās funkcijas tādas kā helātu savienojumu veidošana, auga aizsargāšana un augsnes mikrobiomas ietekmēšana, kā rezultātā mainās arī augsnes auglība (Wardle et al.

2011). Apkārtējās vides biotiskie un abiotiskie faktori nosaka ķīmisko savienojumu potenciālo alelopātisko ietekmi (Wardle et al. 2011). Šobrīd ir gūti pietiekoši daudz pierādījumu, kas apliecina tiešu inhibējošu ietekmi dažādiem sakņu izdalījumu ķīmiskajiem savienojumiem (Wardle et al. 2011). Viens no iemesliem, kas inducē alelopātisku savienojumu sintēzi ir zema barības vielu koncentrācija audos, kā cēlonis ir zems minerālelementu līmenis vai pieejamība augsnē, piemēram, dzelzs trūkuma apstākļos *Centaurea diffusa* izdala savienojumu 8-hidroksi krinolīnu (8HQ), kas atvieglo dzelzs uzņemšanu (Tharayil et al. 2009).

Augu sakņu izdalītie dažādi ķīmiskie savienojumi ietekmē augsnes mikrobiomu, veicina simbiotiskās attiecības un maina augsnes ķīmiskās īpašības (Walker et al. 2003). Augi ar dažādiem sakņu izdalījumiem var mainīt augsnes fizikālās un ķīmiskās īpašības, piemēram, pārveidot tās struktūru, veicināt mikroelementu pieejamību vai arī ietvert tos helātu savienojumos (Weidenhamer & Callaway 2010). Piemēram, pētījums ar 10 dažādām daudzgadīgām sugām kontrolētos apstākļos, norādīja, ka mijiedarbība starp vienas sugas pārstāvju saknēm augšanu neietekmē vai ietekmē negatīvi, bet starp dažādām sugām šī mijiedarbība plaši variēja sākot ar pozitīvu ietekmi līdz strikti negatīvai. Ir sugas kuras kopā audzējot vienmēr kavē otra auga augšanu, bet tai pat laikā ir sugas, kuru ietekme variē no tā, kāda suga tai aug blakus, un no tā izrietošā ietekme var būt strikti konkurējoša, neitrāla vai pat augšanas veicinoša, līdz ar to pastāv sugu savstarpēji specifiskas mijiedarbības (Armas & Pugnaire 2011). Pētījumā par ASV Dienvidu mitrājos augošajām daudzgadīgām augu sugām norāda, ka barība vielu papildus pievade izmaina augu savstarpējo konkurējošo mijiedarbību. Sugu savstarpējā konkurētspēja mainās pie dažādām minerālelementu daudzuma un pieejamības pakāpēm, it sevišķi ja sugām ir izteikti konkurējoša sakņu sistēma, bet nekonkurē augsnes virszemes daļas. Skarbi apkārtējās vides apstākļi sniedz patvērumu sugām, kuras citām sugām labvēlīgākās dzīvotnēs nespētu konkurēt un pastāvēt (Emery et al. 2001).

Daudz sugu līdzās pastāv bez acīmredzamiem pielāgojumiem specifiskai ekoloģiskajai nišai (Tharpe et al. 2011). Ģenētiski nošķirtas populācijas var adaptēties vietējiem vides apstākļiem (White et al. 2014).

Pētījums par zemeņu un ložņu āboliņu norāda, ka audzējot kopā šīs divas sugas ložņu āboliņu sausā masa pieauga, bet zemeņu āboliņa samazinājās salīdzinājumā, ja šos augus audzē atsevišķi, kā arī ložņu āboliņam attīstās ātrāk kopējais lapu laukums (Harper & Catworthy 1963), un ir gūti apliecinājumi, ka augu simbioze ar rizobijām var dažādi ietekmēt savu saimniekaugu un apkārt esošos citus augus (Chanway et al. 1985). Ar laiku augu sabiedrībās var notikt elementu pārnese, piemēram pētījumā laboratorijas apstākļos slāpekļa

koncentrācija starp dažādu augu sugām izlīdzinājās pēc astoņiem mēnešiem (Marcel et al. 2006). Ir novērots, ka ilglaicīgās pļavās *Trifolium repens* sadalās vairākās mazās subpopulācijās, kur katra pielāgojas tai blakus augošajām graudzāļu sugām (Turkington & Harper 1979. cit. pēc Chanway et al. 1989). Līdz ar to vislielāko kopējo *Trifolium* biomasas iznākuma panāca, audzējot attiecīgos āboliņus kopā ar tiem aireņu genotipiem, ar kuriem tie jau bija līdzās auguši (Aarssen & Turkington 1985).

Invazīvie augi spēj ietekmēt vietējo augu fizioloģisko stāvokli (Leger & Espeland 2010), un daļa izmanto alelopātijas mehānismus, lai izkonkurētu vietējās sugas (Wardle et al. 2011).

## 2. MATERIĀLI UN METODES

Eksperimentu veica Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātē, Augu fizioloģijas katedrā no 2016. gada augusta līdz 2017. gada aprīlim. Darbu izstrādāja Valsts pētījumu programmas EVIDEnT ietvaros.

### 2.1. Pētījumā izmantoto sugu raksturojums

#### 2.1.1. Zemeņāboliņš

Zemeņāboliņš (*Trifolium fragiferum*) ir daudzgadīgs, 5-15 cm garš tauriņziežu dzimtas lakstaugs, tā stublājs ir ložņājošs, mezglos sakņojas. *T. fragiferum* lapas ir trīslapiņu saliktas, ziedkopa izkārtota blīvā galviņā iesārtā vai baltā krāsā (Priedītis 2014), kam raksturīga rizobiālā simbioze, tās rezultātā augs primāri iegūst no gaisa saistīto slāpekli, kā arī šai sugai ir raksturīga mērena sāls izturība (Gauche & Magistad 1943, Mass 1984 cit. pēc Rumbaugh et al. 1993, Nienartowicz & Wilkon-Michalska 1993), tādēļ šī ir nozīmīga ganību suga iesāļās augsnēs (Rumbaugh et al. 1993). Sēklām, lai pārtrauktu miera periodu, nepieciešama skarifikācija (Rumbaugh et al. 1993).

Sastopamas divas varietātes Eirāzijā un Ziemeļamerikā. Eiropā nodala divas pasugas, viena lokalizēta Eiropas dienvidos, otra ziemeļos, tai skaitā Latvijā. Latvijā šī suga ir izplatīta reti un salveidīgi (1. attēls), jo Latvija atrodas pie sugas ziemeļu izplatības robežas, un ir sastopama Rīgas līča un Baltijas jūras piekrastē (Priedītis 2014).



1. attēls. Zemeņu āboliņa izplatība (Priedītis 2014)

Latvijā zemeņu āboliņš apdzīvo mitras vai mēreni sausas piejūras pļavas, kā arī piejūras ezeru un upju grīvu pļavas. Latvijā dažviet raksturīga kodominance vai dominance piejūras augu sabiedrībās (Priedītis 2014). Aizsargājamajās dabas teritorijās “Liepājas ezers” suga konstatēta no 1898. gada (Andrušaitis 2003).

Šī suga ir ierakstīta Latvijas Sarkanās grāmatas 1. kategorijā (Priedītis 2014).

### 2.1.2. Ložņu āboliņš

Ložņu āboliņš (*Trifolium repens*) ir daudzgadīgs, 10-30 cm garš tauriņziežu dzimtas lakstaugs, tā stublājs ir guļošs un ložņājošs. Sugas raksturīga pazīme ir balts sirpjveidīgs plankums uz lapiņām. Ziedkopa veido blīvu galviņu baltā krāsā, un ir izteikti pacēlusies virs lapojuma (Priedītis 2014).

Šī suga ir plaši izplatīta visā pasaulē, kosmopolītisks augs (Priedītis 2014) ar ļoti plašu areālu un vairākām pasugām, kuras pielāgojušās konkrētajiem klimatiskajiem apstākļiem. Tā izplatību ir veicinājusi lopkopības attīstība (Carlson et al. 1985 cit. pēc Svenning et al. 2001). Šis ir ļoti nozīmīgs lauksaimniecības augs vēsākās klimata zonās, tā augstās uzturvērtības un slāpekļa piesaistes veicināšanas dēļ (Svenning et al. 2001., Wang et al. 2010, Whang et al. 2011) tas spēj simbiozē ar rizobijām palielināt slāpekļa daudzumu augsnē par 300 kg ha<sup>-1</sup> gada laikā (Evans et al. 1985 cit. pēc Chanway et al 1989, Ledgard & Steele 1992), kā arī šo augu ļoti plaši izmanto ganībās siltākos reģionos, piemēram, Vidusjūras un Āzijas reģionā, Āfrikas Dienvidu daļā, Dienvidamerikā, Austrālijā un Jaunzēlandē (Ballhorn & Elias 2014). Bieži vien šī suga ietilpst pilsētas zālāju augu sabiedrībās (Cekstere et al. 2015).

Latvijā ložņu āboliņš ir izplatīts visā tās teritorijā (2. attēls). Sastopams gan blīvās audzēs, gan atsevišķi, tādos biotopos kā pļavās, atmatās, zālajos, ceļmalās, savukārt krūmājos un skrajos mežos retāk (Priedītis 2014).



2. attēls. Ložņu āboliņa izplatība

Lai gan pāris pētījumi parāda, ka dažām piekrastes ložņu āboliņa populācijām nosacīti piemīt sāls tolerance, šo sugu neuzskata par sāls izturīgu (Rogers et al. 1993, Rogers et al. 1997 cit. pēc White et al. 2014).

Morfoloģiski līdzīgs ar *T. fragiferum* (Priedītis 2014).

## **2.2. Sēklu ievākšana, diedzēšana un izejmateriāla audzēšana**

Sēklas ievāca 2016. gada augusta beigās, mitrā pļavā Liepājas ezera krastā, ko periodiski pārskalo iesāļš Baltijas jūras ūdens, kur gan ložņu āboliņš, gan zemeņāboliņš satopams vienā augu sabiedrībā. Pēc ievākšanas tās glabāja ledusskapī 4 °C temperatūrā.

Katras sugas sēklas diedzēja atsevišķos caurspīdīgos, aizveramos konteineros, kurus vispirms dezinficēja ar 96% etanolu un 15 minūtes apstaroja ar ultravioleto starojumu, iepriekš autoklāvētā (2 h 121 °C) aptuveni 1 cm biezā Biolan dārzkopības augsnes slānī, kas bija sajaukts ar autoklāvētu dejonizētu ūdeni. Diedzēšanas laikā nodrošināja 16 h ilgu fotoperiodu.

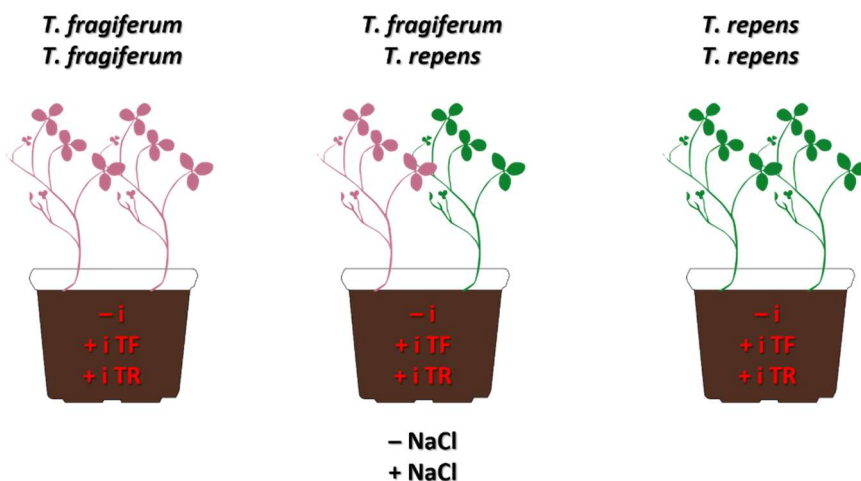
Diedzētos augus pārstādīja, kad tiem bija attīstījušās divas īstās lapas, 200 ml lielos plastmasas veģetācijas konteineros, kas pirms tam bija karsēti 24 h 60 °C temperatūrā. Konteinerus pildīja ar autoklāvētu Biolan dārzkopības melnzemi, kas bija sajaukta ar autoklāvētu ūdeni, attiecībā 2 l augsnes pret 400 ml ūdens. Veģetācijas konteinerus izkārtāja ar 96% etanolu dezinficētos un ultravioleto starojumu apstarotos aizveramos caurspīdīgas plastmasas traukos, kurus novietoja Latvijas Universitātes Dabaszinātņu akadēmiskā centra siltumnīcā, kas nodrošināja augšanai labvēlīgus apstākļus: 16:8 h (gaismas : tumsas) periodu, 20:15 °C (diena:nakts), gaisa mitrumu 70%. Augus laistīja ar dejonizētu ūdeni pēc nepieciešamības.

## **2.3. Eksperimentu iekārtošana, uzturēšana un novākšana**

Pēc trīs nedēļu augšanas augus pa diviem pārstādīja 1 l plastmasas veģetācijas traukos trīs variantos: zemeņāboliņu ar zemeņāboliņu, ložņu āboliņu ar zemeņāboliņu un ložņu āboliņu ar ložņu āboliņu, katram veģetācijas variantam atvēlot 30 traukus.

Iegūtos veģetācijas traukus sadalīja trīs variantos, atkarībā no tā, ar kādu rizobiju inokulantu tos apstrādāja. Rizobiju inokulantu ieguva no savvaļā ievāktiem augiem, kas auga turpat, kur ievāca sēklas. Auga saknes sterilizēja 50% hipohlorīda (ACE) šķīdumā 15 minūtes. Tālāk saknes skaloja četras reizes ar dejonizētu ūdeni, un pēc tam atdalīja sakņu gumiņus un saberza pietā ar 600 ml sterila dejonizēta ūdens. Katram attiecīgajam variantam pievienoja 18 ml konkrētā inokulanta izkļaidus sešās dažādās veģetācijas trauka vietās, un kontroles variantam inokulantu nepievienoja, beigās iegūstot trīs inokulanta variantus: ar zemeņāboliņa rizobijām apstrādātu (+iTF), ar ložņu āboliņa rizobijām apstrādātu (+iTR), un kontroles variantu (-i).

