

DOI: <https://doi.org/10.61308/QLKP3659>

Концентрация на микроелементи в генотипи градински грах под влияние на инокулация с арбускуларни микоризни гъби и полезни ризобактерии

Славка Калъпчиева¹, Радка Божинова^{2*}, Цвета Христова²

¹Институт по зеленчукови култури „Марица“ - Пловдив, Селскостопанска академия

²Институт по тютюна и тютюневите изделия - с. Марково, област Пловдив, Селскостопанска академия

E-mail*: rbojinova@yahoo.com

Резюме

Проучено е влиянието на микробиалния инокулант Europlus®, съдържащ АМ гъби от р. *Glomus* и полезни ризобактерии от р. *Bacillus*, върху концентрацията на микроелементи (Fe, Mn, Zn и Cu) в надземната биомаса и корените на шест генотипа градински грах. Изследването е проведено при полски условия в опитното поле на ИЗК “Марица” върху Алувиално-ливадна почва.

Установено е, че микробиалният инокулант влияе слабо върху агрохимичните свойства на почвата. Комбинираният инокулант повишава концентрацията на Fe в надземната биомаса на болшинството генотипи с 2,4%-22,9%. Нарастването на желязото в корените е с 4,4%-12,6%. Наблюдава се повишение на Mn в надземната биомаса на някои генотипи от употребата на комбинирания продукт в интервала от 9,3% до 35,7%, на Zn – от 2,1% до 64,9% и на Cu – от 5,2% до 20,2%. Процентното увеличение на Mn в корените при различните генотипи е с 4,8%-35,1%, на Zn – от 5,3% до 20,8% и на Cu – от 3,3% до 24,4% в сравнение с нетретираните контроли.

Реакцията на отделните генотипи грах към образуване на симбиоза с АМ гъби е различна. Биоинокулантът увеличава степента на колонизация на корените с АМ гъби средно с над 7%. Корелационни зависимости са установени единствено с концентрациите на Fe.

Генотипният фактор е с по-силно влияние върху съдържанието на микроелементи в образците грах. Инокулацията с АМ гъби и полезни ризобактерии е с по-слаб, но достоверен ефект, по отношение на концентрацията на Fe, Mn и Zn в надземната биомаса и корените. Проведеният клъстерен анализ показва, че според съдържанието на микроелементи в надземната биомаса на граха, след инокулация, се формират два основни клъстера, а при корените три.

Ключови думи: генотипи градински грах, микробиална инокулация, *Glomus*, *Bacillus*, микроелементи

Micronutrient concentration in garden pea genotypes as affected by inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria

Slavka Kalapchieva¹, Radka Bozhinova^{2*}, Tsveta Hristeva²

¹Maritsa Vegetable Crops Research Institute - Plovdiv, Agricultural Academy

²Tobacco and Tobacco Products Institute - Markovo, Agricultural Academy

Corresponding author*: rbojinova@yahoo.com

Citation: Kalapchieva, S., Bozhinova, R., & Hristeva, T. (2024). Micronutrient concentration in garden pea genotypes as affected by inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria. *Bulgarian Journal of Soil Science Agrochemistry and Ecology*, 58(4), 21-34 (Bg).

Abstract

The influence of a microbial inoculant Europlus®, containing AM fungi (*Glomus* sp.) and beneficial rhizobacteria (*Bacillus* sp.), on the concentration of micronutrients (Fe, Mn, Zn and Cu) in the above-ground biomass and roots of six garden pea genotypes was studied. The experiment was conducted under field conditions in the Maritsa Vegetable Crop Research Institute on Alluvial-meadow soil.

It was found that the microbial inoculant had a weak effect on the agrochemical properties of the soil. The combined inoculation increased the concentration of Fe in the aboveground biomass of most genotypes by 2.4%-22.9%. The increase of iron in the roots was by 4.4%-12.6%. Application of combined inoculant, in some cases, increased the Mn concentration in the aboveground biomass of genotypes - by 9.3%-35.7% compared to the controls. This was associated with an increased in Zn concentrations (+2.1%-64.9%) and Cu concentrations (+5.2%-20.2%) in aboveground biomass of inoculated genotypes. Microbial inoculant application increased root Mn, Zn and Cu concentrations by 4.8%-35.1%, 5.3%-20.8% and 3.3%-24.4%, respectively, compared to non-inoculated controls.

The response of the individual pea genotypes to the formation of symbiosis with AM fungi was different. The bioinoculant increased root colonization rates with AM fungi by over 7% on average. A correlation was recorded only with Fe concentrations.

The genotype factor had a greater effect on the micronutrient concentrations in pea samples. Inoculation with AM fungi and beneficial rhizobacteria had a weaker effect, but it was also statistically significant in terms of the concentration of Fe, Mn and Zn in aboveground biomass and roots.

Hierarchical cluster analysis classified the aboveground samples of pea genotypes from the inoculated and non-inoculated treatments into two main clusters based on the concentration of micronutrients. The 12 root samples were divided into 3 groups.

Key words: garden pea genotypes, microbial inoculation, *Glomus*, *Bacillus*, micronutrients

Въведение

Грахът (*Pisum sativum*) е третото най-важно бобово растение от семейство *Fabaceae*, използвано за храна. Отглежда се по целия свят, включва се в диетата на човека както в прясно, така и в преработено или сушено състояние, използва се и като фуражна култура за изхранване на животните (Hacisalihoglu et al., 2021).

Съвременното селскостопанско производство има за цел да осигури повече храна за нарастващото население в световен мащаб, както и да намали щетите от това производство върху околната среда (Jones et al., 2017). Широко застъпена, за увеличаване на добивите от културите, е употребата на химически торове и пестициди. Безразборното използване на тези химикали засяга не само растежа на растенията поради натрупването на токсични съединения, но също така влошава качеството и свойствата на почвата (Kumari et al., 2022). Като алтернатива на химическите торове се предлагат разнообразни по своя произход и състав биопродукти. Нараства употребата на биопрепарати, разработени на базата на арбускуларни микоризни гъби (АМГ) и/или ризобактерии, стимулиращи растежа на растенията (PGPR). Тези почвени микроорганизми имат ключова роля за здравето на почвата, биоразнообразието и продуктивността на екосистемите (Fasusi et al., 2023). Микробиалните инокуланти са ефективен инструмент за оптимизиране на кореновата система, за подобряване на усвояването на хранителни вещества от растенията, както и за повишаване на толерантността им към стресови фактори на околната среда (Colla et al., 2020). Микоризната инокулация може да повлияе на минералното хранене на растението гостоприемник директно - чрез засилване на растежа на растението посредством усвояването на хранителни вещества от гъбичките или косвено чрез модифициране на скоростта на транспирацията и състава на ризосферната микрофлора (Marschner & Dell, 1994). Полезните ризобактерии (PGPR) променят физиологията на растението, подобряват активността на кореновата система и усвояването на хранителни

вещества (Khoso et al., 2023).

