

Identification of the initial material from garden pea with increased content of essential micronutrients, a basis for biofortification and improved symbiotic nitrogen-fixing potential



The importance of peas (*Pisum sativum* L.) as a major protein crop used as food for humans and animals, European requirements for enhancing the quality of plant foods based on naturally high values of important nutrients necessitates the need to continuously seek, improve and enrich the variety of this crop. The aim of the study is identification of starting material of garden peas with increased content of essential microelements, biological enrichment through useful soil microorganisms, basis for biofortification and enhanced symbiotic nitrogen-fixing activity. The database on morphological traits of 57 pea genotypes has been enriched and expanded, including important economic indicators and selection valuable traits. On this basis, a small core collection will be created for the needs of the selection. Five strains of bacteria are characterized by the ability to produce siderophores and / or strongly change the pH of the culture medium after 48 hours of cultivation. Three accessions are distinguished with increased content of Zn, Fe, Cu. Information on nodulation, specific nodulating ability was collected and seven perspective accessions of garden pea were broadcast to serve as donors in the direction of symbiotic selection of peas. A microbiological characterization of the rhizosphere in the different pairs "genotype pea - strain *Rhizobium*" was made. The nitrogen-fixing potential of the isolated *Rhizobium* strains has the highest values in three varieties.

Abstract:

Slavka Kalapchieva1
Ivanka Tringovska-Mendevea1
Tsvetanka Dintcheva1

Viliana Vasileva2
Valentin Kosev2

Tsveta Hristeva3
Margarita Docheva3
Radka Bozhinova3



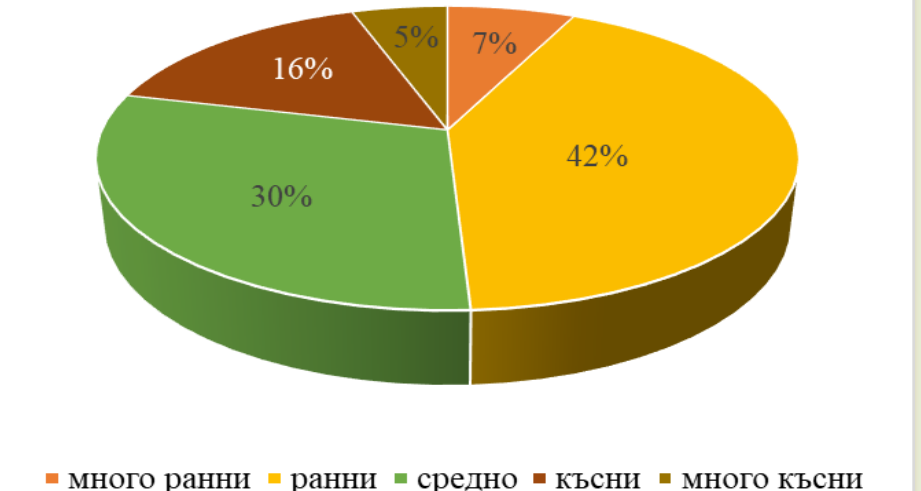
- 1 - Maritsa Vegetable Crops Research Institute (MVCRI)-Plovdiv
- 2 - Institute of Forage Crops (IFC)-Pleven
- 3 - Institute of Tobacco and Tobacco Products (ITTP)-Marcovo

Целта на предлагания проект е идентификация на изходен материал от градински грах с повишено съдържание на основни хранителни микроелементи, биологично им обогатяване чрез полезни почвени микроорганизми, основа за биофортификация и засилена симбиотична азотфиксираща активност.

РП № 1: Фенотипиране на изходен материал от градински грах по стопански ценни признаци

Материал и методи:

57 генотипа - ИЗК „Марица“ - 2019 и 2020 г. в полски условия по блоков метод в три повторения. Основните показатели на изследванията са:
Фенологични наблюдения измерени в дни;
Морфологична характеристика и биометрични измервания на средна проба от 5 растения в технологична зрялост
CPVO и UPOV-признаците в балове от 1 до 9 на втори фертилен възел, когато 50% от растенията са в съответната фаза
РЕЗУЛТАТИ: Диференцирани са пет групи градински грах по продължителност на вегетационния период:



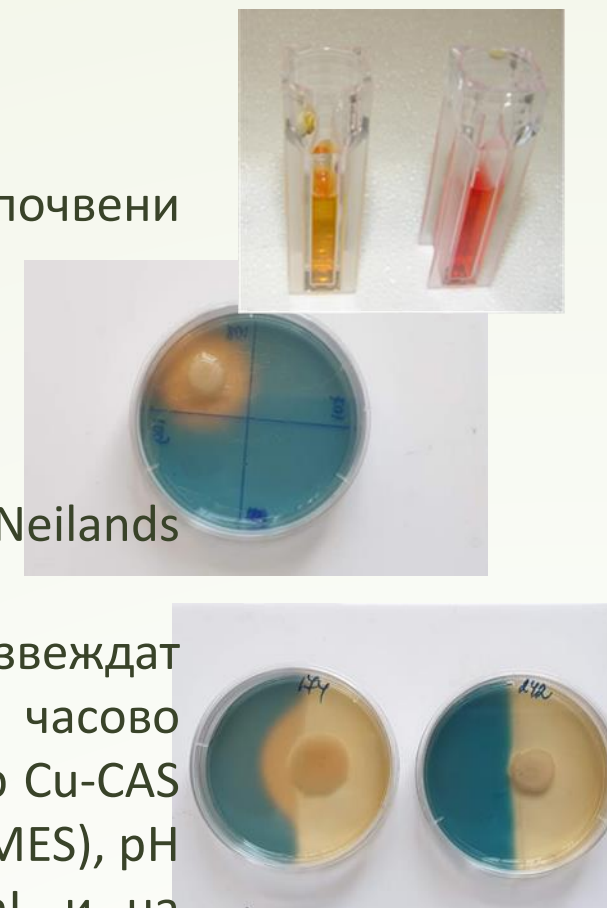
На базата на направения анализ проучените материали градински грах **нямат антоцианово оцветяване**, преобладаваща част от растенията са средно високи със среден брой на възлите над и включително първи фертилен възел, със зелена листна маса, обикновен тип листа, напетеност на прилистниците, бели цветове и по два боба на плодна дръжка. Бобовете са зелени, къси и средно дълги със средна ширина и наличие на пергаментов слой, тъпо окончание, залагащи средно количество зародиши, от които се развиват средно по пет зърна в боб от светло до тъмно зелени. Семенните показатели дава информация, че повече от половината проучени генотипи имат сложни скорбелни зърна, т.е. са с набръчкана повърхност, зелен цвят на котиледоните, цвят на хилума като на обвивката и средно тегло семената.

РП № 2: Биологично обогатяване с Zn, Fe, Cu на градински грах чрез полезни почвени микроорганизми

Тестове „in vitro“ за подбор на ефективни щамове почвени бактерии.

Материал и методи:

1. Произвеждане на сидерофори.
Използвани са два подхода, основани на качествени реакции:
- Качествени реакции с бактериални колонии върху твърда среда. Метода- Schwyn and Neilands (1997) и в модифициран вид - Milagre et al. (1999).



- Качествени реакции с безклетъчни филтрати в течна среда. Първоначално се произвеждат стерилни безклетъчни филтрати от бактериални суспензии след 48 часово отглеждане на културата в течна хранителна среда (NBY broth). След това 0,5 mL разтвор Cu-CAS (chrome azurol S – 200 µM CuCl₂, 210 µM CAS and 40 mM (N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES), pH = 5,7) се смесва с 0,5 mL от съответния бактериален филтрат в кювета от 1 mL и на спектрофотометър се счита абсорбцията при 582 nm. В присъствието на хелатни агенти, каквито са сидерофорите се наблюдава намаляване на абсорбцията. Контрола е използвана неинкулирана хранителна среда.

2. Промени в рН на средата.

РЕЗУЛТАТИ: Общо 196 бактериални изолати от колекцията на ИЗК „Марица“ са тествани. Изолати с № 4; 13; 73; 74 и 175 се отличават със способност да произвеждат сидерофори и/или силно да променят рН на хранителната среда след 48 часа култивиране.

Тестове „in vitro“ за оценка способността на микроорганизмите да разтворят трудно разтворими съединения на Zn, Fe, Cu.