Pirms NaCl apstrādes sākšanas augiem ļāva divas nedēļas nostabilizēties. Pēc tam iegūtos deviņus veģetācijas un inokulanta variantus sadalīja divās daļās, kur vienai uzsāka iknedēļas apstrādi ar 50 mL NaCl šķīdumu. NaCl šķīduma koncentrāciju pakāpeniski palielināja, pirmajā nedēļā apstrādājot ar 25 mM NaCl šķīdumu, bet nākamajās nedēļās koncentrāciju palielinot attiecīgi: 50, 100, 200, 300 un 400 mM NaCl. Līdz ar to kopā ieguva 18 dažādus variantus, katrā variantā pa pieciem veģetācijas traukiem un desmit augiem, kas savstarpēji atšķirās gan pēc kopkultivācijas, gan izmantotā inokulanta un NaCl apstrādes (3. attēls).



3. attēls. Eksperimentā izmantoto variantu veidi

Dažādos variantus izkārtēja pēc randomizācijas principa LU Dabaszinātņu akadēmiskā centra siltumnīcā, kur nodrošināja 16:8 (dienas:nakts fotoperiodu) un 20/15 °C temperatūras režīmu, gaisa mitrums bija 70%. Augus laistīja ar attīrītu siltumnīcas augiem paredzētu ūdeni, kā arī mēsloja reizi divās nedēļās ar zaļo kristalonu (koncentrācija 150 g l<sup>-1</sup>, paredzēts jauniem augiem), kuru ņēma 5 ml l<sup>-1</sup> ūdens un katru veģetācijas trauku laistīja ar 120 ml šāda mēslojuma šķīduma.

Eksperimentu novāca devītajā nedēļā pēc tā uzsākšanas. Vispirms paņēma nepieciešamo materiālu tālākajām analīzēm. Pēc tam augus nogriezta nedaudz virs augsnes līmeņa, un katru augu atsevišķi atdalīja. Pēc randomizācijas principa izvēlējās divus veģetācijas traukus no katra varianta, kuriem katru augu sadalīja četrās komponentēs – staloni, lapu kāti, lapu plātnes, ziedi. Katru komponenti nosvēra atsevišķi un aprēķināja kopējo svaigo masu. Visiem augiem noteica svaigo masu, pēc tam tos ietina papīrā un žāvēja 60 °C 4 8h, pēc izžāvēšanas noteica katra auga sauso kopējo masu.

## 2.4. Mērījumu veikšana

### 2.4.1. Fluorescences un hlorofila koncentrācijas noteikšana

Katru nedēļu pēc apstrādes ar NaCl uzsākšanas reizi nedēļā no pulksten astoņiem līdz divpadsmitiem noteica hlorofila *a* fluorescenci un hlorofila koncentrāciju. Pēc randomizācijas principa izvēlējās no katra varianta trīs veģetācijas traukus, kur katram augam veica trīs mērījumus.

Hlorofila *a* fluorescenci noteica ar Handy-PEA (Hansatech) portatīvo fluorescences mērītāju, lai noteiktu fotosistēmas II aktivitāti. Izvēlējās trīs nobriedušas lapas, kuras pirms mērījumu veikšanas aptumšoja 30 minūtes ar speciāli tam paredzētiem klipšiem. Iegūtos rezultātus analizēja ar ražotāja nodrošināto programatūru PEA Plus (Hansatech, Lielbritānija), un aprēķināja PI (*Performance index*), kas sastāv no trim komponentēm: reakcijas centru daudzuma uz vienu antenas hlorofila molekulu, primārās fotoķīmiskās reakcijas kvantu iznākuma, un efektivitātes, ar kādu eksitons var pārvietot elektronu caur elektronu transporta ķēdi.

Hlorofila koncentrāciju mērīja ar CCM-300 (OPTI-SCIENCES) hlorofilmetru, kas mēra hlorofila koncentrāciju mg uz m<sup>2</sup>. Katram izvēlētajam augam izdarīja trīs mērījumus. Mērījumiem izraudzījās trīs nobriedušas lapas, bet ne tās, kurām veica fluorescences mērījumus.

### 2.4.2. Na<sup>+</sup> jonu kvantitatīvā noteikšana

Na<sup>+</sup> jonu koncentrācijas noteikšanai, uzsākot apstrādi ar NaCl šķīdumu, katru nedēļu ievāca no visiem augiem pa vienai lapai, kopā piecas lapas katram variantam. Lapas sadalīja lapu kātos un lapu plātnēs, un katra varianta lapu kātus un plātnes nosvēra, ietina papīrā un žāvēja 48 h 60 °C temperatūrā. Tālāk iegūto sauso masu ar porcelāna piestu tīģelī saberza kopā ar dejonizēto ūdeni attiecībā 50 mL ūdens uz 1 g sausās masas, tad iegūto šķīdumu nofiltrēja iegūstot ekstraktu. Jonu koncentrāciju noteica, iepildot 300 µl ekstrakta Horiba LAQUAtwin mērītājā, kas paredzēts Na<sup>+</sup> noteikšanai.

### 2.4.3. Augsnes elektrovadītspējas noteikšana

Elektrovadītspēju mērīja ar HH2 Moisture Meter DELTA-T DEVICES (Cambridge-England), kam pievienots WET Sensor type WET-2 sensors. Sensora 6.5 cm garo dakšu iesprauda veģetācijas traukā trīs dažādās vietās, šķērsām starp abiem āboliņiem un abās pusēs

āboliņiem paralēli tos savienojošajai līnijai. Mērīja tā, lai pēc apstrādes ar NaCl būtu veikta viena laistīšana ar ūdeni.

#### 2.4.4. Gvajakola peroksidāzes un polifenoloksidāzes aktivitātes noteikšana

Eksperimenta beigās ievāca no katra varianta visiem augiem pa vienai veselai nobriedušai lapai priekš katras analīzes, un visas lapas sadalīja lapu kātos un plātnēs. Ievāktos paraugus sasaldēja  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  līdz tālākajai apstrādei.

Katra varianta ievāktās plātnes vai kātus saldēja šķidrajā slāpekļī un saberza ar porcelāna piestu tīģelī līdz viendabīgai pulverveida masai. Pēc tam saberztos paraugus ievietoja saldētavā.

Pagatavoja ekstrakcijai nepieciešamo šķīdumu, kas sastāvēja no:

- 25 mM HEPES/KOH bufera (pH 7,2)
- 1 mM EDTA
- 3% polivinilpolipirrolidona;
- 0,8% Triton X-100.

Paraugu ekstrakcijai pie katra attiecīgā parauga pievienoja ekstrakcijas šķīdumu, lai parauga masas un ekstrakcijas šķīduma tilpuma attiecība būtu 1 grams auga materiāla pret 5 ml ekstrakcijas šķīduma. Iegūto maisījumu uzglabāja ledusskapī 15 minūtes  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā. No ekstrakta supernatanta, ko centrifūgēja 20 minūtes ar ātrumu 13 000 apgriezieni minūtē, ieguva ekstrakcijas homogenātu.

Peroksidāzes aktivitāti noteica ar spektrofotometru Camspec M501 Single beam UV/Vis, izmantojot gaismu ar 470 nm viļņa garuma. Reakcijas šķīdums sastāvēja no:

- 2 ml 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  fosfātbufera (pH 7) ar gvajikolu (0,124g/100 ml fosfāta bufera)
- 0,5 ml 0,03 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$
- 0,1 ml ekstrakta

Polifenoloksidāzes aktivitāti noteica ar spektrofotometru Camspec M501 Single beam UV/Vis, izmantojot gaismu ar 410 nm viļņa garumu. Reakcijas šķīdums sastāvēja no:

- 2,5 ml 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  fosfātbufera (pH 6,5) ar pirokateholu (0,275g/100 ml fosfāta bufera)
- 0,3 ml ekstrakta (Andersone, Ievinsh 2002).

Iegūtos absorbcijas izmaiņas datus izmantoja Gvajakola peroksidāzes un polifenoloksidāzes aktivitātes noteikšanai pēc formulas: aktivitāte =  $5 * V / n$ , kur V ir absorbcijas ātrums pēc spektrofotometra mērījuma, 5 ir ml ekstrakcijas bufera vienam gramam lapu, n ir ekstrakta tilpums (0,1 vai 0,3 ml).

#### 2.4.5. Malondialdehīda (TBARS) noteikšana

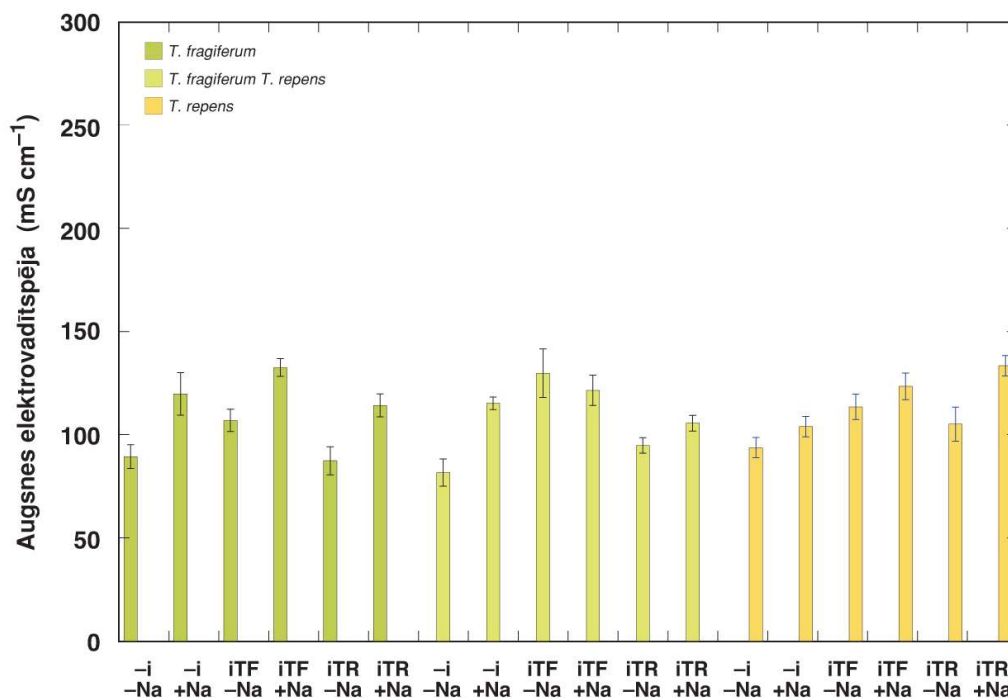
Ekspimenta beigās noteica kopējo ar tiobarbiturskābi reaģējošo savienojumu (TBARS) koncentrāciju, ko izteica kā ekvivalentu malondialdehīda saturam. No katra veģetācijas trauka paņēma divas vidējas lapas, tad nosvēra atsevišķi katra varianta lapu plātnes un kātus, tos ietina papīrā un novietoja saldētavā  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā. Pēc tam paraugus saberza ar porcelāna pestu tīgelī kopā ar 0,1 % trihloretikāskābi (TCA) attiecībā viens grams svaiga parauga pret desmit mililitriem TCA. Pēc tam iegūto šķīdumu centrifugēja piecas minūtes 12000 apgriezienos  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā. Tālāk vienu mililitru iegūtā supernatanta pievienoja šķīdumam, kas sastāvēja no 0,5 % TBA izšķīdināta 20 % TCA, un inkubēja 30 minūtes  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Reakciju pārtrauca, paraugu ievietojot ledus vannā, kuru pēc tam centrifugēja piecas minūtes 10 000 apgriezienos. Pēc centrifugēšanas noteica iegūtā supernatanta gaismas absorbciju 532 nm un pie 600 nm gaismas viļņu garumā. TBARS koncentrāciju aprēķināja pēc formulas:

$\text{TBARS (nmol g}^{-1}\text{)} = (A_{532} - A_{600}) V * 100 / \epsilon * W$ , kur  $\epsilon$  - specifiskais dzēšanas koeficients ( $155\text{ mM cm}^{-1}$ ),  $V$  - iegūtā saberztā parauga un TCA šķīduma tilpums,  $W$  - svaigā parauga masa,  $A_{600}$  un  $A_{532}$  - gaismas absorbcija attiecīgi 600 nm un 532 nm gaismas viļņa garumā (Aref et al. 2016).

### 3. REZULTĀTI

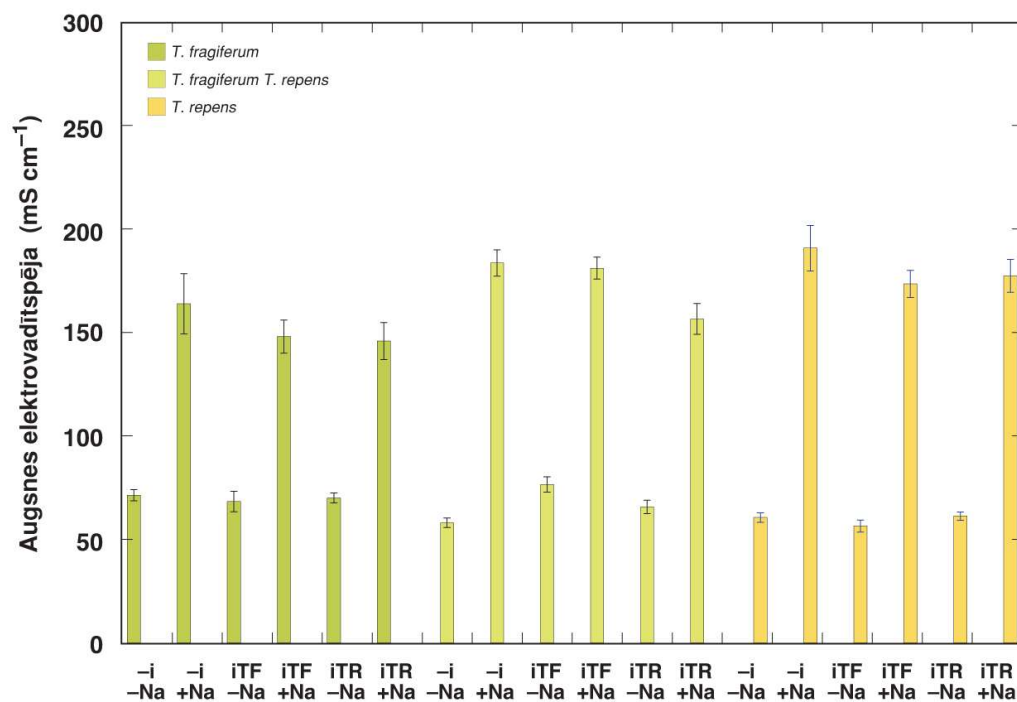
#### 3.1. Augsnes elektrovadītspējas izmaiņas eksperimenta gaitā

Veģetācijas eksperimenta laikā varēja novērot augsnes elektrovadītspējas izmaiņas laika gaitā (4. attēls). Pēc apstrādes ar 50 mM NaCl šķīdumu novēroja augsnes elektrovadītspējas pieaugumu visiem ar sāli apstrādātajiem variantiem, izņemot iTF -Na un iTF +Na variantiem, kur bez sāls apstrādes variantam konstatēja nebūtiski, bet tomēr augstāku elektrovadītspēju.