Инокулацията с АМ гъби и/или полезни ризобактерии има потенциал за подобряване на храненето, растежа и развитието на редица култури (Elkoca et al., 2010; Colla et al., 2020; Sun & Shahrajabian, 2023; Fasusi et al., 2023; Jalal et al., 2024).

Бобовите растения, включително градинския грах (*Pisum sativum* L.), са в състояние активно да взаимодействат с широк спектър от почвени микроорганизми и да образуват тристранна симбиоза с diazotрофни бактерии от р. *Rhizobium* и с АМ гъби (Radhakrishnan et al., 2020). Тези взаимодействия са полезни както за растението гостоприемник, така и за околната среда. Участието им в биологичната фиксация на азота, чрез уникалната им способност да встъпват във взаимоотношения с *Rhizobium* бактерии ги прави едни от най-подходящите земеделски култури за отглеждане според концепцията за устойчиво земеделие (Zhukov et al., 2021).

Нормалната жизнена дейност на растителния организъм е възможна само при наличие на необходимите хранителни елементи, в т.ч. микроелементи. Микроелементите мед (Cu), манган (Mn) и желязо (Fe) са важни за синтеза на протеини, липиди и въглехидрати в растенията (Marschner, 1995). Цинкът също е основен микронутриент, необходим за различните физиологични и биохимични процеси в тях. Недостигът му влияе върху растежа и развитието на растенията, намалявайки добивите и хранителните качества (Jalal et al., 2024). Усвояването на микроелементите от ризосферата е първата стъпка към акумулирането им в растението преди транслокацията към семената (Waters & Sankaran, 2011). АМ гъби образуват подземни извънкоренови хифи и улесняват достъпа на растенията до хранителни вещества, особено тези, чиито йони са слабо подвижни или такива, които присъстват в ниска концентрация в почвения разтвор (Smith & Read, 2010). Установено е, че АМ гъби подобряват усвояването на микроелементи при много селскостопански култури, включително зърнени, бобови и зеленчуци (Tran et al., 2019;

De Santis et al., 2022). Инокулирането с полезни бактерии е в състояние също да увеличи достъпните форми на елементите в почвата и да насърчи усвояването на хранителни вещества от растенията. Ризобактериите от р. *Bacillus* повишават съдържанието на усвоимите Fe, Mn и Zn в почвата вследствие на понижението на рН в ризосферата и повишената минерализация на органичния комплекс (Orhan et al., 2006). Докладвано е, че инокулацията с полезни ризобактерии повишава концентрацията на микроелементи в листата на малини (Orhan et al., 2006), пшеница (Rana et al., 2012), сорго (Abbaszadeh-Dahaji et al., 2020), ечемик (Zaib et al., 2023) и др.

Ефектът от микробиалните продукти, разработени на база АМ гъби и бактерии, стимулиращи растежа, зависи от редица условия като състав на инокулантите, растителен вид и сорт, почвени условия (Zhukov et al., 2021; Fasusi et al., 2023; Sun & Shahrajabian, 2023).

Целта на настоящия експеримент беше да се проучи влиянието на комбинираната употреба на арбускуларни микоризни гъби и полезни ризосферни бактерии върху концентрацията на микроелементи в надземната биомаса и корените на генотипи градински грах.

Материали и методи

За целите на изследването е изведен полски опит по блоков метод в три повторения в ОП на ИЗК “Марица” върху Алувиално-ливадна почва (Mollic Fluvisol). Изследванията са проведени върху шест генотипа градински грах (*Pisum sativum* L.), групирани като такива с обикновен тип листа (сорт Марси, сорт Пловдив и Линия ИЗК-22/16-n) и с афилатен тип листа (сорт Ечо, сорт Казино и Линия ИЗК-22/16-af).

За проследяване влиянието на АМ гъби от р. *Glomus* и полезни ризобактерии (PGPR) от р. *Bacillus* върху концентрацията на микроелементи (Fe, Mn, Zn и Cu) в надземната биомаса и корените на посочените генотипи грах е използван комбиниран микробиален инокулант. Продуктът Europlus® е производство на EUROVIX, Италия. Съдържа 2% спори от

АМ гъби - *Glomus* и бактерии от род *Bacillus* - плътност 1.2×10^9 CFU/g. Внесен е по време на сеитбата на граха в доза 0,5 kg/da. Приложена е стандартна технология за отглеждане на градински грах.

Проучени са вариантите:

T1 – сорт Марси, без инокулация на микробиален продукт;

T2 – сорт Марси+микробиална инокулация (*Glomus* sp. и *Bacillus* sp.);

T3 – сорт Пловдив, без инокулация на микробиален продукт;

T4 – сорт Пловдив+микробиална инокулация (*Glomus* sp. и *Bacillus* sp.);

T5 – Линия ИЗК-22/16-n, без инокулация на микробиален продукт;

T6 – Линия ИЗК-22/16-n+микробиална инокулация (*Glomus* sp. и *Bacillus* sp.);

T7 – Линия ИЗК-22/16-af, без инокулация на микробиален продукт;

T8 – Линия ИЗК-22/16-af+микробиална инокулация (*Glomus* sp. и *Bacillus* sp.);

T9 – сорт Казино, без инокулация на микробиален продукт;

T10 – сорт Казино+микробиална инокулация (*Glomus* sp. и *Bacillus* sp.);

T11 – сорт Ечо, без инокулация на микробиален продукт;

T12 – сорт Ечо+микробиална инокулация (*Glomus* sp. и *Bacillus* sp.).

За установяване влиянието на микробиалния продукт върху свойствата на почвата е направен агрохимичен анализ на почвени проби от определени варианти (групирани по генотипи грах „обикновен” - сорт Марси и „афила” - сорт Казино, с инокулация и без инокулация с биопродукта), взети от ризосферната зона на растенията във фаза цъфтеж. Определена е реакцията на почвата (рН_{Н2О} – потенциометрично) и съдържанието на подвижните форми на Fe, Mn, Zn и Cu. За извличането на микроелементите от почвата е използван разтвор на 0,005M DTPA + 0,1M ТЕА, рН = 7,3.

