

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
AUGU FIZIOLOĢIJAS KATEDRA

EKSOGĒNĀ AUKSĪNA IETEKME UZ DĀRZA PUPIŅAS (*PHASEOLUS  
VULGARIS*) SPRAUDEŅU RIZOĢENĒZI UN LAPU HLOROFILA  
DAUDZUMU

Bakalaura darbs

Autore: Krista Krišlauka

Stud. apl. nr. kk19175

Darba vadītājs: Dr. biol., asoc. prof. Uldis Kondratovičs

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

RĪGA 2022

## KOPSAVILKUMS

Augu veģetatīvā pavairošana ir daudzās augkopības nozarēs plaši pielietota augu pavairošanas metode, kur, izmantojot dzinuma spraudņus, ir iespējams salīdzinoši ātri pavairot augus, saglabājot to individuālās ģenētiskās īpašības. Pavairojot augus veģetatīvi ar dzinuma spraudņiem, galvenais uzdevums ir izveidot jaunu sakņu sistēmu, kas bieži tiek panākts ar eksogēna augsnes pielietošanu. Ņemot vērā augsnes daudzpusīgo iesaisti dažādos auga fizioloģiskajos procesos, darba mērķis bija noskaidrot dažādu koncentrāciju eksogēna augsnes šķīdumu ietekmi uz dārza pupiņu, kā modeļobjekta, spraudņu augšanu un attīstību.

Dārza pupiņu spraudņus apsakņoja trīs dažādos šķīdumos – dejonizētā ūdenī un eksogēna augsnes šķīdumos ar koncentrācijām  $10 \text{ mg l}^{-1}$  un  $50 \text{ mg l}^{-1}$ . Spraudņiem veica adventīvo sakņu morfoloģiju raksturojošo parametru un lapu hlorofila daudzuma analīzi. Eksogēna augsnes pielietošanas rezultātā bija vērojama uzlabota spraudņu adventīvo sakņu morfoloģija ar izteiktu sakņu biomasas pieaugumu, kā arī lēnāka lapu novecošanās.

Atslēgvārdi: spraudņi, rizoģenēze, augsnes, lapu hlorofila daudzums, dārza pupiņa.

## SUMMARY

Vegetative propagation of plants is a widely applied plant propagating method in horticulture, where it is possible to reproduce plants relatively quickly using stem cuttings, while maintaining their individual genetic characteristics. When propagating plants vegetatively with stem cuttings, the main task is to create a new root system, which is often achieved by the use of exogenous auxin. Given the versatile involvement of auxin in various physiological processes of the plant, the aim of the study was to determine the effect of different concentrations of exogenous auxin solutions on the growth and development of cuttings of garden bean as an object of study.

Garden bean cuttings were rooted in three different solutions – in deionized water and exogenous auxin solutions with concentrations of 10 mg l<sup>-1</sup> un 50 mg l<sup>-1</sup>. Analysis of cuttings' adventitious roots morphology parameters and leaf chlorophyll content was performed. The use of exogenous auxin resulted in improved morphology of cuttings' adventitious roots with a pronounced increase in root biomass, as well as slower leaf senescence.

Keywords: cuttings, rizogenesis, auxin, leaf chlorophyll content, garden bean.

# SATURS

IEVADS .....	6
1. LITERATŪRAS APRAKSTS .....	8
1.1. Augu veģetatīvā pavairošana ar spraudņiem .....	8
1.2. Adventīvo sakņu veidošanās process spraudņos.....	8
1.3. Auksīns un tā ietekme uz adventīvo sakņu veidošanos .....	9
1.4. Auga lapu novecošanās.....	10
1.5. Modeļobjekta raksturojums .....	10
2. MATERIĀLI UN METODEDES.....	12
2.1. Augu materiāla iegūšana.....	12
2.1.1. Augu kultivēšana.....	12
2.1.2. Spraudņu pagatavošana .....	12
2.1.3. Spraudņu apsakņošana.....	12
2.2. Lapu hlorofila daudzuma noteikšana.....	13
2.3. Spraudņu adventīvo sakņu analīze .....	14
2.3.1. Rizoģenēzes nedestruktīva analīze, izmantojot datorprogrammu WinRHIZO.....	14
2.3.2. Sakņu svaigās un sausās masas noteikšana .....	14
2.4. Anatomisko preparātu pagatavošana .....	15
2.4.1. Mikrotomēšana.....	16
2.4.2. Griezumu krāsošana .....	16
2.5. Anatomisko preparātu mikroskopēšana.....	16
2.6. Datu statistiskā apstrāde.....	17
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA .....	18
3.1. Spraudņu vizuāla novērtēšana.....	18
3.2. Adventīvo sakņu morfoloģijas parametri.....	20
3.2.1. Adventīvo sakņu kopējais garums .....	20
3.2.3. Adventīvo sakņu tilpums .....	22
3.2.3. Adventīvo sakņu vidējais diametrs .....	23
3.2.4. Adventīvo sakņu svaigā un sausā masa.....	25
3.2.5. Adventīvo sakņu un to aizmetņu skaits dažādos spraudņa posmos .....	26
3.3. Lapu hlorofila daudzums .....	31

