

## Dīgstošu pupu sēklu simbiotiskā gatavība The Symbiotic Readiness of Germinating Bean Seeds

*Alise Šenberga, Laila Dubova, Ina Alsīņa*  
LLU Lauksaimniecības fakultāte

**Abstract.** Often legume's inoculation with *Rhizobium* spp. does not result in the expected effect. It could be the result of early spring sowing, when the root zone temperature is too low. Experiment was conducted to evaluate germinating bean seed symbiotic readiness in different temperatures (4, 8, 12, 20 °C). Four cultivars of beans (*Vicia faba*) 'Lielplatone', 'Fuego', 'Bartek' and 'Karmazyn' were chosen. For seed inoculation, local rhizobia strain mix and commercial mycorrhiza fungi were chosen. Primary root weight was measured, the amount of flavonoids in the exudate were determined. Seed germination parameters and inoculum effect depended on the germination temperature. The highest results of primary root weight were achieved with inoculum containing both rhizobia and mycorrhiza fungi. Rhizobia and mycorrhiza combined seed inoculum is suggested, when there is a possible risk of low root zone temperature at the sowing time. Strong positive linear correlation between flavonoids' content in seed exudate and germination temperature was observed. Presence of mycorrhiza fungi preparation decreased flavonoids' concentration in seed exudate.

**Key words:** rhizobia, mycorrhiza, abiotic stress, flavonoids, *Vicia faba*.

### Ievads

Tauriņziežu sēklu apstrāde ar gumiņbaktērijām palielina ražas apjomu un/vai kvalitāti (Pawar et al., 2014). Novērots, ka lauksaimnieki mēdz sēt pupas ļoti agrā pavasarī, lai izvairītos no augsnes mitruma trūkuma (Balodis u. c., 2016). Pēc Latvijas Vides, ģeoloģijas un meteoroloģijas centra datiem vidējā gaisa temperatūra martā ir -1 °C, aprīlī +5 °C, tādējādi pupas sākotnēji pakļautas zemai augsnes temperatūrai. Temperatūra zem 10 °C var negatīvi ietekmēt, bet 4 °C temperatūrā būtiski aizkavējas gumiņu veidošanās un slāpekļa saistīšana, pazeminot tauriņziežu ražu un tās kvalitāti (Воро́биев, 1998). Pētījumos ar pupām parādīts, ka sēklu dīgšana ir optimāla 15 °C, bet samazinās, ja temperatūra augsnē pazeminās zem 10 °C (Rowland, Gusta, 1977). Temperatūra ietekmē visus mikrobioloģiskos procesus auga rizosfērā, ieskaitot simbiozes veidošanos. Tauriņziežu sēklu apstrādei lieto arī dubultinokulāciju ar gumiņbaktērijām un mikorizas sēnēm, kas uzlabo auga apgādi ar ūdeni, barības vielām, nodrošinot blīvāku un veselīgāku sakņu sistēmu. Pierādīts, ka gumiņu veidošanās un slāpekļa saistīšanas spēja mikorizas klātbūtnē uzlabojas, savukārt auga sakņu kolonizācija ar mikorizas sēnēm uzlabojas gumiņbaktēriju klātbūtnē (Dash, Gupta, 2011).

Simbioze var veidoties, ja partneri savstarpēji mijiedarbojas. Šādas signālmolekulas ir sakņu izdalītie flavonoīdi (Xie et al., 1995). To sintēze un eksudācija atšķiras pākšaugu saknēs un sēklās (Maj et al., 2010). Augs izdala flavonoīdus, veidojot hemotropiskos signālus, lai sēņu hifas augtu uz sakņu pusi. Flavonoīdi ietekmē gumiņbaktēriju spēju izdzīvot rizosfērā, veidot gumiņus un nodrošināt baktēriju konkurētspēju (Maj et al., 2010).

Pētījuma mērķis – noteikt, ar kāda sastāva sēklu inokulācijas preparātu ir iespējams palielināt izturību pret zemu temperatūru un nodrošināt normālu sēklu dīgšanu un dīgstošu sēklu simbiotisko gatavību.