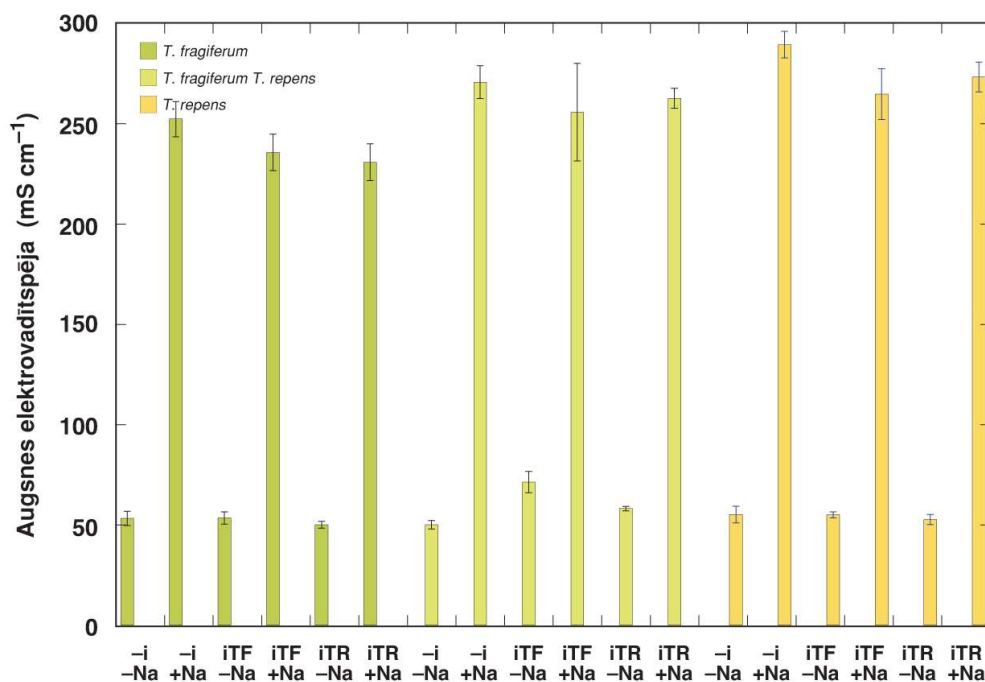
4. attēls. Augsnes elektrovadītspēja (EC) divas nedēļas pēc apstrādes ar NaCl sāļšanas.  
Figure 4. Soil conductivity (EC) two weeks after start of NaCl treatment.

Palielinoties NaCl koncentrācijai apstrādes šķīdumā, pieauga arī augsnes elektrovadītspēja (5. attēls). Pēc apstrādes ar 200 mM NaCl visiem sāls apstrādes variantiem augsnes elektrovadītspēja bija augstāka nekā kontrolei. Visos kopkultivācijas veidos visaugstākā augsnes elektrovadītspēja bija bez inokulanta apstrādātajos variantos. Salīdzinot abas sugas, lielāka elektrovadītspēja bija *T. repens* variantos, izņemot iTF +Na variantu, kur augstāka bija *T. repens*, *T. fragiferum* kopkultivācijas variantam.



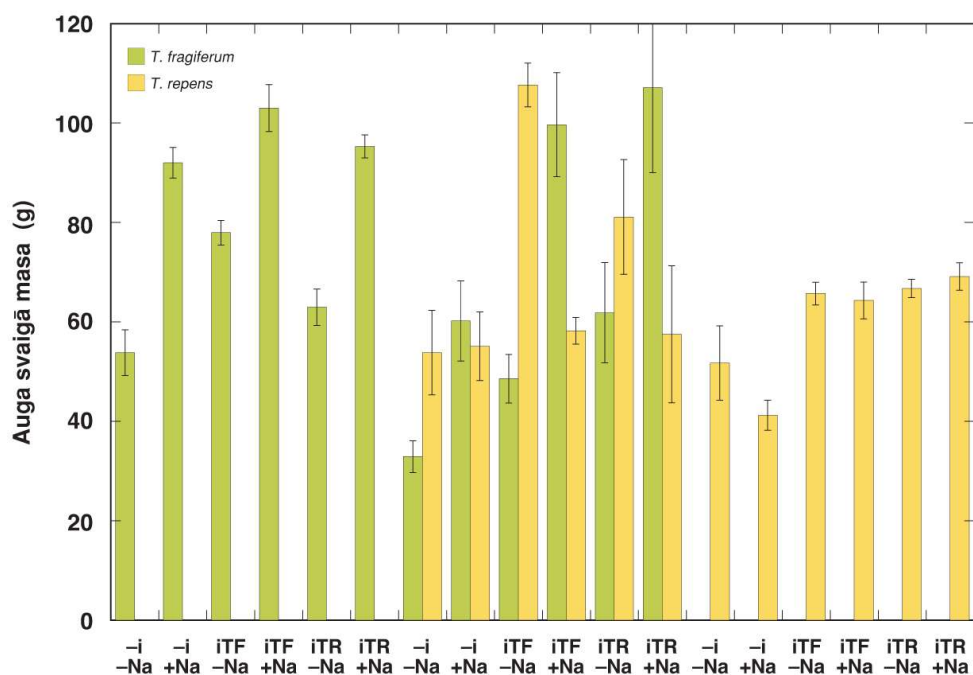
5. attēls. Augsnes elektrovadītspēja (EC) četras nedēļas pēc apstrādes ar NaCl sākšanas.  
 Figure 5. Soil conductivity (EC) four weeks after start of NaCl treatment.

Eksperimenta beigās pēc 400 mM NaCl apstrādes augsnes elektrovadītspēja bija visaugstākā visiem sāls apstrādes variantiem, kā arī saglabājās tendence, ka augstāka augsnes elektrovadītspēja bija sāls apstrādes variantiem, kuri nebija apstrādāti ar baktēriju inokulantu, kā arī *T. repens* variantiem novēroja lielāku elektrovadītspēju (6. attēls). Bez NaCl apstrādes variantiem novēroja elektrovadītspējas samazināšanos un tā būtiski neatšķīrās starp variantiem, izņemot iTF -Na kopkultivācijas variantam ar *T. repens* un *T. fragiferum* konstatēja augstāku elektrovadītspēju salīdzinot ar pārējiem bez NaCl apstrādes variantiem, kā arī visiem bez sāls apstrādes variantiem novēroja elektrovadītspējas samazināšanos.



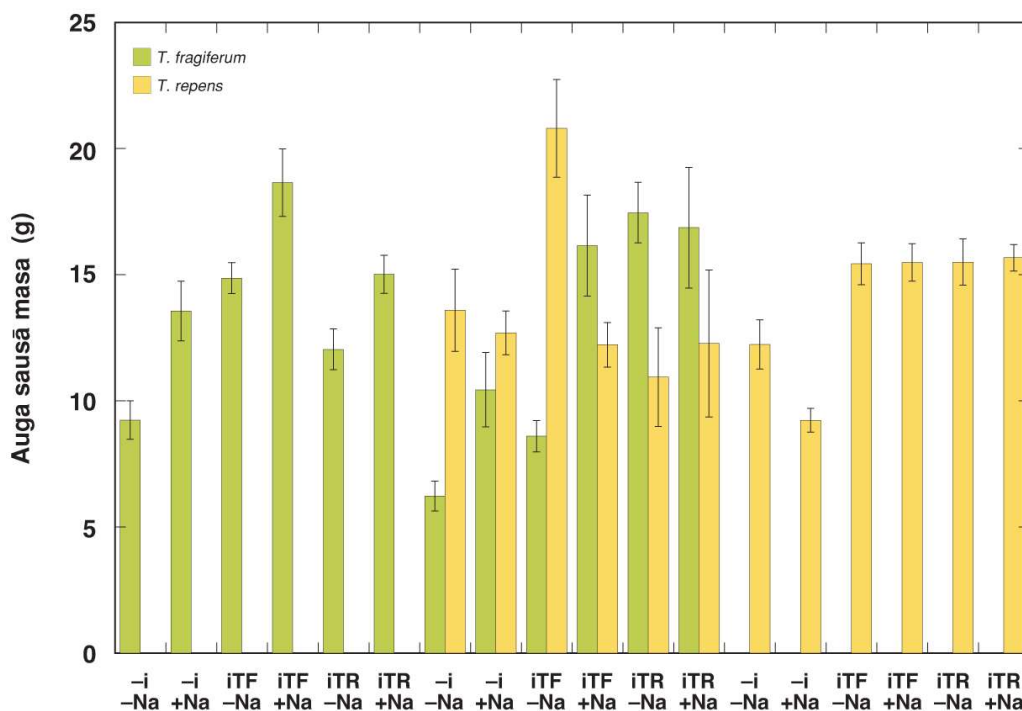
6 .attēls. Augsnes elektrovadītspēja (EC) divas nedēļas pēc apstrādes ar NaCl sākšanas.  
Figure 6. Soil conductivity (EC) six weeks after start of NaCl treatment.

Eksperimenta beigās visiem variantiem, kas bija apstrādāti ar baktēriju inokulantu, konstatēja augstāku augu svaigo masu, izņemot kopkultivācijas iTF -Na varianta *T. fragiferum* augiem, kuriem bija mazāka vidējā masa, salīdzinot ar kontroles variantu, bet toties šim variantam no visiem kopkultivācijas apstrādes veidiem konstatēja *T. repens* augiem vislielāko pozitīvo svaigās masas pieaugumu salīdzinot ar kontroles variantu (7. attēls). *T. repens* variantam svaigā masa starp inokulantajiem variantiem būtiski neatšķīrās, bet bija neliels pozitīvs pieaugums sava inokulanta apstrādes variantam, kā arī *T. fragiferum* variantos lielāka svaigā masa bija vērojama ar iTR apstrādātajos variantos. Kopkultivācijas variantos gan *T. repens* gan *T. fragiferum* augiem ar inokulantu apstrādātajiem variantiem bija lielāka svaigā masa, kas būtiski atšķīrās tieši *T. fragiferum* visiem variantiem un *T. repens* -Na apstrādes variantiem. Kopkultivācijas variantos, kas apstrādāti ar inokulantu un NaCl *T. fragiferum* svaigā masa bija nozīmīgi lielāka par *T. repens* masu, bet bez NaCl apstrādes variantiem masa lielāka bija *T. repens* augiem un iTF -Na būtiski lielāka, kā arī būtiski lielāka svaigā masa *T. repens* bija kopkultivācijas inokulanta un bez sāls variantos salīdzinot ar *T. repens* tā paša apstrādes veida variantiem. *T. repens* svaigā masa -Na kopkultivācijas inokulantu variantos ir būtiski lielāka par + Na variantiem, bet audzējot atsevišķi *T. repens* šāda iezīme neparādījās.



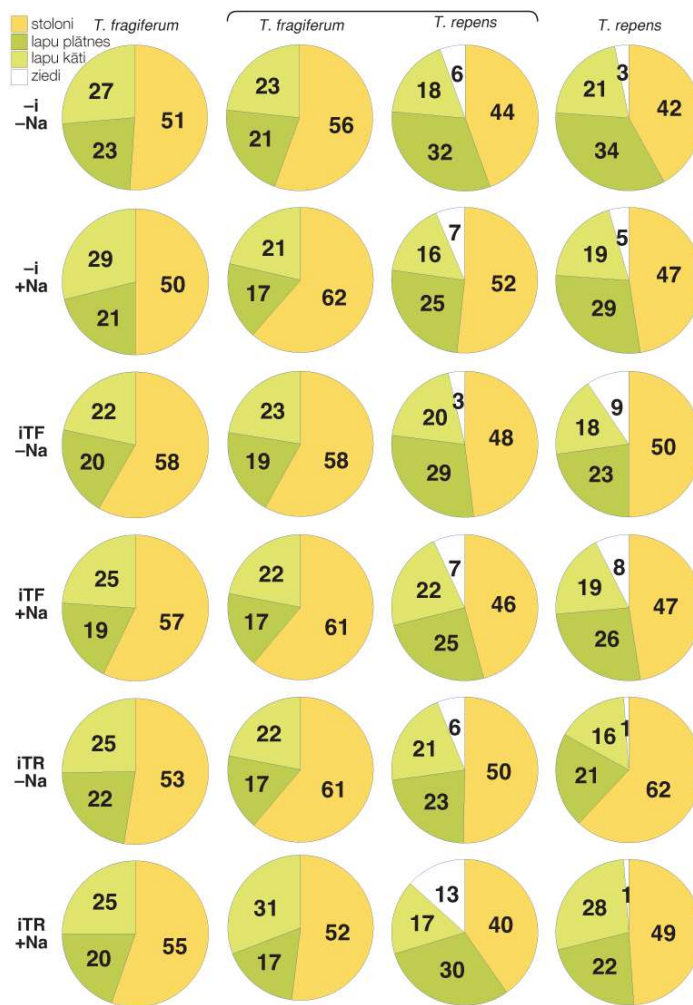
7. attēls. Augu svaigā masa atkarībā no apstrādes varianta

Augu vidējā sausā masa ataino tādas pašas tendences, kā augu svaigā masa, vienīgi tā bija nepilnas piecas reizes mazāka par svaigo masu (8. attēls). *T. fragiferum* augiem sausā masa starp +Na un -Na izlīdzinājās un nebija tik liela atšķirība, kā arī iTR variantā sausā masa -Na variantam bija lielāka par +Na variantu (5. attēls), bet svaigās masas variantos bija otrādi. Atsevišķajiem *T. repens* variantiem inokulantu variantos sausā masa principā neatšķīrās, bet kopkultivācijas variantos tā bija mazāka, izņemot iTF -Na variantu, kur sausā masa bija būtiski lielāka. Kopkultivācijā parādījās tendence, ka, ja viena auga svaigā masa būtiski pieauga, tad otram tā būtiski nemainījās.