Растителни проби от всички варианти (надземна биомаса и корени), взети във фаза цъфтеж, са анализирани за съдържание на желязо, манган, цинк и мед - след сухо опепеляване

на растителния материал в муфелна пещ при 500° C за 5 часа и разтваряне на пепелта в 3M HCl.

За определяне съдържанието на елементите в почвените и растителните проби е използван атомно-абсорбционен спектрометър “SpektrAA 220”, Varian.

Колонизация на корените на образците грах с АМ гъби

Оценка на колонизацията с АМ гъби (%) е направена на произволни подпроби от коренови сегменти (\geq от 100 сегмента с дължина 10-15 mm) на растения от всеки генотип, вкл. и от неинокулирани, с цел да се определи естествената колонизация от местни АМ гъби в почвата. Анализът е извършен съгласно процедура описана от Koske & Gemma (1989), с последователно промиване с гореща 10% KOH, 2% HCl и оцветяване с 0,05% trypan-blue в кисел глицерол (90° C за 45 минути). Отчитането е направено под стереомикроскоп. Процентът на общата колонизация на корените е определен по метода на Giovannetti & Mosse (1980).

Обработката на данните е извършена чрез дескриптивна статистика, корелационен, дисперсионен и клъстерен анализ с помощта на програмния продукт IBM SPSS Statistics 24. Клъстерният анализ е проведен по агломеративния метод на Ward (1963), а мярка за сходство е евклидовото разстояние.

Резултати и обсъждане

Почвена характеристика

Резултатите от агрохимичния анализ на почвените проби са отразени в таблица 1. Въвеждането на микробиалния продукт в почвената среда не променя нейната реакция. Варирането на рН е много слабо, в границите на неутралната реакция. Резултатите са в унисон с установената от Belimov et al. (2020) липса на ефект от инокулацията с микробен консорциум, включващ АМГ, бактерии от р. *Rhizobium* и PGPR, върху рН на ризосферата на сортове грах. От друга страна, Orhan et al. (2006) съобщават, че бактериалните инокулации с два щама *Bacillus* понижават нивото на рН

на експерименталната почва от 6,7 на 5,6–6,0, което обясняват с производството на органични киселини от бактериите. Разнопосочно е влиянието на микробиалния инокулант върху съдържанието на подвижното желязо в почвата. При сорт Марси е регистрирано понижение при третиране с Europlus - със 17,3% спрямо неинокулирания вариант, а при сорт Казино разликата между варианта с микробиален продукт и този без инокулация е незначителна. Според İpek & Eşitken (2017) някои ризобактерии увеличават достъпността на Fe в почвата поради отделянето на органични киселини и понижаването на рН или синтезиране на нискомолекулни хелатиращи агенти (siderофори). Съдържанието на усвоим манган в почвата при сорт Казино се повишава от инокулирането с микробиалния продукт (с 22,3%), а при сорт Марси тенденцията е противоположна. При двата сорта, стойностите на подвижният цинк в почвата са малко по-ниски при вариантите с микробиалния продукт. Съдържанието на подвижна мед в почвата се променя незначително от експериментирания вариант. Подобни резултати са получени от Yadav et al. (2018), според които инокулирането на АМ гъби (*Glomus mosseae*) не променя съществено съдържанието на микроелементите в почвата в сравнение с нетретираната контрола.

Изменчивостта на рН и на подвижните Fe, Zn и Cu в почвата от генотипа и микробиалната инокулация е слаба. По-голямо вариране е установено при Mn, където CV е 15,6%.

Степен на микоризация на корените

Степента на колонизация на контролните растения с АМ гъби от естествената популация в почвата е 11%-15% при сортовете грах с обикновен тип листа. При афилатните сортове тя е по-висока - между 16%-26%. Внасянето на комбинирания продукт увеличава процента на колонизация. При отделните генотипи с обикновен тип листа тя е между 19%-24%, а при тези с афилатен тип листа е между 26%-29% (фиг. 1). Ефектът на продукта е по-значим при групата сортове с обикновен тип листа. Относителният дял на увеличението изразено в проценти спрямо контролите при тази група

Таблица 1. Характеристика на почвата – рН и съдържание на подвижни форми на микроелементите (mg/kg)

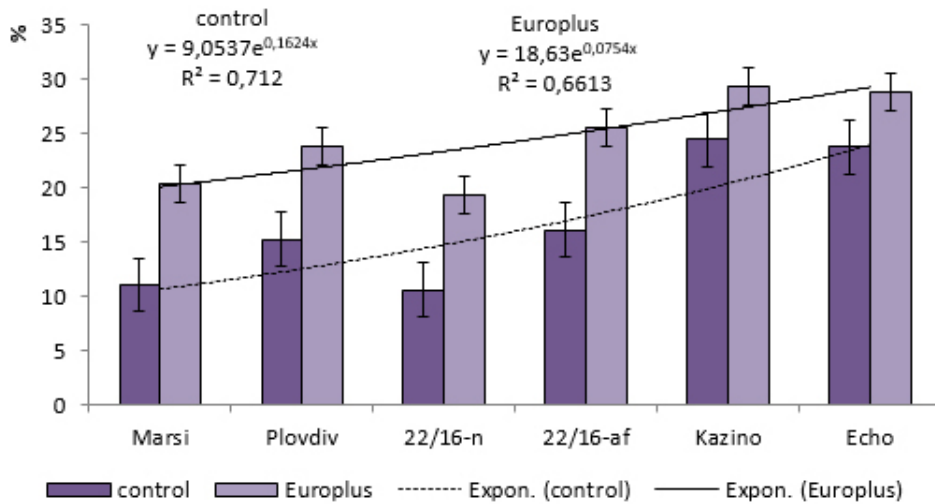
Table 1. Soil reaction and trace element content (mg/kg), extracted by ДТРА

Генотип/ Genotype	Микробна инокулация/ Microbial inoculation	pH	Fe	Mn	Zn	Cu
Марси/ Marsi	Non-inoculated control	7,10	27,8	38,6	1,5	6,1
Марси/ Marsi	AMF+PGPR	7,08	23,0	33,7	1,4	5,6
Казино/ Kazino	Non-inoculated control	7,01	27,8	39,9	1,5	5,7
Казино/ Kazino	AMF+PGPR	7,03	27,0	48,8	1,2	5,9
CV %		0,60	8,70	15,64	10,1	3,81

Таблица 2. Концентрация на микроелементи в надземната биомаса на генотипи градински грах, след микробна инокулация с Europlus (*Glomus* и *Bacillus*)