### **Materiāli un metodes**

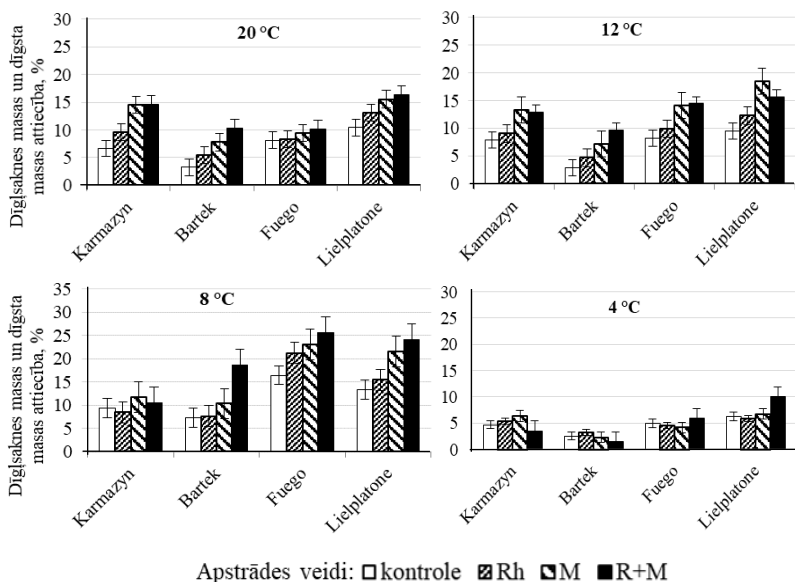
Sēklas tika dziedētas Petri platēs. Izmēģinājumā iekļautas četras pupu (*Vicia faba*) šķirnes: divas sīksēklu pupas – ‘Lielplatone’ un ‘Fuego’, un divas lielsēklu pupas – ‘Bartek’ un ‘Karmazyn’. Sēklas pirms inokulācijas sterilizētas (1 min 70% etanols, 5 min ACE). Gumiņbaktēriju suspensijā bija 10<sup>6</sup> baktēriju mililitrā. Sēklu apstrādes varianti: 1) gumiņbaktēriju celmu maisījums, ‘Rh’; 2) mikorizas sēni saturošs preparāts, ‘M’; 3) gumiņbaktēriju celmu maisījums kopā ar mikorizas sēni saturošo preparātu, ‘Rh + M’; 4) kontroles variants bez sēklu apstrādes, ‘kontrolē’. Katrā Petri platē ievietotas 10 sīksēklu pupu vai 5 lielsēklu pupu sēklas. Izmēģinājums veikts 4 atkārtojumos. Variantiem ‘M’ un ‘Rh+M’ izmantots Symbiom® firmas mikorizas sēņu preparāts. Sēklām Petri platēs pievienoti 20 mL destilēta ūdens vai baktēriju suspensija.

Sēklas dziedētas tumsā 4, 8, 12 un 20 °C temperatūrā. Pēc 4 dienām paņemts sēklu eksudāts bioķīmijas analizēm, pievienoti 10 mL destilēta ūdens. Eksudāta noņemšana atkārtota divas reizes nedēļā līdz eksperimenta beigām. Izmēģinājums ilga līdz visas sēklas bija uzdīgušas – 20 °C temperatūrā 6 dienas, 12 °C – 15; 8 °C – 30; 4°C – 40 dienas. Izmēģinājuma beigās noteikta atsevišķi katra dīgsta un dīglsaknes masa, aprēķināta to attiecība %. Flavonoīdi analizēti pēc Robaszkievicz et al. (2010) metodes. Flavonoīdu daudzums izteikts mg kvercetinā ekvivalentu (QE) mL<sup>-1</sup> šķīduma.

Datu matemātiskajā apstrādē izmantotas divu un trīs faktoru dispersijas analīzes (ANOVA). Rezultāti uzskatīti par būtiski atšķirīgiem, ja p<0.05. Kļūdu stabiņi parāda mazāko būtisko starpību (LSD).

### **Rezultāti un diskusija**

Dīglsaknes masas un visa dīgsta masas attiecība izvēlēta kā indikators sēklu dīgšanas aktivitātes raksturošanai, jo sakņu attīstība norāda ne tikai uz auga augšanas potenciālu, bet arī demonstrē mikroorganismu efektu (Fyson, Sprent, 1982). Mūsu pētījumā novērots, ka gumiņbaktēriju augšanas stimulējošais efekts samazinājās līdz ar temperatūras pazemināšanu (Att.). Zemākos dīglsaknes parametrus sēklām, kuras apstrādātas ar gumiņbaktēriju celmu maisījumu, pamatojoties uz literatūru (Fyson, Sprent, 1982), var skaidrot ar to, ka baktērijas patērē enerģiju, lai uzsāktu gumiņu veidošanu.



Apstrādes veidi: □ kontrolle ▨ Rh ▩ M ■ R+M  
 Att. Dīgsaknes un dīgsta masas attiecība (%) atkarībā no dīgšanas temperatūras, šķirnes un apstrādes varianta.