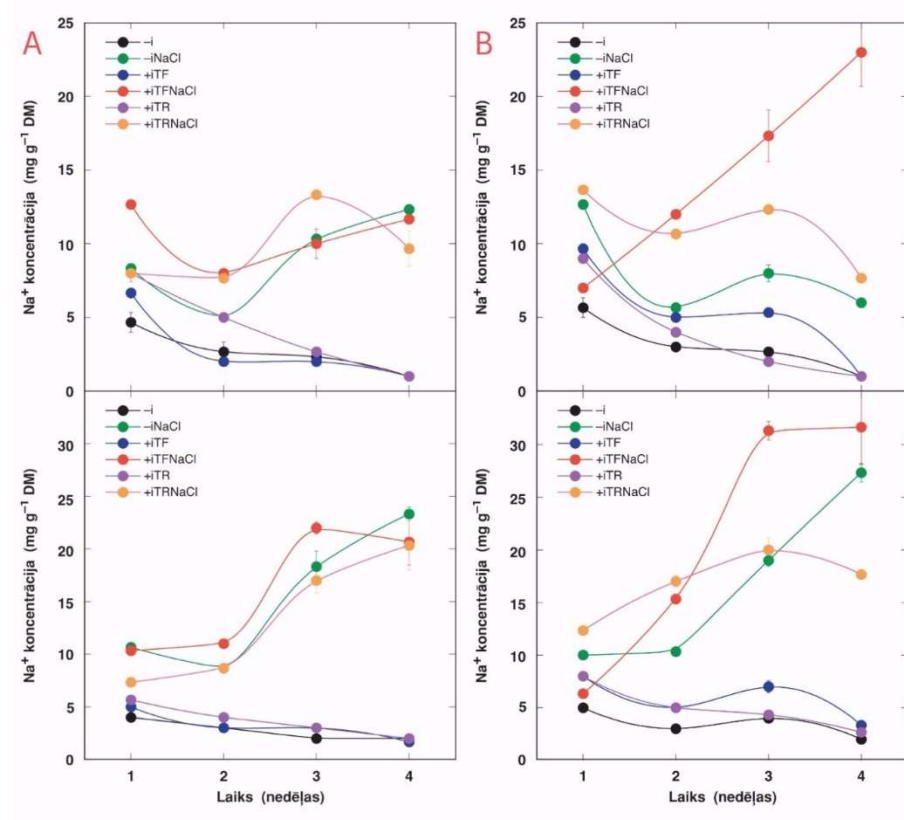
8. attēls. Augu sausā masa atkarībā no apstrādes varianta

Nevienā no apstrādes variantiem *T. fragiferum* nenovēroja ziedēšanu, bet *T. repens* ziedēja visos apstrādes variantos, kā arī kopkultivācijas variantos ziedēšanas intensitāte mazāk variēja salīdzinot ar tikai *T. repens* variantiem. *T. fragiferum* svaigās masas sadalījumu starp augu daļām NaCl būtiski neietekmēja, izņemot kopkultivācijas iTR variantiem izmaiņas lapu plātņu relatīvajā attiecībā, kur tā +Na bija 31 procents, bet -Na 22 procenti, bet atsevišķi audzētajiem *T. fragiferum* nekonstatēja šādu tendenci (9. attēls). Vērojama tendence, ka kopkultivācijas ietekmē *T. fragiferum* augiem pieauga stalonu masas daļa, kas parādījās četros no sešiem apstrādes variantiem, un vienā variantā iTF -Na tā bija vienāda, kā arī abos augšanas un visos inokulanta apstrādes variantos konstatēja, ka sāls ietekmē *T. fragiferum* lapu kātu masa bija lielāka par lapu plātņu masu, kā arī kopkultivācijas variantos *T. fragiferum* vēroja tendenci, ka attīstījās mazākas lapu plātnes, salīdzinot ar atsevišķi audzētiem *T. fragiferum*. Inokulanti ietekmēja *T. repens* atbildes reakciju pret apstrādi ar NaCl, bez inokulanta +Na variantiem konstatēja lielāku relatīvo stalonu masu salīdzinot ar -Na variantiem, bet inokulantu apstrādes veidiem -Na variantiem bija lielāka stalonu masas daļa no kopējā auga masas.



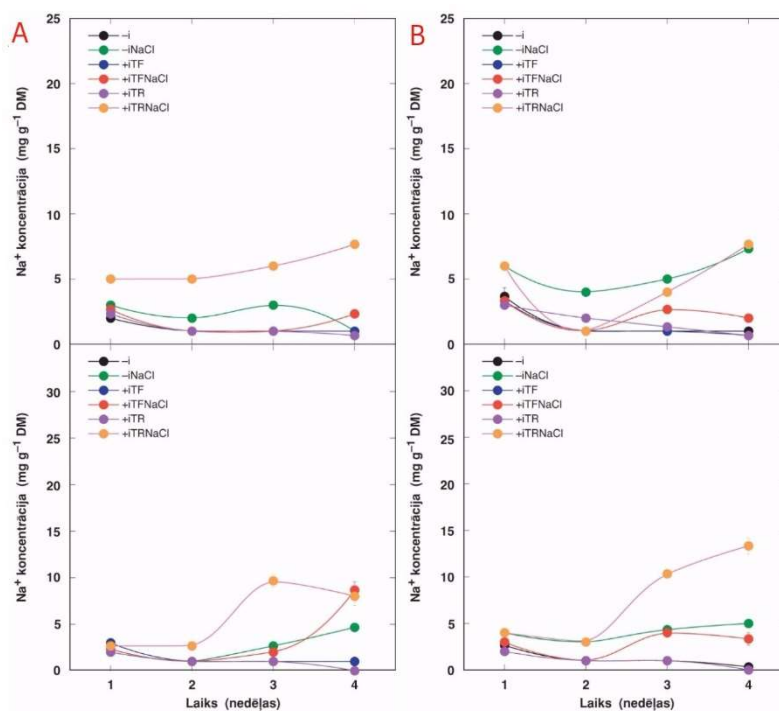
9. attēls. Augu svaigās masas relatīvais sadalījums dažādās auga daļās atkarībā no apstrādes varianta.

Eksperimenta beigās visos NaCl apstrādes variantos *T. fragiferum* lapu plātnēs un lapu kātos bija būtiski augstāka Na<sup>+</sup> koncentrācija, salīdzinot ar bez sāls apstrādes variantiem, kā arī lapu plātnēs jonu koncentrācija bija zemāka, nekā lapu kātos (10. attēls). Bez sāls apstrādes visiem *T. fragiferum* variantiem bija vērojama Na<sup>+</sup> koncentrācijas pakāpeniska samazināšanās, kas lapu plātnēm noritēja straujāk, bet tām arī sākotnējā koncentrācija bija augstāka. Inokulanta būtisku ietekmi atsevišķi audzētajiem *T. fragiferum* nekonstatēja, bet jaukti audzētajam variantam +iTF novēroja būtiski augstāku jonu koncentrāciju jau no trešās nedēļas. Auga lapu plātnēs jonu koncentrācija stabilizējās laika gaitā un pat bija vērojama samazināšanās eksperimenta beigās sāls apstrādes variantiem +iTR, atsevišķi audzētajiem un +iTR, -i jaukti audzētajiem *T. fragiferum*.



10. attēls. Na jonu koncentrācijas dinamika lapu plātnēs (augšā) un lapu kātos (apakša) atkarībā no apstrādes varianta. *T. fragiferum* atsevišķi (A), *T. fragiferum* jaukti (B)

Visiem *T. repens* sāls ietekmes kontroles variantiem Na<sup>+</sup> koncentrācija gan lapu kātos, gan plātnēs samazinājās un būtiski neatšķīrās dažādiem variantiem (11. attēls). Vismazākā NaCl ietekme bija vērojama jaukti audzēto variantu lapu plātnēs, lai gan trešajā nedēļā -iNaCl un ceturtajā nedēļā +iTFNaCl variantam vērojams nebūtisks Na<sup>+</sup> jonu koncentrācijas pieaugums, bet būtiska un laika gaitā pastāvīgi pieaugoša jonu koncentrācija novērojama tikai +iTRNaCl variantam. Lapu kātos gan visiem sāls apstrādes variantiem bija būtisks Na<sup>+</sup> jonu koncentrācijas pieaugums salīdzinot ar sāls kontroli. Būtisku abu inokulantu ietekmi sāls apstrādes variantiem novēroja tikai lapu kātos atsevišķi audzētajam variantam, bet visaugstāko Na<sup>+</sup> koncentrāciju fiksēja ceturtajā nedēļā jaukti audzētajam +iTRNaCl variantam. Visiem sāls apstrādes variantiem, gan jaukti, gan atsevišķi audzētajiem, Na<sup>+</sup> koncentrācija pieauga tikai trešajā nedēļā, kā arī vienīgi +TRNaCl apstrādes variantam bija būtiski augstāka Na<sup>+</sup> koncentrācija gan lapu plātnēs, gan lapu kātos, salīdzinot ar sāls kontroles variantiem.



11. attēls Na jonu koncentrācijas dinamika lapu plātnēs (augšā) un lapu kātos (apakša) atkarībā no apstrādes varianta. *T. repens* jaukti (A), *T. repens* atsevišķi (B).

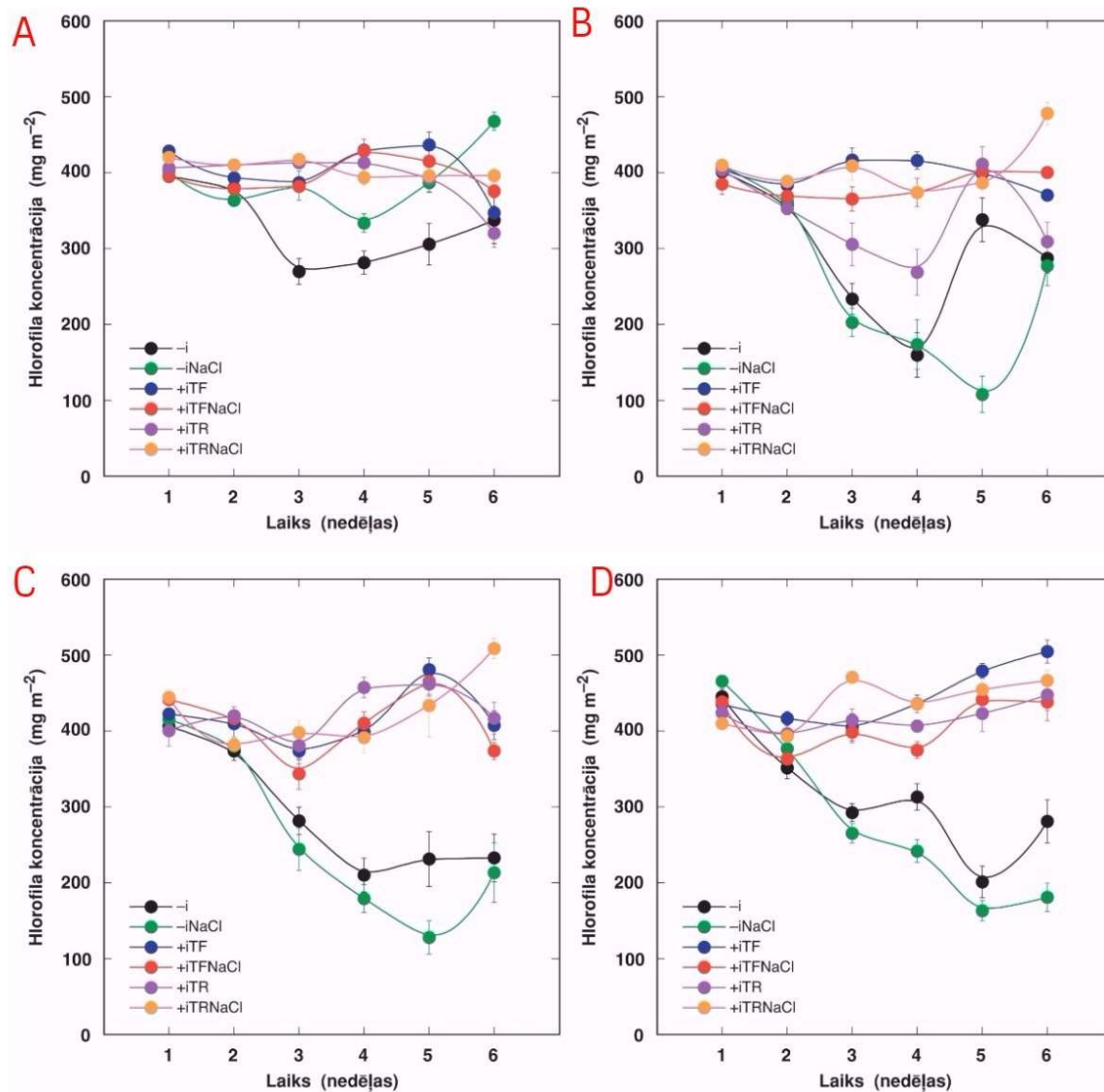
Vizuāli uzskatāma bija inokulantu pozitīvā ietekme uz hlorofila koncentrāciju pēc trīs ar pusi nedēļām (12. attēls). Varēja redzēt morfoloģiskās atšķirības starp ar inokulantu apstrādātajiem un neapstrādāto variantu visām trim audzēšanas kombinācijām. Bez inokulanta variantu augu lapas bija gaišākas un iedzeltenas, kā arī paši augi bija mazāki.