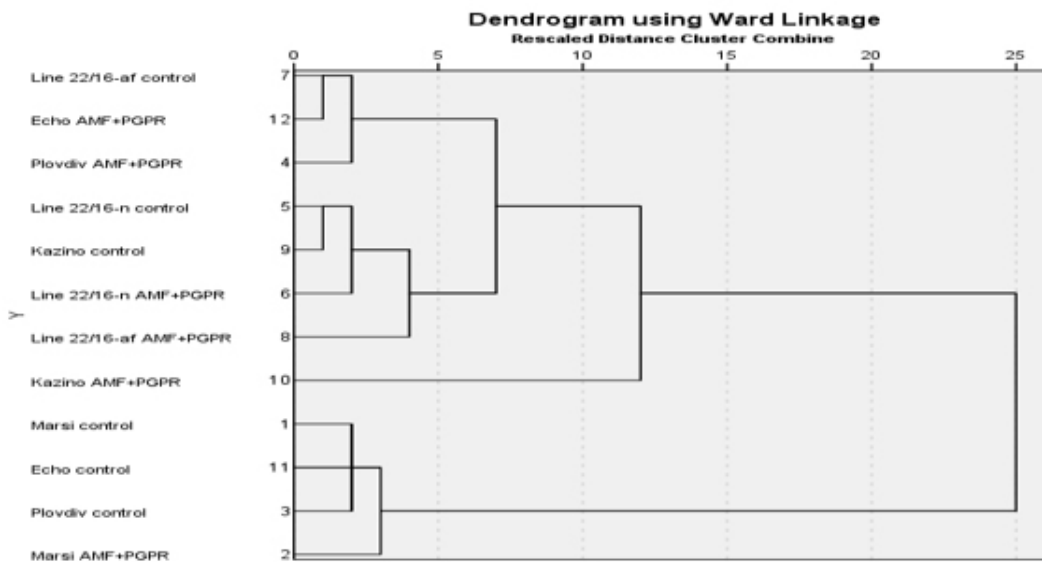
Table 2. Micronutrient concentration in the aboveground biomass of garden pea genotypes, after microbial inoculation with Europlus (*Glomus* and *Bacillus*)

Генотип/ Genotype	Микробна инокулация/ Microbial inoculation	Fe, mg/kg	Mn, mg/kg	Zn, mg/kg	Cu, mg/kg
Марси/ Marsi	Non-inoculated control	264,4	37,9	28,4	14,5
Марси/ Marsi	AMF+PGPR	246,1	37,0	26,3	12,8
Пловдив/ Plovdiv	Non-inoculated control	258,1	23,7	18,2	15,5
Пловдив/ Plovdiv	AMF+PGPR	293,3	25,9	23,5	16,3
Линия 22/16-n/ Line 22/16-n	Non-inoculated control	320,6	43,7	17,1	11,9
Линия 22/16-n/ Line 22/16-n	AMF+PGPR	328,4	43,2	28,2	14,3
Линия 22/16-af/ Line 22/16-af	Non-inoculated control	303,4	37,8	24,3	15,4
Линия 22/16-af/ Line 22/16-af	AMF+PGPR	345,8	35,5	24,8	12,2
Казино/Kazino	Non-inoculated control	315,7	34,3	23,4	14,2
Казино/Kazino	AMF+PGPR	387,9	41,7	30,4	11,9
Ечо/Echo	Non-inoculated control	273,3	29,7	18,8	15,2
Ечо/Echo	AMF+PGPR	304,8	40,3	20,7	16,8
	Mean	303,48	35,89	23,68	14,25
	Minimum	246,10	23,70	17,10	11,90
	Maximum	387,90	43,70	30,40	16,80
	CV %	13,28	18,14	18,12	11,93



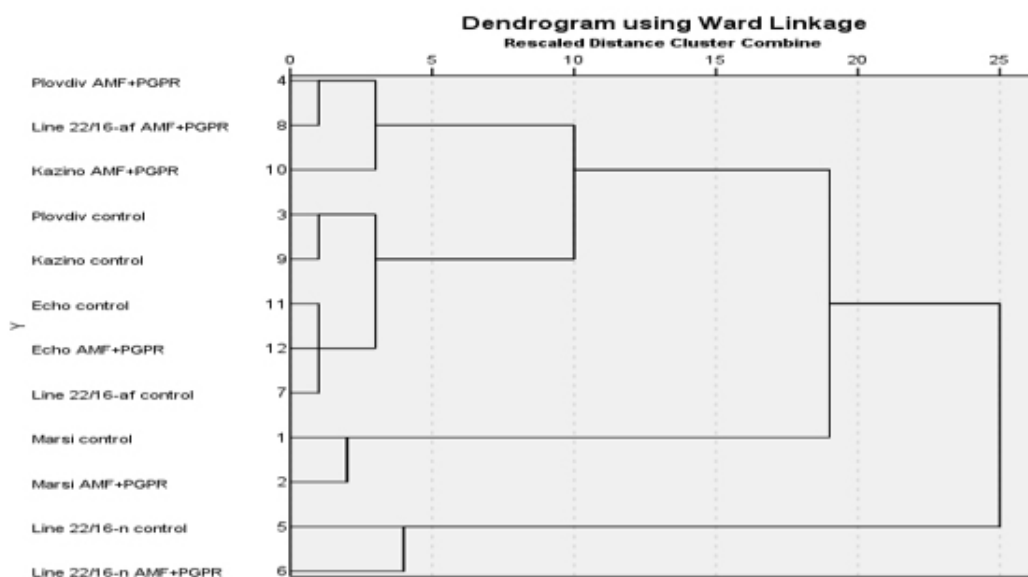
Фиг. 1. Степен на колонизация (%) на корените при генотипи градински грах, след микробиална инокулация с Europlus (*Glomus* и *Bacillus*)

Fig. 1. Degree of colonization (%) of the roots of garden pea genotypes, after microbial inoculation with Europlus (*Glomus* and *Bacillus*)



Фиг. 2. Групиране на генотипи градински грах, след микробиална инокулация с Europlus, според концентрацията на микроелементи в надземната биомаса

Fig. 2. Grouping of garden pea genotypes, after inoculation with Europlus, according to the micronutrient concentration in the aboveground biomass



Фиг. 3. Групиране на генотипи градински грах, след микробиална инокулация с Europlus, според концентрацията на микроелементи в корените

Fig.3. Grouping of garden pea genotypes, after inoculation with Europlus, according to the micronutrient concentration in the roots