Gumiņbaktēriju aktivitāte būtiski samazinās, ja temperatūra ir zem 8 °C, kas, potenciāli samazina slāpekļa saiššanas aktivitāti un palēnina auga augšanu, veidojot zemākas kvantitātes un kvalitātes ražu (Prévost et al., 2003; Dash, Gupta, 2011). Izmēģinājumā sēklu inokulēšana tikai ar gumiņbaktērijām ('Rh') nav pietiekoši efektīva, ja sēklas tiek sētas, kad sakņu zonas temperatūra nepārsniedz 4 °C. Baktērijas ir spējīgas izdzīvot 4 °C temperatūrā (Drouin et al., 2000), bet mikroorganismu aktivitāte palielinās, paaugstinot temperatūru. Tomēr, ja ar gumiņbaktērijām apstrādātās sēklas tiek ilgstoši pakļautas zemei temperatūrai, tas var palielināt baktēriju lag-fāzi (vairošanās aizkavēšanās), tā samazinot gumiņbaktēriju šūnu skaitu, kam seko samazināts gumiņu skaits (Fyson, Sprent, 1982).

Mikorizas pievienošana gumiņbaktēriju preparātam var būtiski palielināt agrīno dīgsta attīstību. Šo mikroorganismu sinerģiskā attiecība dod pozitīvu ietekmi uz auga augšanu, tajā skaitā gumiņu veidošanos un auga apgādi ar barības vielām (Dash, Gupta, 2011). Flavonoīdu saturam sēklu eksudātos ir cieša lineāra korelācija ( $R^2=0.93$ ) ar diedzēšanas temperatūrām. Simbiontu lietošana flavonoīdu saturu eksudātos samazināja, lielāka ietekme bija mikorizas sēņu preparātam. Salīdzinot ar kontroli, variantos ar mikorizas sēnēm flavonoīdu saturs vidēji samazinājās par 23.5%, bet dubultinokulācijas variantos par 18.9%, diedzējot sēklas 12 °C temperatūrā. Mazākas atšķirības konstatētas 4 °C temperatūrā, attiecīgi 4 un 9%.

## Secinājumi

Pupu sēkļu dīgšana būtiski atkarīga no izmantotās šķirnes un sakņu zonas temperatūras. Lielsēkļu pupām nepieciešama augstāka temperatūra, salīdzinot ar sīksēkļu pupām. Pārsvārā lielākais augšanu stimulējošais efekts novērots variantos ar gumiņbaktēriju un mikorizas kombināciju. Var secināt, ka sēkļu inokulēšanu ar gumiņbaktērijiem būtu jāpapildina ar mikorizas sēņu preparātu, īpaši, kad sēklas tiek sētas, kamēr augsne vēl nav sasniegusi optimālo temperatūru.

## Literatūra

1. Balodis, R., Gaile, Z., Kreita, D., Litke, L. (2016). Dažādu agrotehnisko elementu ietekme uz lauka pupu ražu. No: Zinātniski praktiskās konferences “*Līdzsvarota lauksaimniecība*” (25.–26. 02.) raksti. Jelgava, LLU, 8.–12. lpp.
2. Dash, S., Gupta, N. (2011). Microbial bioinoculants and their role in plant growth and development. *Int. J. Biotechnol. Mol. Biol. Res.*, 2, pp. 232–251.
3. Drouin, P., Prevost, D., Antoun, H. (2000). Physiological adaptation to low temperatures of strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* associated with *Lathyrus* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 32, pp. 111–120.
4. Fyson, A., Sprent, J.I. (1982). The Development of primary root nodules on *Vicia faba* L. grown at two temperatures. *Ann. Bot.*, 50, pp. 681–692.
5. Maj, D., Wielbo, J., Marek-Kozaczuk, M., Skorupska, A. (2010). Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiol. Res.*, 165, pp. 50–60.
6. Pawar, V., Pawar, P.R., Bhosale, A.M., Chavan, S.V. (2014). Effect of *Rhizobium* on Seed Germination and Growth of Plants. *Journal of Academia and Industrial Research*, 3, pp. 84–88.
7. Prévost, D., Drouin, P., Laberge, S., Bertrand, A., Cloutier, J., Lévesque, G. (2003). Cold-adapted rhizobia for nitrogen fixation in temperate regions. *Can. J. Bot.*, 81, pp. 1153–1161.
8. Robaszkiewicz, A., Bartosz, G., Ławrynowicz, M., Soszyński, M. (2010). The Role of Polyphenols,  $\beta$ -Carotene, and Lycopene in the Antioxidative Action of the Extracts of Dried, Edible Mushrooms, *J. Nutr. Metab.*, Article ID 173274, 9 p.
9. Rowland, G.G., Gusta, V. (1977). Effects of soaking, seed moisture content, temperature, and seed leakage on germination of faba bean (*Vicia faba*) and peas (*Pisum sativum*). *Can. J. Plant Sci.*, 57, pp. 400–406.
10. Xie, Z.C., Staehelin, H., Vierheilig, A., Wiemken, S., Jabbouri, W.J., Broughton, R., Vogeli-Lange, T. (1995). Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybeans. *Plant Physiol.*, 108, pp. 1519–1525.
11. Воробьев, В.А. (1998). *Симбиотическая азотфиксация и температура*. Наука: Сиб. предприятие, Новосибирск, 125 с.