12. attēls. Morfoloģija pēc 3,5 nedēļām *T. fragiferum* (A), *T. repens* un *T. fragiferum* (B), *T. repens* (C)

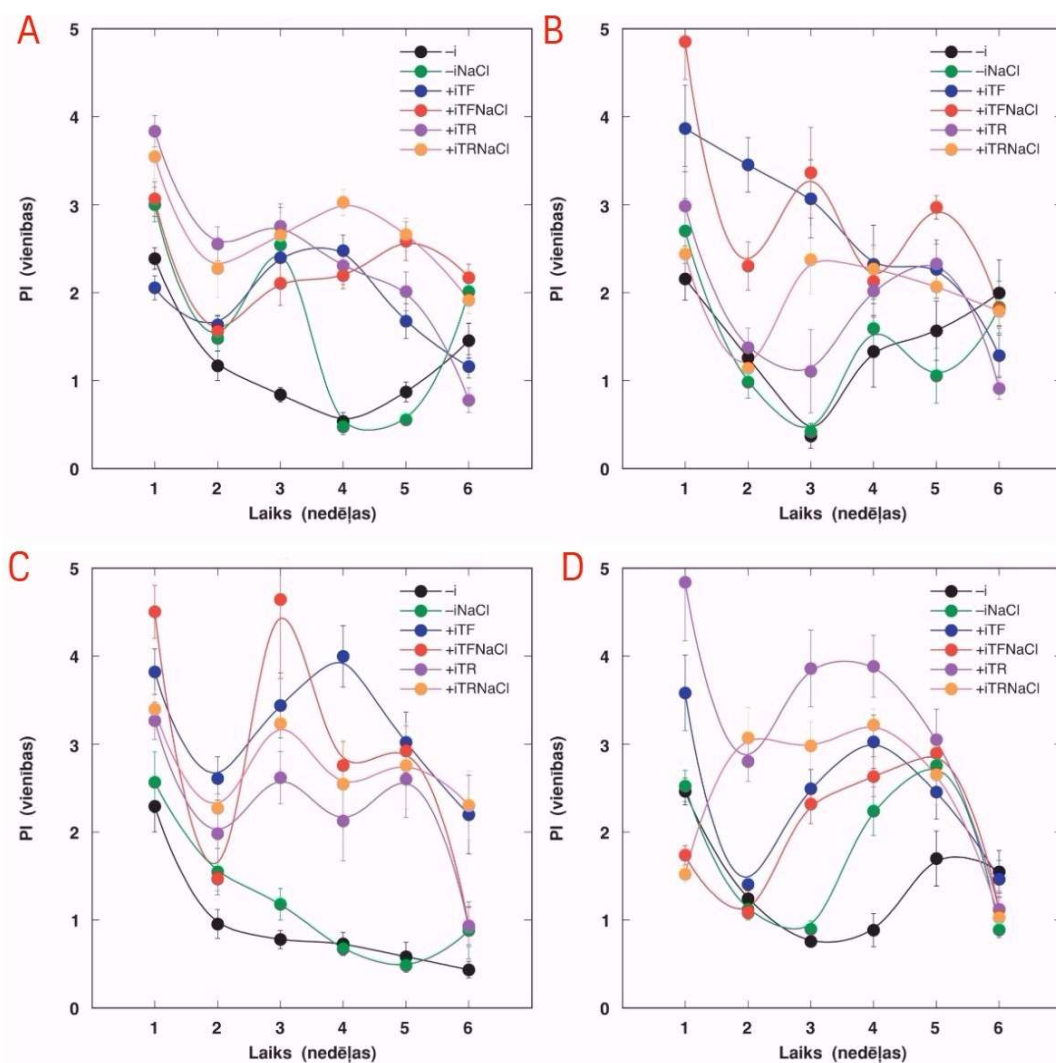
Morfoloģiskos novērojumus apstiprināja lapu plātņu hlorofila koncentrācijas mērījumi (13. attēls). Visiem bez inokulanta apstrādes variantiem trešajā nedēļā konstatēja būtisku hlorofila koncentrācijas samazinājumu, izņemot *T. fragiferum* atsevišķi audzēto -iNaCl, kam eksperimenta beigās konstatēja visaugstāko hlorofila koncentrāciju *T. fragiferum* kopkultivācijas variantā. *T. fragiferum* kopkultivācijas variantā eksperimenta beigās visu apstrādes variantu hlorofila koncentrācija izlīdzinājās. Abu sugu kopkultivācijas variantos eksperimenta beigās augstāko hlorofila koncentrāciju uzrādīja +iTRNaCl variants. *T. fragiferum* augiem vismazākās izmaiņas laika gaitā novēroja +iTFNaCl variantam, bet būtiski zemāka hlorofila koncentrācija bija abiem bez inokulanta variantiem un +iTR variantam jaukti audzētajiem augiem.

*T. repens* jaukti audzētajiem ar inokulantu apstrādātajiem variantiem, salīdzinot ar atsevišķi audzētajiem augiem, eksperimenta beigās novēroja hlorofila koncentrācijas kritumu, izņemot +iTRNaCl variantam, kam bija vērojams pieaugums, kā arī bija vērojams *T. repens* augiem, ka ar sāli apstrādātajiem variantiem ir mazāka hlorofila koncentrācija, izņemot +iTRNaCl variantu, bet *T. fragiferum* bija neizteikta pretēja tendence (13. attēls).



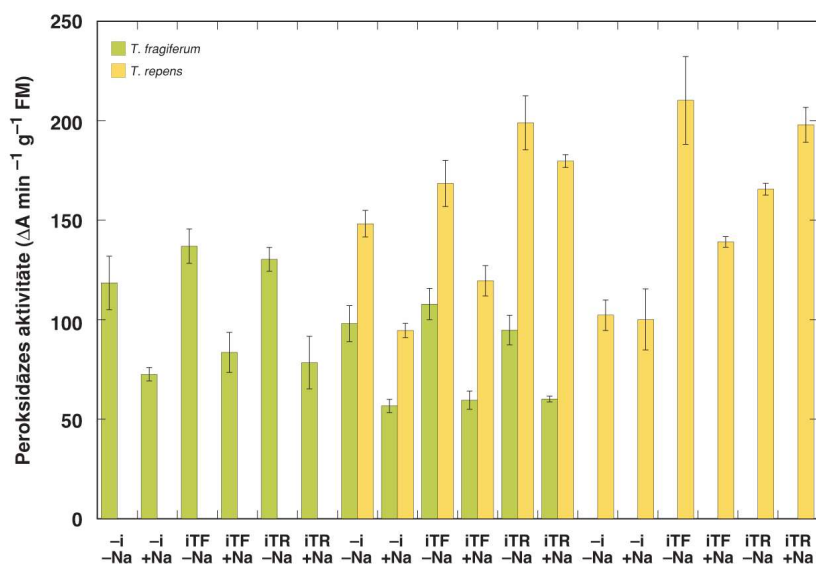
13. attēls. Lapu plātņu hlorofila koncentrācijas dinamika atkarībā no apstrādes varianta. *T. fragiferum* atsevišķi (A), *T. fragiferum* jaukti (B), *T. repens* jaukti (C), *T. repens* atsevišķi (D).

Hlorofila *a* fluorescences raksturojošais parametrs Performance Index (PI) visiem variantiem, izņemot atsevišķi audzēto *T. repens* variantu +iTRNaCl, otrajā nedēļā samazinājās (14. attēls). Līdz piektajai nedēļai lielākoties novēroja tendenci, ka variantiem bez baktēriju inokulantiem bija zemāks PI.



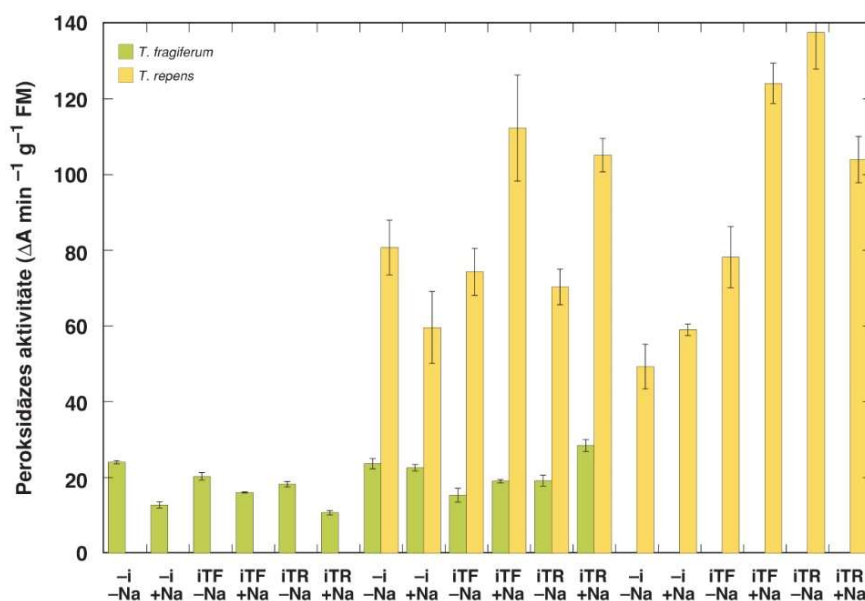
14. attēls Hlorofila *a* fluorescences parametra *Performance Index* dinamika augu lapās atkarībā no apstrādes varianta. *T. fragiferum* atsevišķi (A), *T. fragiferum* jaukti (B), *T. repens* jaukti (C), *T. repens* atsevišķi (D).

Visiem NaCl apstrādes variantiem *T. fragiferum*, gan audzējot atsevišķi, gan kopā ar *T. repens*, konstatēja zemāku peroksidāzes aktivitāti, salīdzinājumā ar bez sāls variantiem, kā arī kopkultivācijas variantos peroksidāzes aktivitāte bija zemāka *T. fragiferum* (15. attēls). Novērtējot abu inokulantu ietekmi uz peroksidāzes aktivitāti *T. fragiferum*, konstatēja, ka ar savu inokulantu apstrādātajiem augiem bija lielāka peroksidāzes aktivitāte. *T. repens* kopkultivācijas variantos ar NaCl apstrādātajiem variantiem konstatēja zemāku peroksidāzes aktivitāti, bet, atsevišķi audzējot, inokulanta kontroles variantam nebija atšķirības, savukārt +iTRNaCl variantam bija augstāka aktivitāte, salīdzinājumā ar bez NaCl variantu. Kopkultivācijas variantiem -i un iTR bija zemāka aktivitāte, bet pārējiem variantiem augstāka, salīdzinot ar atsevišķi audzētajiem *T. repens* augu lapu plātnēs.



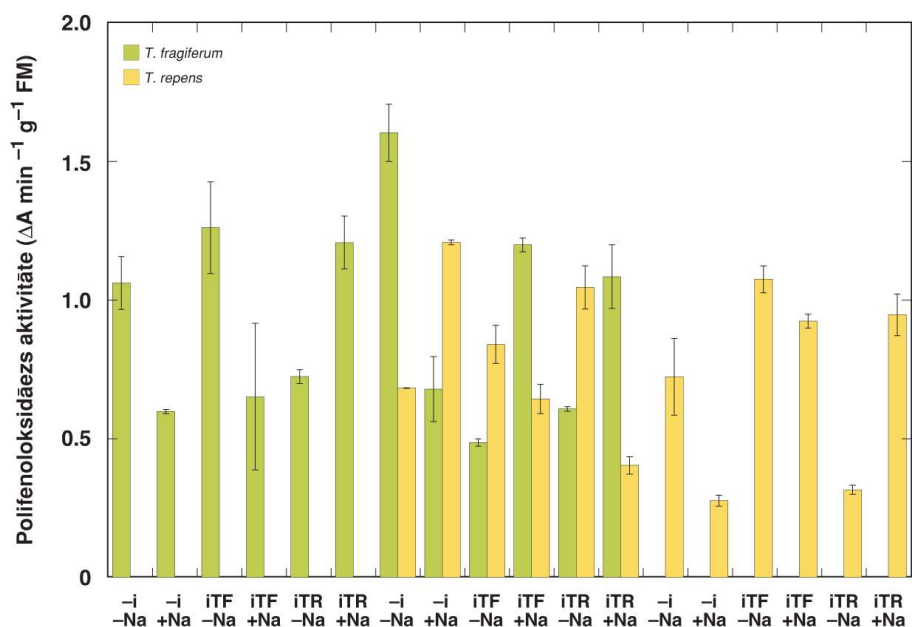
15. attēls. Peroksidāzes aktivitāte augu lapu plātnēs atkarībā no apstrādes varianta.

Peroksidāzes aktivitāte augu lapu kātos bija zemāka, nekā augu lapu plātnēs (16. attēls). *T. fragiferum*, atsevišķi audzējot, saglabājās tā pati tendence, kas lapu plātnēs, jo sāls apstrādes variantos peroksidāzes aktivitāte bija zemāka, bet kopkultivācijas +iTR variantam sāls apstrādes variantam bija augstāka aktivitāte un pārējiem variantiem nebija būtiskas atšķirības, kā arī kopkultivācijā ar *T. repens* nesamazinājās peroksidāzes aktivitāte. *T. repens* abos kopkultivācijas inokulanta apstrādātajos variantos un atsevišķi audzētajam +iTF variantam novēroja augstāku peroksidāzes aktivitāti lapu kātos ar NaCl apstrādātajiem augiem, kā arī kopkultivācijas kontroles variantam peroksidāzes aktivitāte bija augstāka, salīdzinot ar atsevišķi audzētajiem *T. repens*.