Таблица 3. Концентрация на микроелементи в корените на генотипи градински грах, след микробиална инокулация с Europlus (Glomus и Bacillus)

Table 3. Micronutrient concentration in the roots of garden pea genotypes, after microbial inoculation with Europlus (Glomus and Bacillus)

Генотип/ Genotype	Микробиална инокулация/ Microbial inoculation	Fe, mg/kg	Mn, mg/kg	Zn, mg/kg	Cu, mg/kg
Марси/Marsi	Non-inoculated control	2195,4	144,2	35,7	15,0
Марси/Marsi	AMF+PGPR	2075,6	100,9	37,6	13,6
Пловдив/ Plovdiv	Non-inoculated control	2672,4	129,1	36,1	15,3
Пловдив/ Plovdiv	AMF+PGPR	2789,6	135,3	43,6	15,9
Линия 22/16-n/Line 22/16-n	Non-inoculated control	3203,7	123,4	36,6	13,1
Линия 22/16-n/Line 22/16-n	AMF+PGPR	3443,3	155,8	40,0	16,3
Линия 22/16-af/Line 22/16-af	Non-inoculated control	2513,5	95,2	29,3	15,1
Линия 22/16-af/Line 22/16-af	AMF+PGPR	2778,2	128,6	33,1	15,6
Казино/Kazino	Non-inoculated control	2628,9	115,5	35,6	14,0
Казино/Kazino	AMF+PGPR	2961,0	113,1	31,4	12,4
Ечо/Echo	Non-inoculated control	2552,6	115,4	42,8	15,2
Ечо/Echo	AMF+PGPR	2535,1	145,4	39,5	16,8
	Mean	2695,78	125,16	36,78	14,86
	Minimum	2075,60	95,20	29,30	12,40
	Maximum	3443,30	155,80	43,60	16,80
	CV %	14,25	14,58	11,66	8,95

Таблица 4. Дисперсионен анализ на данните за концентрацията на микроелементи в надземната биомаса на генотипи градински грах, след микробиална инокулация с Europlus
Table 4. Analysis of variance of the data on the micronutrient concentration in the aboveground biomass of garden pea genotypes, after microbial inoculation with Europlus

Показател/ Indicator	Източник на вариране/ Source of variation	SS	df	MS	F	SS (%)	P-value
Fe	Microbial inoculation (A)***	7278,468	1	7278,46	42,582	12,62	0,000
	Genotype (B)***	39171,553	5	7834,31	45,777	67,85	0,000
	A*B***	7164,669	5	1432,93	8,373	12,41	0,000
	Грешка/Error	4107,340	24	171,14		7,12	
	Общо/Total	57731,030	35				
Mn	Microbial inoculation (A)***	68,063	1	68,06	18,841	4,58	0,000
	Genotype (B)***	1130,383	5	226,08	62,582	76,14	0,000
	A*B***	199,403	5	39,88	11,040	13,43	0,000
	Грешка/Error	86,700	24	3,61		5,84	
	Общо/Total	1484,548	35				
Zn	Microbial inoculation (A)***	140,423	1	140,423	99,063	21,89	0,000
	Genotype (B)***	294,635	5	58,931	41,574	45,92	0,000
	A*B***	172,433	5	34,487	24,329	26,88	0,000
	Грешка/Error	34,020	24	1,418		5,31	
	Общо/Total	641,528	35				
Cu	Microbial inoculation (A) ^{n.s.}	2,723	1	2,72	2,523	2,82	0,125
	Genotype (B)***	32,723	5	6,55	6,064	33,88	0,001
	A*B***	35,243	5	7,05	6,531	36,49	0,001
	Грешка/Error	25,900	24	1,08		26,81	
	Общо/Total	96,588	35				

*, **, *** Significant at the 0.05, 0.01 and 0.001 probability levels, respectively; n.s. – not significant

е 56%-85%, а при групата с афилатен тип листа - с 20%-59%. Средната разлика с контролните варианти е 7,69%, доказана при $p < 0,95$ ($t_{\text{exp}} = 2,567 > t_{0,95} = 1,812$).

Наблюдаваните разлики в колонизацията при отделните генотипи грах може да се дължи на генетична обусловеност на тяхната реакция към симбиоза с АМ гъби или на видовия състав на местните популации АМГ. Причината вероятно са специфични генотипни различия в спектъра на фитохормоналния състав на кореновите отделяния или количеството на продуцирани сигнални молекули от стриголактонов тип, които индуцират покълване на спорите на

АМ гъбите.

Съдържание на микроелементи в растенията

Получените резултати показват, че концентрациите на желязо в надземната биомаса и корените от вариантите с микробиалния инокулант, с малки изключения, са по-високи от регистрираните стойности при нетретираните растения (таблици 2 и 3). Ефектът от микробиалния инокулант върху усвояването на микроелементите, в т.ч. на желязото, зависи от генотипа. С най-висока концентрация на желязо в надземната биомаса (387,9 mg/kg) се отличава сорт Казино, инокулиран с АМ гъби и полезни ризобактерии, а най-ниска е концентрацията на елемента в биомасата и

Таблица 5. Дисперсионен анализ на данните за концентрацията на микроелементи в корените на генотипи градински грах, след микробиална инокулация с Europlus

Table 5. Analysis of variance of the data on the micronutrient concentration in the roots of garden pea genotypes, after microbial inoculation with Europlus

Показател/ Indicator	Източник на вариране/ Source of variation	SS	df	MS	F	SS (%)	P-value
Fe	Microbial inoculation (A)***	1666518,4	1	1666518,4	26,156	3,32	0,000
	Genotype (B)***	4467402,9	5	893480,6	140,34	89,00	0,000
	A*B***	232646,6	5	46529,3	7,309	4,63	0,000
	Грешка/Error	152792,3	24	6366,3		3,05	
	Общо/Total	5019360,3	35				
Mn	Microbial inoculation (A)***	793,361	1	793,4	25,497	6,76	0,000
	Genotype (B)***	3518,082	5	703,6	22,613	29,96	0,000
	A*B***	6683,876	5	1336,8	42,962	56,92	0,000
	Грешка/Error	746,767	24	31,1		6,36	
	Общо/Total	11742,086	35				
Zn	Microbial inoculation (A)*	20,703	1	20,7	6,945	3,05	0,014
	Genotype (B)***	436,463	5	87,3	29,285	64,22	0,000
	A*B***	150,883	5	30,2	10,124	22,20	0,000
	Грешка/Error	71,540	24	2,98		10,53	
	Общо/Total	679,588	35				
Cu	Microbial inoculation (A) ^{n.s.}	2,103	1	2,1	2,533	2,70	0,127
	Genotype (B)***	31,093	5	6,2	7,492	39,91	0,000
	A*B***	24,793	5	4,95	5,974	31,82	0,001
	Грешка/Error	19,920	24	0,83		25,57	
	Общо/Total	77,908	35				