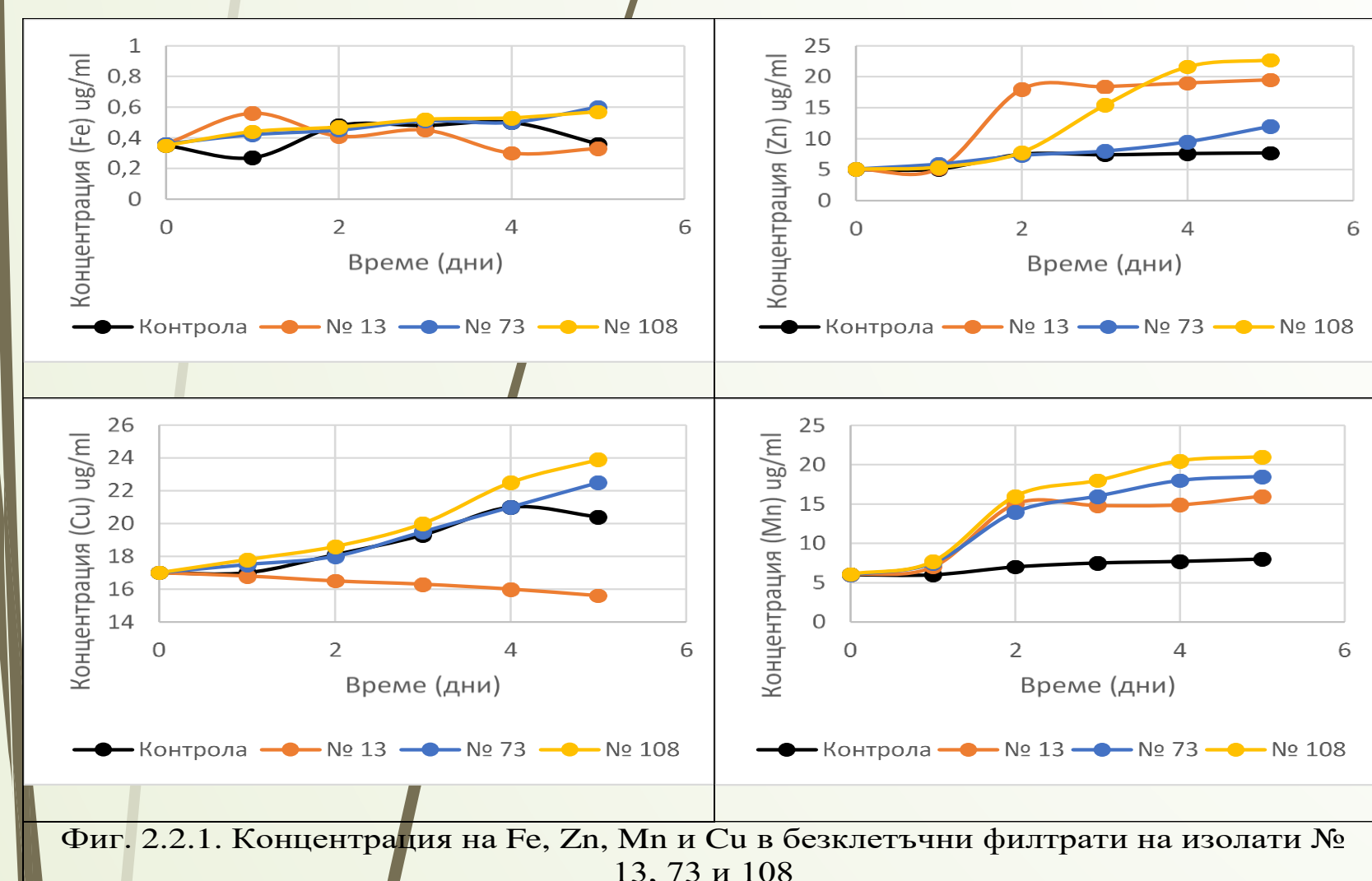
Материал и методи: Съдържанието на Fe, Zn, Mn и Cu е определено чрез оптико-емисионен спектрометър с индуктивно свързана плазма.