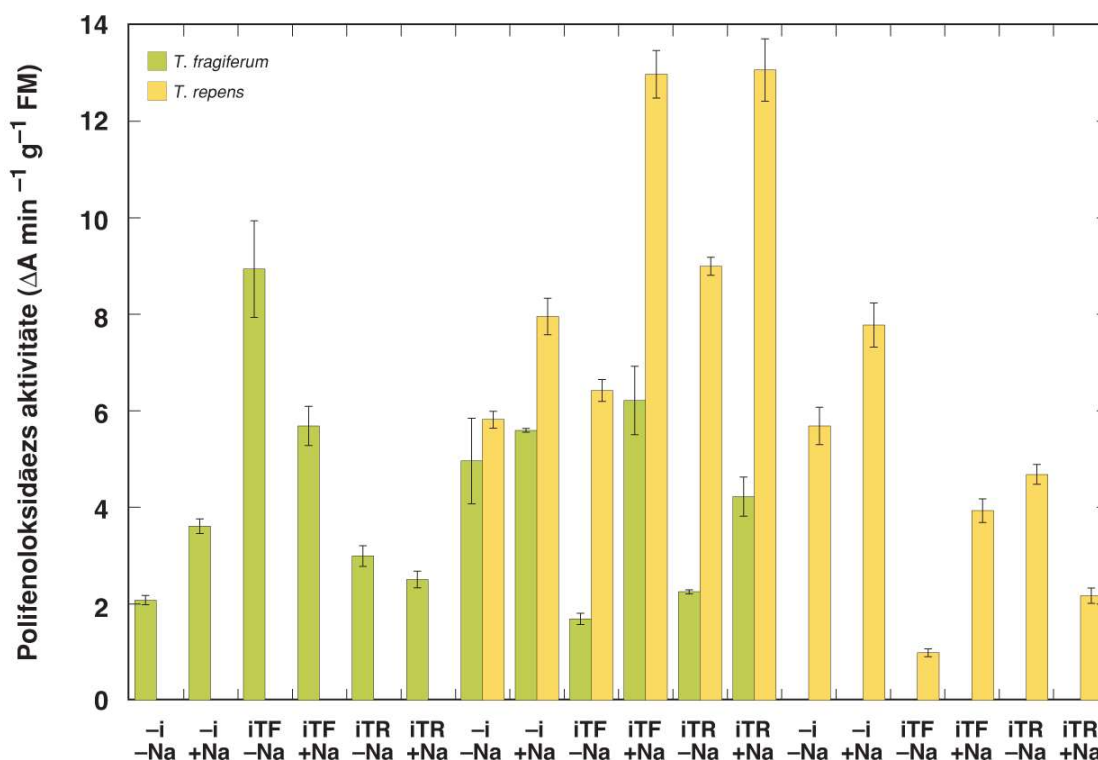
16. attēls. Peroksidāzes aktivitāte augu lapu kātos atkarībā no apstrādes varianta.

Kopkultivācijā ar inokulantu apstrādātajiem variantiem *T. fragiferum* augiem konstatēja augstāku polifenoloksīdāzes aktivitāti ar NaCl apstrādātajiem augiem, bet *T. repens* konstatēja tieši pretējo, lai gan kopkultivācijas inokulantu kontroles variantiem bija tieši pretēja tendence (17. attēls). Tas pats bija novērojams atsevišķi audzētajiem *T. fragiferum* +iTR variantiem, un *T. repens* +iTF variantiem.



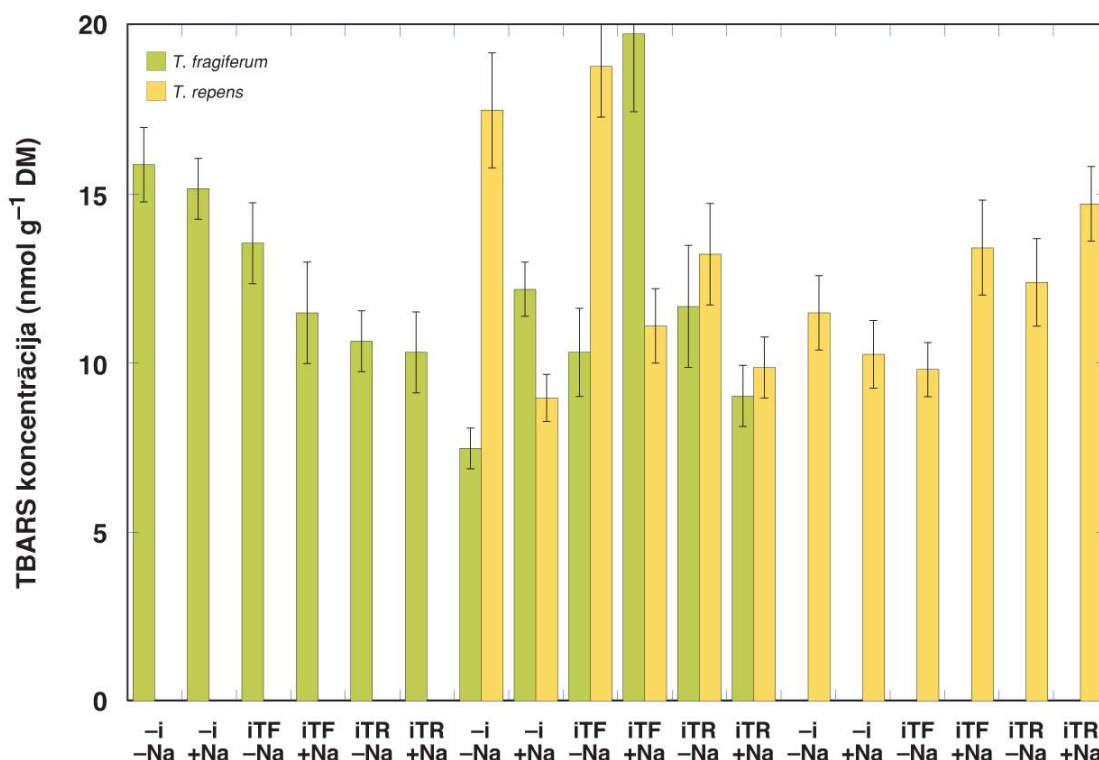
17. attēls. Polifenoloksīdāzes aktivitāte augu lapu plātnēs atkarībā no apstrādes varianta.

Augu lapu kātos konstatēja augstāku polifenoloksīdāzes aktivitāti salīdzinot ar lapu plātnēm (18. attēls). Kopkultivācijā ar inokulantu apstrādātajiem *T. fragiferum* augstāka polifenoloksīdāzes aktivitāte bija ar NaCl apstrādātajiem variantiem, bet atsevišķi audzētajiem - zemāka. *T. repens* visiem ar NaCl apstrādātajiem variantiem bija augstāka polifenoloksīdāzes aktivitāte lapu kātos, izņemot atsevišķi audzētajam +iTR variantam, kā arī kopkultivācijā ar inokulantu apstrādātajiem *T. repens* augiem konstatēja augstāku polifenoloksīdāzes aktivitāti, salīdzinot ar atsevišķi audzētajiem.



18. attēls. Polifenoloksidāzes aktivitāte augu lapu kātos, atkarībā no apstrādes varianta.

*T. fragiferum*, audzējot atsevišķi, visaugstākā TBARS koncentrācija bija kontroles variantam, kā arī pārējiem apstrādes veidiem ar NaCl novēroja mazāku koncentrāciju, bet atšķirības bija kļūdas robežās, bet *T. repens* atsevišķi audzētajiem inokulantu variantiem tieši ar NaCl apstrādātajiem augiem konstatēja augstāku TBARS koncentrāciju (19. attēls). Kopkultivācijas variantiem *T. fragiferum* bija izteiktāka atšķirība starp NaCl apstrādes un kontroles augiem, un bez inokulanta apstrādes variantam sāls apstrādes augi uzrādīja būtiski augstāku TBARS koncentrāciju. Kopkultivācijas bez sāls apstrādes variantiem *T. repens* augiem bija augstāka TBARS koncentrācija, salīdzinot ar atsevišķi audzētajiem, bet *T. fragiferum* pieaugumu varēja novērot tikai +iTF variantam, kas sasniedza arī visaugstāko koncentrāciju no visiem variantiem.



19. attēls. TBARS koncentrācija augu lapu plātnēs atkarībā no apstrādes varianta.

Apstrāde ar NaCl ļoti atšķirīgi ietekmēja abu sugu sauso un svaigo masu (1. tabula). Būtiski pozitīvu ietekmi uz salīdzinošo masu konstatēja visiem *T. fragiferum* variantiem, gan tiem, kas audzēti atsevišķi, gan kopā, izņemot +iTR sauso masu. Vislielāko pozitīvo ietekmi *T. fragiferum* augiem novēroja kopkultivācijas +iTF variantam, bet ar +iTR inokulantu apstrādātajiem augiem ietekme bija mazāka kā kontroles bez inokulantu variantiem, lai gan atsevišķi augušajiem *T. fragiferum* tieši inokulantu kontroles variantiem novēroja lielāku būtiskās salīdzinošās masas pieaugumu. Nevienam no *T. repens* variantiem nenovēroja būtisku salīdzinošās masas pieaugumu NaCl ietekmē, bet konstatēja būtisku samazinājumu gan sausajai, gan svaigajai masai atsevišķi audzētajiem inokulantu kontroles variantiem, kā arī jaukti audzētajam +iTF variantam un +iTR varanta svaigajai masai.

1. tabula

NaCl salīdzinošā ietekme uz divu āboliņa sugu dzinumu svaigo un sauso masu. Būtiskas atšķirības ( $P < 0.05$ ) no atbilstošā varianta bez NaCl atzīmētas ar \*

Salīdzinošā masa (%)

	<i>T. fragiferum</i>				<i>T. repens</i>			
	atsevišķi		jaukti		atsevišķi		jaukti	
	FM	DM	FM	DM	FM	DM	FM	DM
-i	171 ± 6*	147 ± 13*	183 ± 28*	168 ± 24*	75 ± 6*	75 ± 4*	102 ± 13	93 ± 6

+ iTF	132 ± 6*	125 ± 9*	205 ± 22*	188 ± 23*	98 ± 6	100 ± 5	54 ± 3*	59 ± 4*
+ iTR	151 ± 4*	125 ± 6*	176 ± 19*	96 ± 14	104 ± 4	101 ± 5	71 ± 17*	112 ± 27

*T. fragiferum* variantiem novēroja gan sausās, gan svaigās salīdzinošās masas būtisku pieaugumu, izņemot svaigajai masai iTF +NaCl un iTR -NaCl variantiem, kā arī sausajai masai +NaCl iTR, bet tāpat šiem variantiem bija pozitīvas ietekmes tendence (2. tabula). Rizobiju pozitīvā ietekme vairāk izpaudās jaukti audzētajiem kopkultivācijas variantiem. Atsevišķi audzēto *T. repens* variantu salīdzinošo sauso masu rizobijas būtiski palielināja visiem variantiem, bet svaigo tikai iTF -NaCl un iTR +NaCl variantam, kā arī lielāka pozitīvā ietekme bija iTF inokulanta, toties jaukti audzētajiem variantiem novēroja pretēju tendenci, rizobijas būtiski paaugstināja svaigo nevis sauso masu, atskaitot iTF -NaCl variantu, kam tieši sausā masa bija būtiski augstāka.

2. tabula

Inokulācijas ar divu veidu rizobijām salīdzinošā ietekme uz divu āboliņa sugu dzinumumu svaigo un sauso masu. Būtiskas atšķirības ( $P < 0.05$ ) no atbilstošā varianta bez inokulanta atzīmētas ar \*

	Salīdzinošā masa (%)							
	<i>T. fragiferum</i>				<i>T. repens</i>			
	atsevišķi		jaukti		atsevišķi		jaukti	
	FM	DM	FM	DM	FM	DM	FM	DM
-NaCl,	145 ± 5*	161 ± 7*	148 ± 15*	138 ± 10*	200 ± 8*	126 ± 7*	119 ± 4	207 ± 14*
iTF								
+NaCl,	114 ± 5	138 ± 10*	166 ± 17*	155 ± 19*	106 ± 5	168 ± 8*	156 ± 9*	96 ± 7
iTF								
-NaCl,	117 ± 7	130 ± 9*	188 ± 31*	280 ± 19*	151 ± 21*	127 ± 8*	121 ± 4*	81 ± 14
iTR								
+NaCl,	164 ± 3*	111 ± 6	178 ± 20*	161 ± 23*	104 ± 24	170 ± 6*	168 ± 7*	97 ± 23
iTR								

*T. fragiferum* masu negatīvāk ietekmēja kopkultivācija salīdzinot ar *T. repens* un šī tendence bija izteiktāka tieši bez sāls apstrādes variantos, kur gan -, gan +iTF variantiem novēroja būtisku samazinājumu, bet +iTR sausajai masai konstatēja pat būtisku pieaugumu (3. tabula). Ar NaCl apstrādātajiem variantiem tikai bez inokulanta apstrādes augiem novēroja būtisku masas samazinājumu. *T. repens* ar sāli apstrādātajam bez inokulanta variantam un bez sāls apstrādes +iTF variantam novēroja būtisku masas pieaugumu kopkultivācijas dēļ, bet sausās salīdzinošās masas būtisku samazinājumu konstatēja diviem variantiem no kuriem

viens bija +iTF +NaCl un +iTR -NaCl variantiem. Vislielāko pieaugumu *T. repens* fiksēja tieši +iTF nevis +iTR bez sāls apstrādes variantam.

3. tabula

Kopkultivācijas salīdzinošā ietekme uz divu āboliņa sugu dzinumu svaigo un sauso masu. Būtiskas atšķirības ( $P < 0.05$ ) no atbilstošā atsevišķi audzētā varianta atzīmēt ar\*

	Salīdzinošā masa (%)							
	<i>T. fragiferum</i>				<i>T. repens</i>			
	-NaCl		+NaCl		-NaCl		+NaCl	
	FM	DM	FM	DM	FM	DM	FM	DM
- i	61 ± 6*	67 ± 6*	65 ± 9*	77 ± 11*	98 ± 15	111 ± 13	134 ± 17*	138 ± 9*
+ iTF	62 ± 6*	58 ± 4*	97 ± 10	87 ± 11	164 ± 7*	134 ± 13*	91 ± 4	79 ± 6*
+ iTR	98 ± 16	145 ± 10*	112 ± 13	112 ± 16	122 ± 17	71 ± 13*	83 ± 19	78 ± 19

## 4. DISKUSIJA

Eksperimenta gaitā augsnes elektrovadītspēja pakāpeniski pieauga līdz ar NaCl koncentrācijas pieaugumu, jo augsnē palielinājās pozitīvo  $\text{Na}^+$  un negatīvo  $\text{Cl}^-$  jonu koncentrācija, ko būtiski neietekmēja neviens no apstrādes variantiem, kaut gan parādījās zināma tendence, ka -i variantiem bija zemāka elektrovadītspēja, kā iespējamais iemesls varētu būt baktēriju izdalītie savienojumi, toties -Na visiem variantiem bija vērojama elektrovadītspējas pakāpeniska samazināšanās, ko izraisīja augu minerālā barošanās, jo augi patērēja augsnē esošos minerālelementus (Armas & Pugnaire 2011).