*, **, *** Significant at the 0.05, 0.01 and 0.001 probability levels, respectively; n.s. – not significant

корените на инокулираните растения от сорт Марси. Увеличението на желязото в надземната биомаса на различните генотипи, инокулирани с комбинирания продукт е от 2,4% до 22,9%, най-голямо при сорт Казино. Нарастване на желязото в корените на сорт Пловдив, сорт Казино, Линия 22/16-n и Линия 22/16-af от микробиалния инокулант е с 4,4% до 12,6%. Сведенията за ефекта на микоризната колонизация върху усвояването на Fe от растенията са непоследователни, като се счита че ефектът е по-значим при корените (Lehmann & Rillig, 2015). Според Orhan et al. (2006), използването на бактерии от р. *Bacillus* като биоинокуланти

повишава съдържанието на Fe и Mn в листата на малини, което обясняват с отделянето на органични киселини от растенията и бактериите в ризосферата, което води до понижаване на рН на почвата и до нарастване достъпността на тези елементи. Решаващо значение върху съдържанието на Fe в надземната биомаса и в корените оказва генотипът – 67,85%-89,0% от варирането (таблици 4 и 5). Ефектът от микробиалната инокулация е по-слаб (3,32%-12,62% от варирането), но също е статистически доказан.

Концентрацията на манган в растенията не

се променя закономерно по варианти (таблици 2 и 3). Най-висока е концентрацията на елемента в надземната биомаса на Линия 22/16-п, без инокулация, а при корените – при същия генотип, третиран с микробиален продукт. Комбинираният микробиален инокулант повишава съдържанието на Mn в надземната биомаса на сортовете Пловдив, Казино и Ечо, съответно с 9,3%, 21,6% и 35,7% спрямо нетретирани контроли. При корените е регистрирано нарастване с 4,8%-35,1% при сорт Пловдив, Линия 22/16-п, Линия 22/16-af и сорт Ечо. В други изследвания е установено, че усвояването на Mn е по-ниско в микоризни растения (Corrêa et al., 2014), но се съобщава и за случаи на по-високо поглъщане (Lehmann & Rillig, 2015). Предполага се, че тези разнопосочни ефекти се дължат на промяна в състава и активността на ризосферните микробни съобщества и по-конкретно на числеността на Mn редуциращите микроорганизми (Ferrol et al., 2016). Baslam et al. (2011) свързват по-ниската концентрация на някои минерални хранителни елементи (в т.ч. Mn) с подобрения растеж на инокулираните с АМГ растения и ефекта на разреждане и понижаване концентрациите на елементите. Влиянието на генотипния фактор върху концентрацията на Mn в надземната биомаса и корените е статистически доказано и на него се дължи 29,96%-76,14% от варирането в данните (таблици 4 и 5). Влиянието на инокулацията е по-слабо - 4,58%-6,76%, но също е доказано статистически.

Концентрацията на цинка в биомасата варира от 17,1 до 30,4 mg/kg, най-висока при сорт Казино с приложение на микробиалния продукт, а най-ниска при нетретирани растения от Линия 22/16-п (таблица 2). Концентрацията на Zn в корените е най-висока при сорт Пловдив с инокулация (43,6 mg/kg), а при Линия 22/16-af, без инокулация, е най-ниска (29,3 mg/kg) (таблица 3). Микробиалният продукт, в болшинството случаи, повишава съдържанието на цинк в растенията. Процентното увеличение на Zn в надземната биомаса при различните генотипи е с 2,1%-64,9% спрямо неинокулираните варианти, а при корените нарастването е с 5,3%-20,8%.

Резултатите съвпадат по посока с установено влияние на микоризната колонизация при други култури. Счита се, че колонизацията на корените с АМГ често води до повишено усвояване на относително слабо подвижни микроелементи като Zn и Fe (Rouphael et al., 2010). Goteti et al. (2013) допускат, че повишената разтворимост на цинка и усвояването му от царевични растения може да се дължи на производството на органични киселини от някои бактерии, като глюконова киселина (особено 2-кето-глюконова киселина). Данните от направения дисперсионен анализ показват, че от изследваните фактори по-голямо влияние върху съдържанието на цинк в растенията оказва генотипът (Фактор В) – 45,92%-64,22% от общото вариране на данните се дължи на него (таблици 4 и 5). Влиянието на микробиалния инокулант (Фактор А) върху този показател е по-слабо (3,05%-21,89%), но също е статистически значимо.

Съдържанието на Cu в надземната биомаса и корените е най-високо при сорт Ечо с приложение на Europlus (таблици 2 и 3). Концентрацията на елемента в биомасата е най-ниска при нетретирани растения от Линия 22/16-п (11,9 mg/kg), а при корените - в инокулирани растения от сорт Казино (12,4 mg/kg). Концентрацията на мед в растенията, при част от вариантите, се повишава от приложението на микробиалния продукт. Нарастване на Cu в надземната биомаса е установено при три генотипа - сорт Пловдив, Линия 22/16-п и сорт Ечо (с 5,2%-20,2% спрямо нетретирани контроли). Микробиалният инокулант повишава съдържанието на мед в корените на сорт Пловдив, Линия 22/16-п, Линия 22/16-af и сорт Ечо с 3,3% до 24,4% спрямо контролите. В изследване на Baslam et al. (2011) се посочва, че концентрацията на Cu в растенията нараства под влияние на АМ гъби. Elkoca et al. (2010) докладват за увеличение в съдържанието на мед в растения от фасул с 365,4% спрямо нетретирани контрола и с 366,7% в семената, при съвместна инокулация с някои видове бактерии (*Rhizobium*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus megaterium*). Решаващо значение върху съдържанието на Cu в надземната биомаса и в корените на граха оказва генотипът – от

33,88% до 39,91% от варирането (таблици 4 и 5). Ефектът от микробиалния инокулант е по-слаб (2,70%-2,82% от варирането) и не е доказан.

Варирането на концентрациите на микроелементите в надземната биомаса на градинския грах от изследваните фактори е средно по сила - CV е от 11,93% до 18,14%.