РЕЗУЛТАТИ: От три изпитани бактериални изолата най-голямо количество Fe, Zn, Mn и Cu е регистрирано при изолат № 108

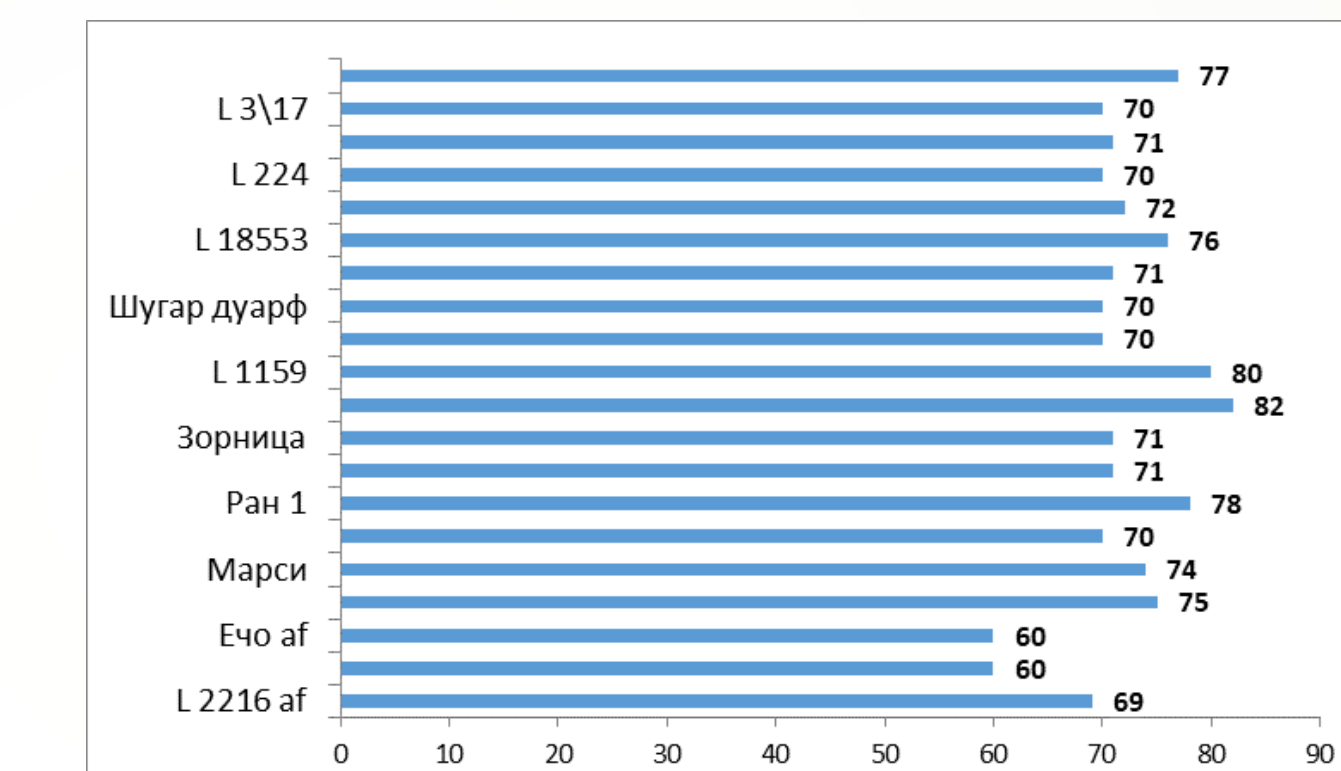
Скрининг на колекция градински грах за повишено съдържание на Zn, Fe, Cu в зърната.

Материал и методи: Непосредствено след беритба граховите зърна от всеки генотип в две повторения са замразени, лиофилизирани и смлени на прах. За определяне съдържанието на микроелементите Fe, Zn, Mn и Cu пробите са минерализирани в тefлонови съдове в микровълнова система за минерализация (Anton Paar) съгласно Miller (1998). чрез оптико-емисионен спектрометър с индуктивно свързана плазма (ICP-OES Optima 7000, Perkin Elmer).