Dažādos pētījumos par gumiņbaktēriju ietekmi vienojošā lieta ir to pozitīvā ietekme uz augu masu (Svenning et al. 2001., Marcel et al 2006., Melino et al. 2012), kas atspoguļojas arī šajā eksperimentā (7. attēls), kur visiem ar inokulantu apstrādātajiem variantiem konstatēja svaigās masas pieaugumu. Kopkultivācijas variantiem iezīmējās tendence, ka vienas sugas augiem palielinājās biomasa, savukārt tā varianta otrai sugai vai nu nebija vērojama būtiska atšķirība, vai novēroja pat samazinājumu. Būtiska bija sāls ietekme, bet zemeņāboliņam tā izpaudās pretēji literatūrā rakstītajai, ka NaCl samazina augu augšanu (Ashraf & Harris 2004, Manchanda & Garg 2008, Galloway et al. 2010), jo +Na variantos zemeņu āboliņam bija lielāka biomasa, ko var skaidrot ar literatūrā atrodamo informāciju, ka zemeņu āboliņam piemīt lielāka sāls tolerance (Nienartowicz & Wilkon-Michalska 1993), salīdzinot ar ložņu āboliņu, kas uzrādīja neitrālu vai literatūrā aprakstīto negatīvo ietekmi uz sāli. Šis varētu būt iemesls, kādēļ zemeņu āboliņš Latvijā sastopams tikai jūras piekrastē (Priedītis 2014), jo šajā biotopā spēj konkurēt ar citām pļavu sugām, kā arī citur ir īpaši nozīmīgs zemkopības augs iesālās pļavās (Rumbaugh et al. 1993). Augu sausā masa atainoja līdzīgu tendenci, kā svaigā masa starp dažādiem variantiem. Arī atsevišķi audzētie varianti liek domāt, ka zemeņu āboliņš ir adaptējies sāļākai augsnei, jo to svaigā masa pilnīgi visos +Na variantos parāda lielāku masu, turpretī ložņu āboliņam tā nemainās vai samazinās, ko ir konstatējuši vairākos pētījumos. Atšķirīgo sāls toleranci varētu skaidrot ar atšķirīgo spēju  $\text{Na}^+$  jonus ieslēgt vakuolās (Stall 1991), ko daļēji parāda arī nātrija jonu koncentrācijas atšķirības ložņu un zemeņāboliņa lapās. Kā arī kopkultivācijā parādās izteiktāka inokulantu iedarbība. Salīdzinošā masa arī lieliski ataino, ka visos NaCl variantos, gan zemeņu āboliņa sausā, gan svaigā masa, ir būtiski pieaugusi, atskaitot +iTR jaukti audzētā varianta sausā masa, bet ložņu āboliņam tā samazinās, vai būtiski nemainās sāls ietekmē, bet īpaši izteikts samazinājums vērojams jauktajā +iTF variantā, kur varētu izpausties šī inokulanta negatīvā ietekme paaugstinātās sāls koncentrācijas dēļ. Inokulantu efektivitāti labi atspoguļo salīdzinošā masa,

kas īpaši izteikti parādās zemeņāboliņa kopkultivācijas variantos, kur visiem apstrādes veidiem konstatēja būtiski pozitīvu zemeņāboliņa masas pieaugumu (2. tabula).

Zemeņāboliņam starpsugu konkurence ir vairāk izteikta, salīdzinot ar ložņu āboliņu, kas īpaši izteikti ir -i un -NaCl variantos, kas liecina par izteiktu augu savstarpējo mijiedarbību (3. tabula) (Bruno et al. 2003). Kopkultivācijas ietekme uz salīdzinošo masu parāda pretēju literatūrā pārsvarā sastopamajai informācijai par rizobiju baktēriju ļoti šauro sugas specifiskumu (Jane et al. 1985), jo vērojama tieši pretējo inokulantu pozitīvā ietekme +iTF - NaCl variantos (2. tabula). Kopkultivācijas ietekme norāda, ka ložņu āboliņš ir dominantāks pār zemeņu (Harper & Catworthy 1963), bet NaCl un baktēriju simbioze samazina ložņu āboliņa dominanci, jo ar slāpekli nodrošinātos apstākļos mainās tauriņziežu savstarpējā konkurence (Marcel et al. 2006). Negatīvo ietekmi varētu izraisīt nezināmu alelopātisku savienojumu sintēze, vai arī konkurence par resursiem, kas izteikti parādās bezinokulantu variantos, kuros varētu arī pietrūkt slāpekļis (Armas & Pugnaire 2011, Lankau 2012, Pierik et al. 2013), bet var novērot tendenci, ka savstarpējā ietekme mainās apgriezti proporcionāli abiotisko faktoru izraisītajam stresa gradientam (Naestre & Cortina 2004).

Eksperimenta laikā ziedēšanu novēroja tikai ložņu āboliņam, bet, pretēji literatūras datiem, to nekavēja paaugstināta sāls koncentrācija. Toties parādījās tendence, ka starpsugu mijiedarbība un apstrāde ar +iTR veicināja ziedēšanu (Marcel et al. 2006, Muuns & Tester 2008).

Zemeņāboliņam  $\text{Na}^+$  koncentrācija lapu kātos un plātnēs bija augstāka, salīdzinot ar ložņu āboliņu, kas atbilst arī literatūrā sniegtajai informācijai, ka sāls tolerantāki augi uzkrāj vairāk  $\text{Na}^+$  lapās (Staal 1991, Rogers et al. 1997), kā arī parādās tendence, ka ar savu inokulantu apstrādātajiem augiem pieaug Na jonu koncentrācija (11. attēls) un tā bija lielāka lapu kātos. Savukārt vairākiem variantiem koncentrācija būtiski nepieauga, vai arī pieauga un tad atkal samazinājās, kas varētu liecināt par augu spēju adaptēties, jo augs uzstur augstāku jonu koncentrāciju saknēs un vecās lapās (Rogers et al 1997), vai arī saknes jau sākotnēji izslēdz pārāk lielu jonu uzņemšanu, un izmantotā sāls koncentrācija nerasniedz toksisku līmeni.

Inokulantu pozitīvo ietekmi varēja redzēt jau vizuāli, jo augi ar rizobiju apstrādi bija zaļāki, kas liecināja par augstāku hlorofila līmeni, jau 3,5 nedēļas pēc eksperimenta sākuma, to atainoja arī hlorofila koncentrācijas samazināšanās bez inokulanta variantos, kas apliecina, ka inokulanti ir efektīvi slāpekļa piesaistītāji, jo hlorofila, līdzīgi kā citu bioķīmisku savienojumu, sastāvā ir slāpekļis (Mandal 2014), bet abiem variantiem hlorofila koncentrācija -i variantos stabilizējās un pieauga, kas izskaidrojams ar kontamināciju, ko apliecināja

gumiņu konstatēšana uz kontroles augu saknēm, jo ir ļoti grūti nodrošināt ilglaicīgu sterilitāti, un rizobijas ļoti viegli izplatās (Duodu et al. 2005). Viens no iemesliem, kādēļ NaCl ietekmē samazinājās hlorofila koncentrācija, ir dzelzs trūkums, kas nepieciešamas hlorofila sintēzē, bet sāļainā augsnē ir apgrūtināta šī elementa uzņemšana (Karlsone 2012). Kā arī -i variantos parādījās, ka zemeņāboliņš ir tolerantāks, jo hlorofila koncentrācija pazeminājās mazāk nekā tā paša varianta ložņu āboliņa augiem. Starpsugu kopkultivācijas konkurences pazīmes nenovēroja hlorofila koncentrācijas izmaiņas. Sāls ietekme bija visnotaļ maz izteikta, izņemot ložņu āboliņu.

Hlorofila fluorescences rādītājs *Performance Index* arī parādīja inokulantu efektivitāti, bet neparādījās inokulantu specifiskums, toties bija redzama to kopējā efektivitāte, jo -i variantos konstatēja zemāku *Performance index*, ko varētu ietekmēt arī konstatētais hlorofila koncentrācijas samazinājums. Kopkultivācijas variantos hlorofila koncentrācijai bija vērojama lielākas svārstības eksperimenta laikā, kam par iemeslu varētu būt gumiņbaktēriju savstarpējā konkurence (Chanway et al. 1985, Maj et al. 2010).

Literatūrā atrodama informācija parāda, ka paaugstināta NaCl koncentrācija palielina gvajikola peroksidāzes aktivitāti (Wang et al. 2011). Zemāku peroksidāzes aktivitāti konstatēja lapu kātos, salīdzinot ar lapu plātnēm. Kopkultivējot ložņu āboliņu, parādījās tāda pati tendence, kā zemeņāboliņam, respektīvi, sāls apstrādes variantos arī samazinājās peroksidāzes aktivitāte, inokulanti ļoti būtiski palielināja aktivitāti ložņu āboliņam atsevišķajos variantos, ko varētu saistīt ar baktēriju simbiozes izveidošanos. Lapu kātos ložņu āboliņam salīdzinot ar zemeņāboliņu peroksidāzes aktivitāte bija būtiski augstāka, kas varētu liecināt par zemeņāboliņa pielāgotību sāļainai augsnei (Jimenez et al. 1997).

Polifenoloksidāzes būtisks pieaugums bija vērojams ložņu āboliņa lapu kātos inokulanta un kopkultivācijas +Na variantos, kas varētu liecināt par to, ka zemeņāboliņa ietekmē arī ložņu āboliņa tolerance pieaug (Chanway et al. 1985, Armas & Pugnaire 2011).

Informācija literatūrā liecina, ka mazāk jutīgām sugām pret NaCl, TBARS koncentrācija pieaug zemākā līmenī (Sairam & Srivastava 2002). Interesanti, ka zemeņāboliņam no atsevišķi audzētajiem variantiem tieši kontroles variantā bija visaugstākā TBARS koncentrācija un tā samazinājās inokulantu variantiem, bet ložņu āboliņam bija pretēja tendence, līdz ar to inokulanti samazināja sāls negatīvo ietekmi zemeņāboliņam, bet kopkultivācijas variantos tas vairs neizpaudās.

Lielais variantu un augu skaits radīja zināmas grūtības, tehnisku iemeslu dēļ analīzēm ievāca salīdzinoši maz paraugu vai arī veica nosacīti mazu mērījumu skaitu katram bioloģiskajam atkārtojumam, kas varēja ietekmēt gan sāls, gan gumiņbaktēriju, gan

kopkultivācijas noteikto atbildes reakciju rezultātus, kā arī neizdevās saglabāt inokulantu kontroles grupas sterilas, jo eksperimenta beigās konstatēja gumiņus.

## SECINĀJUMI

1. Zemeņāboliņam piemīt lielāka sāls tolerance, nekā ložņu āboliņam.
2. Gumiņbaktēriju inokulanti ir aktīvi, bet tie nav sugu specifiski.
3. Starpsugu kopkultivācija ietekmē augu fizioloģiju, kas negatīvāk izpaužas zemeņu āboliņam.
4. Ir iespējams veikt ekofizioloģijas eksperimentus kontrolētos apstākļos, kuru iegūtos rezultātus var ekstrapolēt brīvās dabas apstākļos.

## PATEICĪBAS

Pateicos darba vadītājam Dr. hab. biol., prof. Ģedertam Ieviņam par darba vadīšanu, kā arī paldies par metožu apgūšanu un konsultācijām Dr. biol. Unai Andersonei-Ozolai, Dr. biol. Inetai Samsonei un Elīnai Skutelei.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Aarssen, L. W., & Turkington, R. (1985). Biotic specialization between neighbouring genotypes in *Lolium perenne* and *Trifolium repens* from a permanent pasture. *The Journal of Ecology*, 605-614.
2. Agarwal, S., & Pandey, V. (2004). Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*, 48(4), 555-560.
3. Ayres, E., Dromph, K. M., Cook, R., Ostle, N., & Bardgett, R. D. (2007). The influence of below-ground herbivory and defoliation of a legume on nitrogen transfer to neighbouring plants. *Functional Ecology*, 21(2), 256-263.
4. Andrušaitis G. 2003. Latvijas Sarkanā grāmata, Retēs un apdraudētās augu un dzīvnieku sugas 3. Sējums Vaskulārie augi. Rīga. Pp. 3-18.
5. Aref, I. M., Khan, P. R., Khan, S., El-Atta, H., Ahmed, A. I., & Iqbal, M. (2016). Modulation of antioxidant enzymes in *Juniperus procera* needles in relation to habitat environment and dieback incidence. *Trees*, 30(5), 1669-1681.
6. Armas, C., & Pugnaire, F. I. (2011). Plant neighbour identity matters to belowground interactions under controlled conditions. *PloS one*, 6(11), e27791.
7. Ashraf, M. P. J. C., & Harris, P. J. C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant science*, 166(1), 3-16.
8. Ballhorn, D. J., & Elias, J. D. (2014). Salinity-mediated cyanogenesis in white clover (*Trifolium repens*) affects trophic interactions. *Annals of botany*, 114(2), 357-366
9. Bennani, K., & Bendaou, N. (2014). Physiology and ion relations in response to salinity in *Trifolium isthmocarpum* Brot. and *Lotus ornithopodioides* L. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 10(4).
10. Berstein, L., & Ogata, G. (1966). Effects of salinity on nodulation, nitrogen fixation, and growth of soybeans and alfalfa. *Agronomy Journal*, 58(2), 201-203
11. Blumwald, E., Aharon, G. S., & Apse, M. P. (2000). Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1), 140-151.
12. Bruno, J. F., Stachowicz, J. J., & Bertness, M. D. (2003). Inclusion of facilitation into ecological theory. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(3), 119-125.
13. Cekstere, G., Karlsons, A., & Grauda, D. (2015). Salinity-induced responses and resistance in *Trifolium repens* L. *Urban Forestry & Urban Greening*, 14(2), 225-236.
14. Chanway, C. P., Holl, F. B., & Turkington, R. (1989). Effect of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* genotype on specificity between *Trifolium repens* and *Lolium perenne*. *The Journal of Ecology*, 1150-1160.