Варирането на концентрацията на Fe, Mn и Zn в корените от факторите генотип и микробиална инокулация е средно, а по-слабо е повлияна концентрацията на Cu (CV е 8,95%).

Корелационни зависимости между съдържанието на отделните микроелементи и процента колонизация с АМ гъби при генотипите грах са регистрирани само с концентрациите на Fe. В надземната биомаса зависимостта е средна, положителна и статистически значима при ниво на значимост 0,1 ($r = 0,528 \geq r_{\text{крит.}} = 0,497$ за $\alpha_{0,1}$ при $f=10$). В корените зависимостта е слаба, положителна и не е статистически значима ($r = 0,314 \leq r_{\text{крит.}} = 0,497$ за $\alpha_{0,1}$ при $f=10$). С останалите микроелементи стойностите на коефициента на Пирсън са ниски и не индикират наличие на корелационни зависимости.

В резултат на проведения йерархичен клъстерен анализ беше установено, че според концентрацията на микроелементи в надземната биомаса, генотипите грах, в условия на инокулиране, са групирани в два основни клъстера (фиг. 2). Първият клъстер в долната част на дендрограмата е представен от три сорта без инокулация на микробиален продукт (Марси, Ечо и Пловдив) и сорт Марси – инокулиран вариант. В този клъстер концентрацията на Fe, Mn, Zn и Cu варира съответно от 246,1 до 273,3 mg/kg, 23,7-37,9 mg/kg, 18,2-28,4 mg/kg и 14,5-15,5 mg/kg. Концентрацията на Fe в надземната биомаса на посочените сортове е под изчислената средна за настоящия експеримент (303,48 mg/kg), а на Cu е по-висока от средната за опита стойност от 14,25 mg/kg. Вторият клъстер включва останалите варианти, разпределени в три подгрупи. Като самостоятелна подгрупа се обособява сорт Казино (инокулиран вариант), който е с най-ниско съдържание на мед в

биомасата и най-високо - на желязо и цинк. Втората подгрупа включва два генотипа с инокулация и два без микробиален продукт. Концентрацията на желязо при тях превишава средната стойност за настоящия опит от 303,48 mg/kg, сравнително високо е и съдържанието на Mn в биомасата. Третата подгрупа е представена от два сорта с микробиален продукт (Пловдив и Ечо) и Линия 22/16-af без инокулация. Тези варианти се отличават с високо съдържание на мед, а концентрацията на желязо е близка до средната за надземната биомаса.

По съдържанието на микроелементи в корените на генотипите грах, инокулирани и нетретирани варианти, се формират три основни клъстера (фиг. 3). Първият клъстер включва Линия 22/16-n (контрола и с инокулация), които са с по-висока концентрация на Fe от останалите варианти и сравнително високо съдържание на Mn и Zn. Сорт Марси с микробиален продукт или без инокулация, отличаващи се с ниска концентрация на Fe, образуват също самостоятелен клъстер. Най-обширен е третият, който се разделя на две подгрупи. В първата подгрупа попадат четири генотипа без инокулация (Линия 22/16-af, Ечо, Казино и Пловдив) и сорт Ечо с комбинирания продукт. Концентрацията на желязо при тях е близка до средната стойност за корените (2695,78 mg/kg). Във втората подгрупа са три генотипа (сорт Казино, Линия 22/16-af и сорт Пловдив) в условия на инокулиране. Съдържанието на желязото при тях превишава средната за корените, установена в проучването.

Заклучение

Установено е, че микробиалният инокулант, базиран на АМ гъби от р. *Glomus* и ризобактерии от р. *Bacillus*, променя незначително агрохимичната характеристика на почвата, което се потвърждава от слабото вариране на повечето показатели (рН и подвижни форми на Fe, Zn и Cu). Съдържанието на подвижния Mn в почвата подлежи на по-големи промени от изследваните фактори (CV е 15,6%).

Установени са концентрациите на микроеле-

менти в надземната биомаса и корените на генотипи градински грах, в условия на инокулиране с микробиален продукт. Микробиалният инокулант повишава концентрацията на Fe в надземната биомаса на болшинството генотипи с 2,4% до 22,9%, най-добре изразено при сорт Казино. Нарастването на желязото в корените е с 4,4% до 12,6%. Наблюдава се повишение на Mn в надземната биомаса на някои генотипи от употребата на комбинирания продукт в интервала от 9,3% до 35,7%, на Zn – от 2,1% до 64,9% и на Cu – от 5,2% до 20,2%. Процентното увеличение на Mn в корените при различните генотипи е с 4,8%-35,1%, на Zn – от 5,3% до 20,8% и на Cu – от 3,3% до 24,4% в сравнение с нетретираните контроли.

Установено е, че микробиалният инокулант увеличава степента на колонизация на корените с AM гъби средно с над 7%. Реакцията на отделните генотипи грах е различна и вероятно е генетично обусловена. Корелационни зависимости между съдържанието на отделните микроелементи и процента колонизация с AM гъби са регистрирани само с концентрациите на Fe.

Генотипният фактор е с по-силно влияние върху съдържанието на микроелементи (Fe, Mn, Zn и Cu) в образците грах. Инокулацията с AM гъби и полезни ризобактерии е с по-слаб, но достоверен ефект по отношение на концентрацията на Fe, Mn и Zn в надземната биомаса и корените.

Проведеният клъстерен анализ показва, че според съдържанието на микроелементи в надземната биомаса на граха, след инокулация, се формират два основни клъстера, а при корените три.

Благодарности

Настоящото изследване е финансирано по проект КП-06-Н26/12, фонд „Научни изследвания“, конкурсна сесия „Фундаментални изследвания“, МОН.

Литература

Abbaszadeh-Dahaji, P., Masalehi, F., & Akhgar, A.

(2020). Improved growth and nutrition of sorghum (*Sorghum bicolor*) plants in a low-fertility calcareous soil treated with plant growth-promoting rhizobacteria and Fe-EDTA. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20(1), 31-42.

Baslam, M., Garmendia, I., & Goicoechea, N. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) improved growth and nutritional quality of greenhouse-grown lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5504-5515.

Belimov, A. A., Shaposhnikov, A. I., Syrova, D. S., Kichko, A. A., Guro, P. V., Yuzikhin, O. S., Azarova, T. S., Sazanova, A. L., Sekste, E. A., Litvinskiy, V. A., Nosikov, V. V., Zavalin, A. A., Andronov, E. E., & Safronova, V. I. (2020). The role of symbiotic microorganisms, nutrient uptake and rhizosphere bacterial community in response of pea (*Pisum sativum* L.) genotypes to elevated Al concentrations in soil. *Plants*, 9(12), 1801.