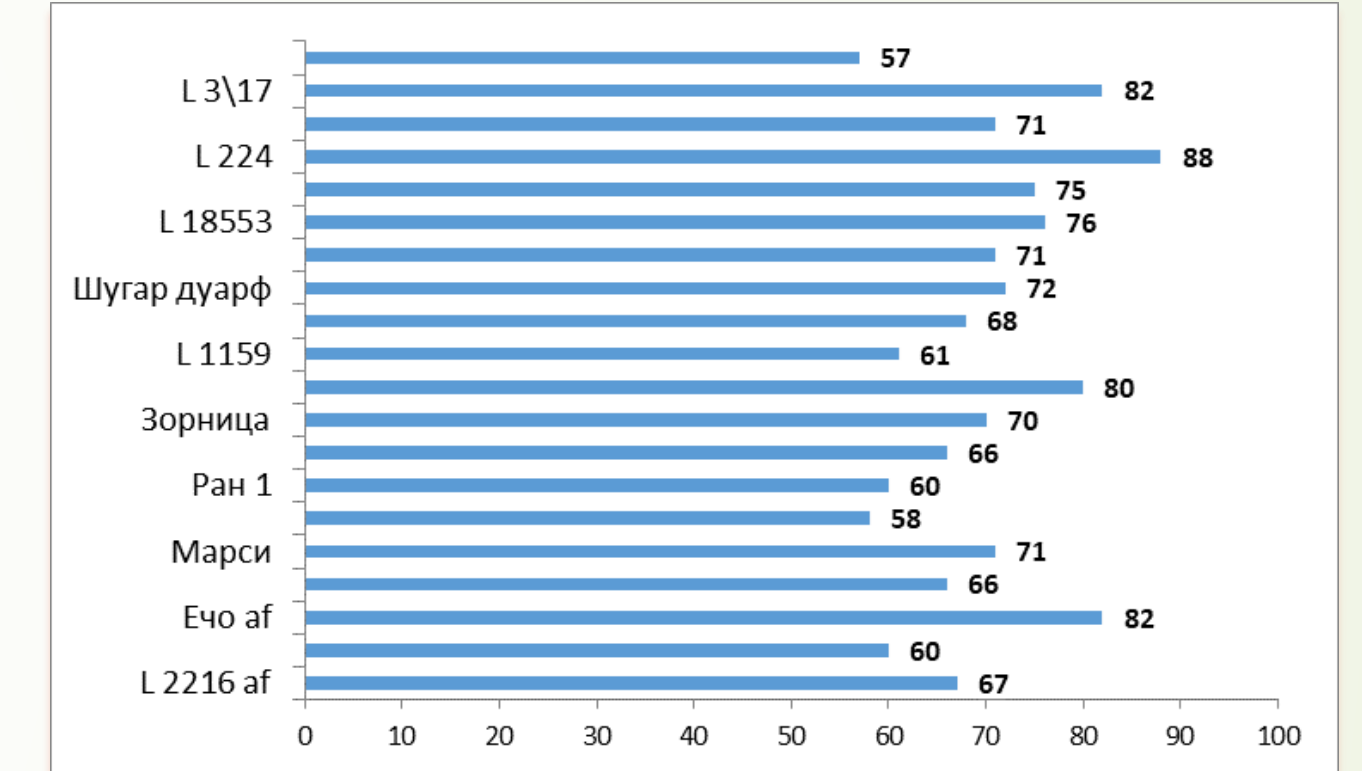
РЕЗУЛТАТИ: С повишено съдържание на Zn, Fe, Cu се отличават образци № 6 – B4/33; № 26 – RU Флора б и № 38 – ИЗК-Пловдив.