15. Chen, B. J., During, H. J., & Anten, N. P. (2012). Detect thy neighbor: identity recognition at the root level in plants. *Plant Science*, 195, 157-167.
16. Comba, M. E., Benavides, M. P., & Tomaro, M. L. (1998). Effect of salt stress on antioxidant defence system in soybean root nodules. *Functional Plant Biology*, 25(6), 665-671.
17. Cramer, G. R., & Bowman, D. C. (1991). Kinetics of maize leaf elongation I. Increased yield threshold limits short-term, Steady-state elongation rates after exposure to salinity. *Journal of Experimental Botany*, 42(11), 1417-1426
18. Kroon, H. (2007). How do roots interact?. *Science*, 318(5856), 1562-1563.
19. Denarie, J., Debelle, F., & Rosenberg, C. (1992). Signaling and host range variation in nodulation. *Annual reviews in Microbiology*, 46(1), 497-531.
20. Dixon, R. A., & Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*, 7(7), 1085.
21. Dudley, S. A., & File, A. L. (2007). Kin recognition in an annual plant. *Biology Letters*, 3(4), 435-438.
22. Duodu, S., Nsiah, E. K., Bhuvanewari, T. V., & Svenning, M. M. (2006). Genetic diversity of a natural population of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* analysed from field nodules and by a plant infection technique. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(5), 1162-1165.
23. Emery, N. C., Ewanchuk, P. J., & Bertness, M. D. (2001). Competition and salt-marsh plant zonation: stress tolerators may be dominant competitors. *Ecology*, 82(9), 2471-2485.
24. Flowers, T. J., Troke, P. F., & Yeo, A. R. (1977). The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual review of plant physiology*, 28(1), 89-121.
25. Fricke, W., & Peters, W. S. (2002). The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. *Plant Physiology*, 129(1), 374-388.
26. Fricke, W., Akhiyarova, G., Veselov, D., & Kudoyarova, G. (2004). Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate in response to salinity in barley leaves. *Journal of Experimental Botany*, 55(399), 1115-1123.
27. Galloway, A., Cables, J., Parsons, D., Lane, P., & Hall, E. (2010). Growth and development of Lotus and Trifolium species under saline and waterlogging conditions. In *Proceedings of the 15th Agronomy Conference*.
28. Gauch, H. G., & Magistad, O. C. (1943). Growth of strawberry clover varieties and of alfalfa and ladino clover as affected by salt. *Journal of the American Society of Agronomy*

29. Gomez, J. M., Hernandez, J. A., Jimenez, A., Del Rio, L. A., & Sevilla, F. (1999). Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Radical Research*, 31(sup1), 11-18
30. Grime, J. P. (2006). *Plant strategies, vegetation processes, and ecosystem properties*. John Wiley & Sons.
31. Harper, J. L., & Clatworthy, J. N. (1963). The Comparative Biology of Closely Related Species: VI. ANALYSIS OF THE GROWTH OF TRIFOLIUM REPENS AND T. FRAGIFERUM IN PURE AND MIXED POPULATIONS. *Journal of Experimental Botany*, 14(1), 172-190.
32. Heidstra, R., & Bisseling, T. (1996). Nod factor-induced host responses and mechanisms of Nod factor perception. *New Phytologist*, 133(1), 25-43.
33. Honnay, O., & Jacquemyn, H. (2007). Susceptibility of common and rare plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation. *Conservation Biology*, 21(3), 823-831.
34. Honnay, O., & Jacquemyn, H. (2007). Susceptibility of common and rare plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation. *Conservation Biology*, 21(3), 823-831.
35. Yates, R. J., Howieson, J. G., Reeve, W. G., Brau, L., Speijers, J., Nandasena, K., ... & O'hara, G. W. (2008). Host–strain mediated selection for an effective nitrogen-fixing symbiosis between *Trifolium* spp. and *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(3), 822-833.
36. Yeo, A. R., Izard, P., Boursier, P. J., & Flowers, T. J. (1991). Short-and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 42(7), 881-889.
37. Jimenez, A., Hernandez, J. A., del Río, L. A., & Sevilla, F. (1997). Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant physiology*, 114(1), 275-284.
38. Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E., & Walker, G. C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology*, 5(8), 619-633
39. JØRGENSEN, F. V., & LEDGARD, S. F. (1997). Contribution from Stolons and Roots to Estimates of the Total Amount of N<sub>2</sub>Fixed by White Clover (*Trifolium repens*L.). *Annals of Botany*, 80(5), 641-648.
40. Kant, S., Kant, P., Raveh, E., & Barak, S. (2006). Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is

- responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of Na<sup>+</sup> uptake in *T. halophila*. *Plant, Cell & Environment*, 29(7), 1220-1234.
41. Karlsons, A. (2012). Minerālās barošanās adaptīvie mehānismi un minerālelementu nodrošinājuma īpatnības jūras piekrastes augiem.
  42. Kiegle, E., Moore, C. A., Haseloff, J., Tester, M. A., & Knight, M. R. (2000). Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *The Plant Journal*, 23(2), 267-278.
  43. Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., & Abdelly, C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(3), 244-249
  44. Lankau, R. A. (2012). Coevolution between invasive and native plants driven by chemical competition and soil biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(28), 11240-11245.
  45. Andrušaitis G. (2003) Latvijas Sarkanā grāmata, Retās un apdraudētās augu un dzīvnieku sugas .3. sējums. Vaskulārie augi. Rīga
  46. Ledgard, S. F., & Steele, K. W. (1992). Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures. *Plant and soil*, 141(1-2), 137-153.
  47. Leger, E. A., & Espeland, E. K. (2010). Perspective: coevolution between native and invasive plant competitors: implications for invasive species management. *Evolutionary Applications*, 3(2), 169-178.
  48. Liancourt, P., Callaway, R. M., & Michalet, R. (2005). Stress tolerance and competitive-response ability determine the outcome of biotic interactions. *Ecology*, 86(6), 1611-1618.
  49. Logan, B. A. (2008). 10 Reactive oxygen species and photosynthesis. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, 250.
  50. Lopez, C. M. L., Takahashi, H., & Yamazaki, S. (2002). Plant–water relations of kidney bean plants treated with NaCl and foliarly applied glycinebetaine. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 188(2), 73-80.
  51. Maestre, F. T., & Cortina, J. (2004). Do positive interactions increase with abiotic stress? A test from a semi-arid steppe. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 271(Suppl 5), S331-S333.
  52. Maj, D., Wielbo, J., Marek-Kozaczuk, M., & Skorupska, A. (2010). Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiological research*, 165(1), 50-60.

53. Maj, D., Wielbo, J., Marek-Kozaczuk, M., Martyniuk, S., & Skorupska, A. (2009). Pretreatment of clover seeds with Nod factors improves growth and nodulation of *Trifolium pratense*. *Journal of chemical ecology*, 35(4), 479-487.
54. Manchanda, G., & Garg, N. (2008). Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(5), 595-618.
55. Mandal, H. K. (2014). Isolation of Salt Tolerant Strains of *Rhizobium Trifolii*. *Int. J. Agric. Food Sci. Technol*, 5, 325-332.
56. Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H. G., & Foyer, C. H. (1996). Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS letters*, 378(3), 203-206.
57. Melino, V. J., Drew, E. A., Ballard, R. A., Reeve, W. G., Thomson, G., White, R. G., & O'hara, G. W. (2012). Identifying abnormalities in symbiotic development between *Trifolium* spp. and *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* leading to sub-optimal and ineffective nodule phenotypes. *Annals of Botany*, mcs206.
58. Miller, S. H., Elliot, R. M., Sullivan, J. T., & Ronson, C. W. (2007). Host-specific regulation of symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Microbiology*, 153(9), 3184-3195.
59. Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment*, 25(2), 239-250.
60. Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytologist*, 167(3), 645-663.
61. Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651-681.
62. Nienartowicz, A., & Wilkoń-Michalska, J. (1993). The application of numerical analysis to comparison of ecological amplitudes of halophytic species. *Variability and Evolution*, 2(3), 103-112.
63. Passioura, J. B., & Munns, R. (2000). Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Functional Plant Biology*, 27(10), 941-948.
64. Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 180-201.
65. Poorter, H., Niklas, K. J., Reich, P. B., Oleksyn, J., Poot, P., & Mommer, L. (2012). Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. *New Phytologist*, 193(1), 30-50.
66. Priedītis N. 2014. Latvijas augi. Gandrs Poligrāfija. Pp. 303-304.

67. Pueppke, S. G., & Broughton, W. J. (1999). *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(4), 293-318.
68. Raven, J. A. (1985). Tansley Review. Regulation of pH and generation of osmolarity in vascular land plants: costs and benefits in relation to efficiency of use of water, energy and nitrogen. *New Phytol*, 101, 25-77.
69. Rogers, M. E., Noble, C. L., Halloran, G. M., & Nicolas, M. E. (1997). Selecting for salt tolerance in white clover (*Trifolium repens*): chloride ion exclusion and its heritability. *New Phytologist*, 135(4), 645-654.
70. Rogers, M. E., Noble, C. L., Nicolas, M. E., & Halloran, G. M. (1993). Variation in yield potential and salt tolerance of selected cultivars and natural populations of *Trifolium repens* L. *Crop and Pasture Science*, 44(4), 785-798.
71. Rumbaugh, M. D., Pendery, B. M., & James, D. W. (1993). Variation in the salinity tolerance of strawberry clover (*Trifolium fragiferum* L.). *Plant and Soil*, 153(2), 265-271.
72. Sairam, R. K., & Srivastava, G. C. (2002). Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. *Plant Science*, 162(6), 897-904
73. Sanchez, D. H., Lippold, F., Redestig, H., Hannah, M. A., Erban, A., Krämer, U., ... & Udvardi, M. K. (2008). Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*, 53(6), 973-987.
74. Sanchez, D. H., Pieckenstein, F. L., Szymanski, J., Erban, A., Bromke, M., Hannah, M. A., ... & Udvardi, M. K. (2011). Comparative functional genomics of salt stress in related model and cultivated plants identifies and overcomes limitations to translational genomics. *PloS one*, 6(2), e17094.
75. Staal, M., Maathuis, F. J., Elzenga, J. T. M., Overbeek, J. H. M., & Prins, H. (1991). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity in tonoplast vesicles from roots of the salt-tolerant *Plantago maritima* and the salt-sensitive *Plantago media*. *Physiologia Plantarum*, 82(2), 179-184.
76. Storey, R., & Walker, R. R. (1999). Citrus and salinity: a review. *Scientia Horticulturae* (Netherlands).
77. Svenning, M. M., Gudmundsson, J., Fagerli, I. L., & Leinonen, P. (2001). Competition for nodule occupancy between introduced strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and its influence on plant production. *Annals of Botany*, 88(suppl 1), 781-787.

78. Tester, M., & Davenport, R. (2003). Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annals of botany*, 91(5), 503-527.
79. Tharayil, N., Bhowmik, P., Alpert, P., Walker, E., Amarasiriwardena, D., & Xing, B. (2009). Dual purpose secondary compounds: phytotoxin of *Centaurea diffusa* also facilitates nutrient uptake. *New Phytologist*, 181(2), 424-434.
80. Thorpe, A. S., Aschehoug, E. T., Atwater, D. Z., & Callaway, R. M. (2011). Interactions among plants and evolution. *Journal of Ecology*, 99(3), 729-740.
81. Tuna, A. L., Kaya, C., Dikilitas, M., & Higgs, D. (2008). The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. *Environmental and Experimental Botany*, 62(1), 1-9.
82. Van Der Heijden, M. G., Bakker, R., Verwaal, J., Scheublin, T. R., Rutten, M., Van Logtestijn, R., & Staehelin, C. (2006). Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity in dune grassland. *FEMS Microbiology Ecology*, 56(2), 178-187.
83. Verslues, P. E., & Sharma, S. (2010). Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The arabidopsis book*, e0140.
84. Walker, T. S., Bais, H. P., Grotewold, E., & Vivanco, J. M. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant physiology*, 132(1), 44-51.
85. Wang, C. Q., Liu, T., & Xu, H. J. (2011). Ascorbate-glutathione metabolism during PEG-induced water deficit in *Trifolium repens*. *Russian journal of plant physiology*, 58(4), 597-602.
86. Wang, J., Drayton, M. C., George, J., Cogan, N. O., Baillie, R. C., Hand, M. L., ... & Forster, J. W. (2010). Identification of genetic factors influencing salt stress tolerance in white clover (*Trifolium repens* L.) by QTL analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 120(3), 607-619.
87. Wardle, D. A., Karban, R., & Callaway, R. M. (2011). The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. *Trends in ecology & evolution*, 26(12), 655-662.
88. Weidenhamer, J. D., & Callaway, R. M. (2010). Direct and indirect effects of invasive plants on soil chemistry and ecosystem function. *Journal of chemical ecology*, 36(1), 59-69.
89. White, A. C., Colmer, T. D., Cawthray, G. R., & Hanley, M. E. (2014). Variable response of three *Trifolium repens* ecotypes to soil flooding by seawater. *Annals of botany*, mcu118.

90. Zhu, Z., Wei, G., Li, J., Qian, Q., & Yu, J. (2004). Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science*, 167(3), 527-533.

Maģistra darbs „Gumiņbaktēriju simbiozes un augu mijiedarbības ietekme uz divu āboliņu sugu reakciju uz augsnes sāļumu ” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē Augu fizioloģijas katedrā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Kārlis Dūmiņš

datums

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr. hab. biol., prof. Ģederts Ieviņš

datums

Recenzents: *paraksts* Dr. biol., Asoc. prof. Uldis Kondratovičs

Darbs iesniegts Bioloģijas fakultātē 09.06.2017

Metodiķe: Diāna Marcinkēviča

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē

13.06.2017. prot. Nr. \_\_\_\_, vērtējums \_\_\_\_\_

Komisijas sekretārs/e: Dr. biol., asoc. prof. Līga Plakane