Colla, G., Cardarelli, M., & Roupael, Y. (2020). Plant biostimulants: new tool for enhancing agronomic performance and fruit quality of cucurbits. *Acta Horticulturae*, 1294, 245-252.

Corrêa, A., Cruz, C., Pérez-Tienda, J., & Ferrol, N. (2014). Shedding light onto nutrient responses of arbuscular mycorrhizal plants: nutrient interactions may lead to unpredicted outcomes of the symbiosis. *Plant Science*, 221, 29-41.

De Santis, M. A., Giuliani, M. M., Flagella, Z., Pellegrino, E., & Ercoli, L. (2022). Effect of arbuscular mycorrhizal fungal seed coating on grain protein and mineral composition of old and modern bread wheat genotypes. *Agronomy*, 12(10), 2418.

Elkoca, E., Turan, M., & Donmez, M. F. (2010). Effects of single, dual and triple inoculations with *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* on nodulation, nutrient uptake, yield and yield parameters of common bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. 'Elkoca-05'). *Journal of Plant Nutrition*, 33(14), 2104-2119.

Fasusi, O. A., Babalola, O. O., & Adejumo, T. O. (2023). Harnessing of plant growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystem sustainability. *CABI Agriculture and Bioscience*, 4(1), 26.

Ferrol, N., Tamayo, E., & Vargas, P. (2016). The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: from mechanisms to biotechnological applications. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), 6253-6265.

Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84, 489-500.

Goteti, P. K., Emmanuel, L. D. A., Desai, S., & Shaik, M. H. A. (2013). Prospective zinc solubilising bacteria for enhanced nutrient uptake and growth promotion in maize (*Zea mays* L.). *International journal of microbiology*, 2013(1), 869697.

Hacisalihoglu, G., Beisel, N. S., & Settles, A. M. (2021). Characterization of pea seed nutritional value within a diverse population of *Pisum sativum*. *PLoS one*,

16(11), e0259565.

Ipek, M., & Esitken, A. (2017). The actions of PGPR on micronutrient availability in soil and plant under calcareous soil conditions: an evaluation over Fe nutrition. *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives: Volume 2: Microbial Interactions and Agro-Ecological Impacts*, 81-100.

Jalal, A., Júnior, E. F., & Teixeira Filho, M. C. M. (2024). Interaction of zinc mineral nutrition and plant growth-promoting bacteria in tropical agricultural systems: a review. *Plants*, 13(5), 571.

Jones, J. W., Antle, J. M., Basso, B., Boote, K. J., Conant, R. T., Foster, I., ... & Wheeler, T. R. (2017). Brief history of agricultural systems modeling. *Agricultural systems*, 155, 240-254.

Khoso, M. A., Wagan, S., Alam, I., Hussain, A., Ali, Q., Saha, S., Poudel, T. R., Manghwar, H., & Liu, F. (2023). Impact of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on plant nutrition and root characteristics: Current perspective. *Plant Stress*, 100341.

Koske, R. E., & Gemma, J. N. (1989). A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research*, 92, 486-488.

Kumari, M., Swarupa, P., Kesari, K. K., & Kumar, A. (2022). Microbial inoculants as plant biostimulants: A review on risk status. *Life*, 13(1), 12.

Lehmann, A., & Rillig, M. C. (2015). Arbuscular mycorrhizal contribution to copper, manganese and iron nutrient concentrations in crops - a meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 81, 147-158.

Marschner, H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd Edition, Academic Press, London.

Marschner, H., & Dell, B. (1994). Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and soil*, 159, 89-102.

Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., & Sahin, F. (2006). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia horticultrae*, 111(1), 38-43.

Radhakrishnan, G. V., Keller, J., Rich, M. K., Vernié, T., Mbadinga Mbadinga, D. L., Vigneron, N., ... & Delaux, P. M. (2020). An ancestral signalling pathway is conserved in intracellular symbioses-forming plant lineages. *Nature Plants*, 6(3), 280-289.

Rana, A., Saharan, B., Nain, L., Prasanna, R., & Shivay, Y. S. (2012). Enhancing micronutrient uptake and yield of wheat through bacterial PGPR consortia. *Soil Science and Plant Nutrition*, 58(5), 573-582.

Rouphael, Y., Cardarelli, M., Di Mattia, E., Tullio, M., Rea, E., & Colla, G. (2010). Enhancement of alkalinity tolerance in two cucumber genotypes inoculated with an arbuscular mycorrhizal biofertilizer containing *Glomus intraradices*. *Biology and Fertility of Soils*, 46, 499-509.

Smith, S.E., & Read, D.J. (2010). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press: Cambridge, MA, USA.

Sun, W., & Shahrajabian, M. H. (2023). The application of arbuscular mycorrhizal fungi as microbial

biostimulant, sustainable approaches in modern agriculture. *Plants*, 12(17), 3101.

Tran, B. T., Watts-Williams, S. J., & Cavagnaro, T. R. (2019). Impact of an arbuscular mycorrhizal fungus on the growth and nutrition of fifteen crop and pasture plant species. *Functional Plant Biology*, 46(8), 732-742.

Ward, J. H. (1963). Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association*, 58, 236-244.

Waters, B. M., & Sankaran, R. P. (2011). Moving micronutrients from the soil to the seeds: genes and physiological processes from a biofortification perspective. *Plant Science*, 180(4), 562-574.

Yadav, A., Suri, V. K., Kumar, A., & Choudhary, A. K. (2018). Effect of AM fungi and phosphorus fertilization on P-use efficiency, nutrient acquisition and root morphology in pea (*Pisum sativum* L.) in an acid Alfisol. *Journal of Plant Nutrition*, 41(6), 689-701.

Zaib, S., Zubair, A., Abbas, S., Hussain, J., Ahmad, I., & Shakeel, S. N. (2023). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Reduce Adverse Effects of Salinity and Drought Stresses by Regulating Nutritional Profile of Barley. *Applied and Environmental Soil Science*, 2023(1), 7261784.

Zhukov, V. A., Zhernakov, A. I., Sulima, A. S., Kulaeva, O. A., Kliukova, M. S., Afonin, A. M., Shtark, O. Y., & Tikhonovich, I. A. (2021). Association study of symbiotic genes in pea (*Pisum sativum* L.) cultivars grown in symbiotic conditions. *Agronomy*, 11(11), 2368.

Received: 24th October 2024, **Approved:** 20th November 2024, **Published:** December 2024