Фиг. 2.2.1. Концентрация на Fe, Zn, Mn и Cu в безклетъчни филтрати на изолати № 13, 73 и 108



Фиг. Ниво на грудкообразуване на образци градински грах във фаза начало на цъфтеж



Фиг. Ниво на грудкообразуване на образци градински грах във фаза техническа зрялост

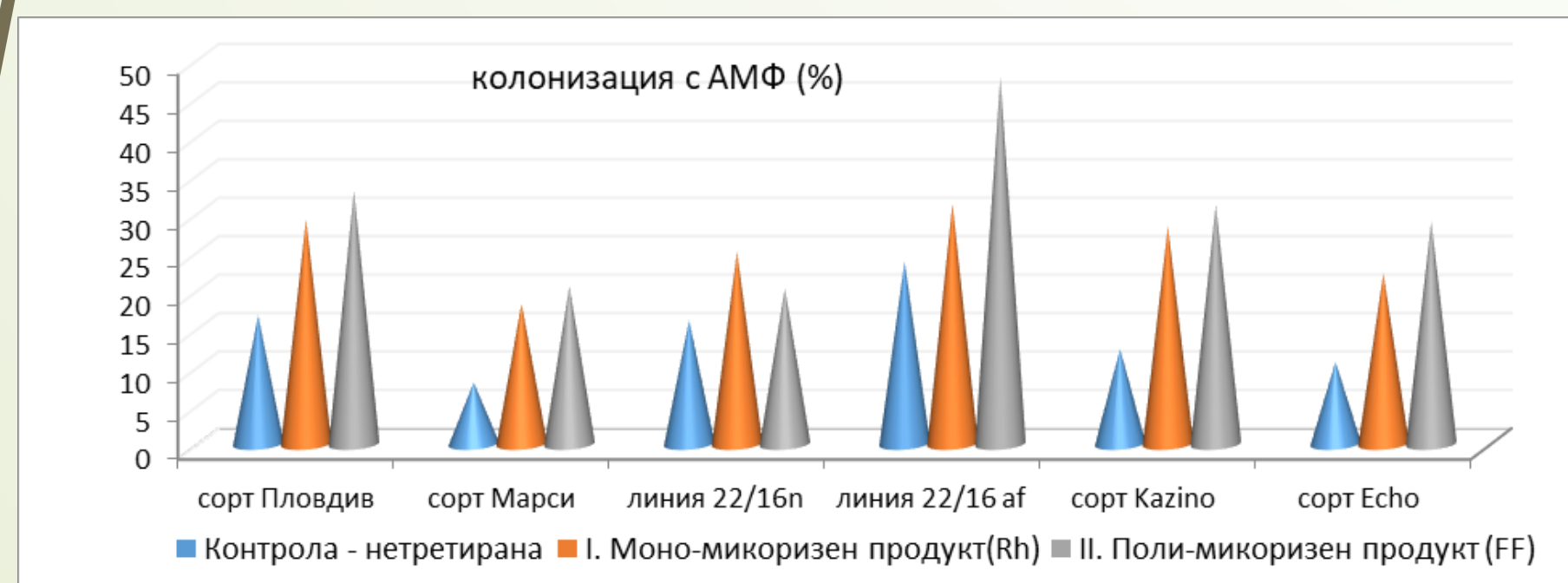
РП № 4: Микробиологични изследвания върху грахово-ризобиалния комплекс и ризосферната почвена среда

Материал и методи: ИТТИ, Марково - анализи на грудки от образци градински грах: три с „обикновен“ тип листа и три с „афила“. Инокулация с арбускуларни микозни гъби (АМФ) внесени в почвата при сеитбата. *Rhizo-Vam Basic (Rh)* - 2 g/p-е и *Funky Fungi BAC (FF)* - 5 g/p-е Колонизация на корените е отчетена по процедура описана от Koske и Gemma (1989)

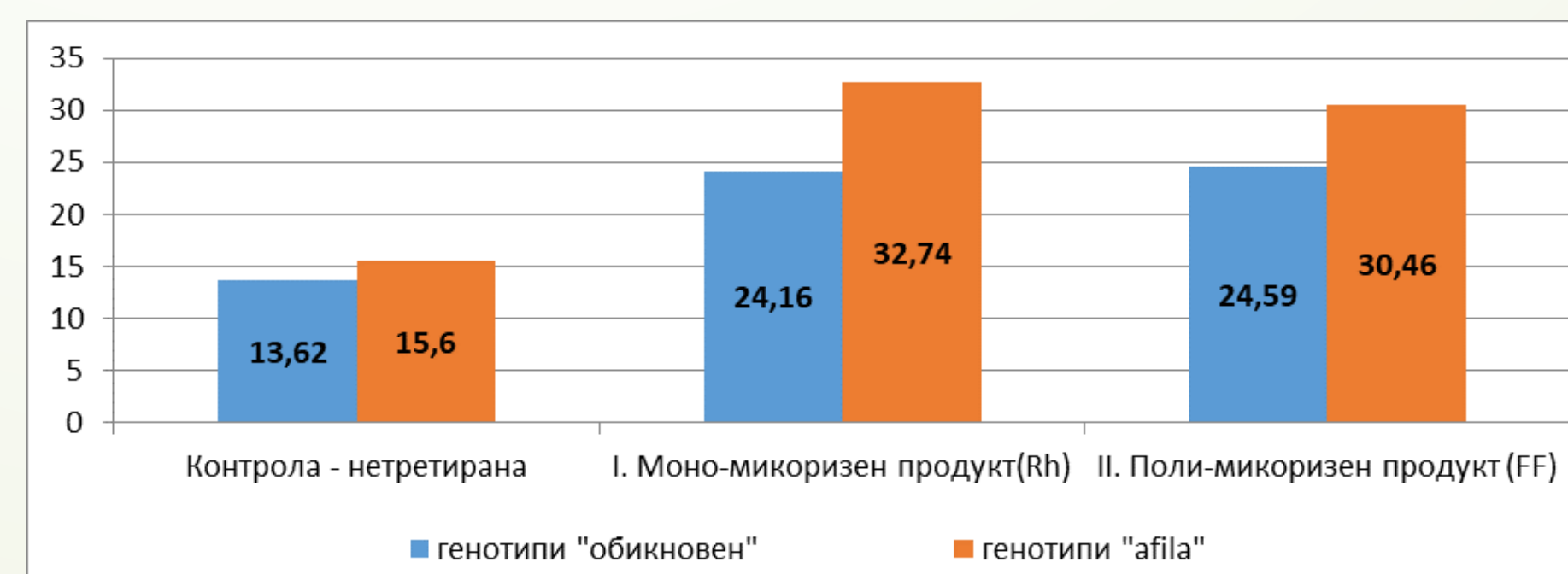
РЕЗУЛТАТИ: Изолирани са чисти базични култури от ризобиални грудки на образците градински грах с обикновен и афилатен тип листа. Направени са морфологични характеристики на колонията, оцветяване по Грам и тест за каталазна активност. Индиректно е определен азотфиксиращият потенциал на изолираните щамове *Rhizobium* във вегетативната маса на отделните образци грах чрез установяване съдържанието на общ азот (%) и суров протеин (%). Най-високи стойности са показали сортове: Марси, Пловдив и Ечо

Изградени са количествени microbiological характеристики на ризосферите при различните двойки „генотип грах – щам *Rhizobium*“. Резултатите показват специфика в плътността на микробните популации формиращи в ризосферите на различните образци грах „обикновен“ и „афила“, което е показател и за наличието на такава и при отделните двойки „сорт – щам *Rhizobium*“.

Установено е влиянието на два търговски микоризни продукта, съдържащи арбускуларни микоризни гъби, моно- и поли- микоризни върху плътността в микробните популации при отделните образци градински грах. Двата микоризни продукта значително увеличават степента на колонизация с АМФ на корените на градинския грах при всички генотипове, което е показател за настъпване на успешна микоризна симбиоза и вероятност за синергични взаимоотношения между АМФ и *Rhizobium*.

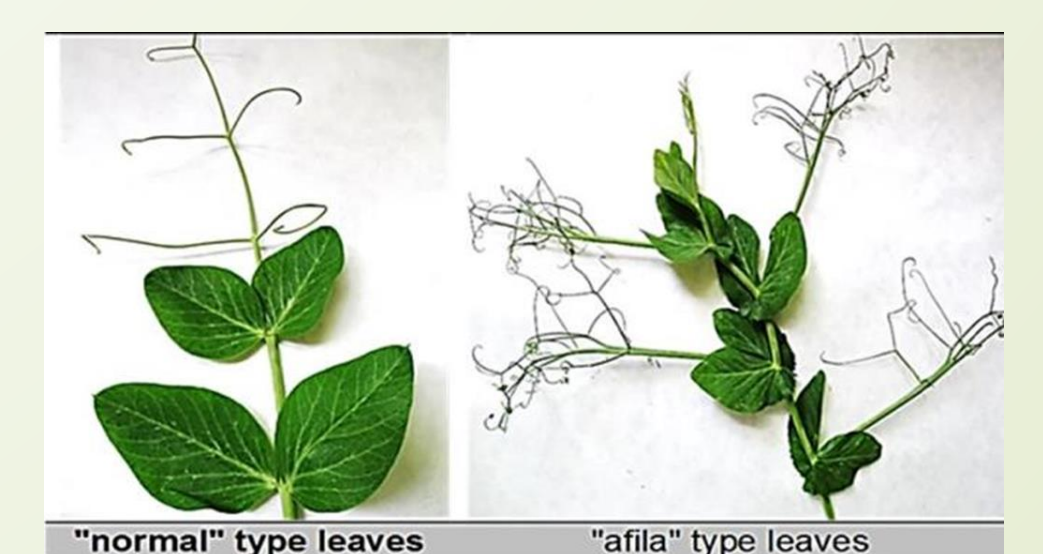


Фиг. Колонизация (%) на корените на отделните образци грах с АМФ



Фиг. Разлики в % колонизация с АМФ на корените на образци грах

Резултатите показват специфика в плътността на микробните популации формиращи в ризосферите на различните образци грах „обикновен“ и „афила“, което е показател и за наличието на такава и при отделните двойки „сорт – щам *Rhizobium*“.



ИЗВОДИ:

1. Диференцирани са пет групи градински грах по време на цъфтеж според CPVO-TQ/007/2:

I група с много рано време на цъфтеж (бал 1)-5 генотипа; II група с рано времена цъфтеж (бал 3)-8 генотипа; III група със средно време (бал 5)-16 генотипа; IV група с късно време (бал 7)-19 и V група с много късно време на цъфтеж (бал 9)-9 генотипа. Обогатена и разширена е базата данни относно морфологични признаци на 57 генотипа градински грах, включваща важни стопански показатели за висока продуктивност и механизано отглеждане, както и селекционно ценни признаци. На тази основа ще се създаде малка основна колекция (core collection) за нуждите на селекцията. Направеният анализ на семенните показатели дава информация, че повече от половината проучени генотипи имат набръчкана повърхност на семената, зелен цвят на котиледоните и средно тегло.

2. Избрани са пет щамове бактерии (№ 4; 13; 73; 74 и 175), отличаващи се със способност да произвеждат сидерофори и/или силно да променят рН на хранителната среда след 48 часа култивиране. С повишено съдържание на Zn, Fe, Cu се отличават образци B4/33; Флора б и Пловдив.

3. В резултат от проучването е събрана информация за грудкообразуването, специфичната грудкообразуваща способност (СГС), вариационните коефициенти на съпътстващите показатели и са излъчени следните перспективни образци, които да послужат като донори в направление за симбиотична селекция на градински грах:

Мира (60.50 броя грудки/p-е; 0.254 g/p-е; (СГС) 0.110 g грудки/g коренова биомаса)

L 224 (48.00 броя грудки/p-е; 0.216 g/p-е; (СГС) 0.216 g грудки/g коренова биомаса)

L 1159 (42.00 броя грудки/p-е; 0.168 g/p-е; (СГС) 0.089 g грудки/g коренова биомаса)

4. Изолирани са чисти базични култури от ризобиални грудки градински грах, отнесени към вида *R. leguminosarum*. Азотфиксиращият потенциал на изолираните щамове *Rhizobium* е с най-високи стойности при сортове Марси, Пловдив и Ечо-af. Изградени са количествени microbiological характеристики на ризосферите при различните двойки „генотип грах – щам *Rhizobium*“. Резултатите показват специфика в плътността на микробните популации, формиращи в ризосферите на различните образци грах с „обикновен“ и „афила“ тип листа, което е показател за наличието на такава и при отделните двойки „сорт – щам *Rhizobium*“. Установено е намаляване на микроскопичните гъби и актиномицетите в микробните съобщества при внасяне на арбускуларни микоризни фунги

Проектът се финансира от
Фонд „Научни изследвания“
Договор № КП-06-N26/12
20 декември 2018 година