PATEICĪBAS .....	37
LITERATŪRAS SARAKSTS .....	38

## IEVADS

Augu veģetatīvā pavairošana ir mežsaimniecībā, lauksaimniecībā un dārzkopībā plaši pielietota augu pavairošanas metode, kas ļauj saglabāt un pavairot individuālus genotipus, klonu un kultivāru ieguves ceļā (Leakey 2004). Šīs metodes pamatā ir augu apbrīnojamās plasticitātes un reģenerācijas spējas, mitotiskas šūnu dalīšanās rezultātā veidojot jaunas orgānu sistēmas (Urry et al. 2017).

Pavairojot augus veģetatīvi, bieži izmanto no mātes auga atdalītus dzinuma spraudņus, un šīs metodes rezultativitāte ir tieši atkarīga no spraudņa spējas izveidot jaunu adventīvo sakņu sistēmu (Hassanein 2013), līdz ar to, tiek plaši pētīts gan atsevišķu faktoru, gan dažādu faktoru kombinētā ietekme uz šo procesu (Caplan et al. 2018; Pacholczak 2019), lai ne tikai palielinātu veiksmīgi apsakņoto spraudņu kopskaitu, bet arī, lai jaunizveidotā sakņu sistēma būtu maksimāli funkcionāla, tādējādi nodrošinot augam optimālu fizioloģisko stāvokli.

Viena no visbiežāk izmantotajām metodēm spraudņu apsakņošanā ir eksogēna auksīna pielietojums, pateicoties auksīna vairākkārtēji pierādītajam nozīmīgumam adventīvo sakņu iniciēšanas un veidošanas procesā (Druege et al. 2016), tomēr, ņemot vērā auksīna daudzpusīgo iesaisti dažādos auga fizioloģiskajos procesos (Woodward et al. 2005), ir svarīgi izvērtēt ne tikai eksogēna auksīna ietekmi jaunas sakņu sistēmas izveidē, bet arī kopējā spraudņa attīstības procesā.

Šajā pētījumā kā modeļobjektu izmantoja dārza pupiņu, tās laboratorijas apstākļiem piemērotās kultivēšanas un morfoloģisko īpašību dēļ.

Darba mērķis: noskaidrot dažādu koncentrāciju eksogēna auksīna šķīduma ietekmi uz dārza pupiņas, kā modeļobjekta, spraudņu augšanu un attīstību.

Darba uzdevumi:

- iegūt dārza pupiņas spraudņus un veikt to apsakņošanu šķīdumos ar dažādu eksogēnā auksīna koncentrāciju;
- veikt spraudņu adventīvo sakņu morfoloģiju raksturojošo parametru mērījumus;
- pagatavot dzinumu anatomiskos šķēsgriezumus un veikt adventīvo sakņu un to aizmetņu uzskaiti dažādās spraudņa zonās;
- veikt spraudņu lapu hlorofila daudzuma mērījumus;

- veikt iegūto datu apstrādi un analīzi, izdarot secinājumus par eksogēna augsīna ietekmi uz dārza pupiņas spraudēju augšanu un attīstību.

# 1. LITERATŪRAS APRAKSTS

## 1.1. Augu veģetatīvā pavairošana ar spraudņiem

Augu veģetatīvā vairošanās ir jebkura bezdzimumiskas vairošanās forma augos, kā rezultātā veidojas jauns augs vai nu no mātes auga fragmenta, vai arī no specializētas reproduktīvās struktūras, kā piemēram, no sakneņa, bumbuļa, sīpola vai stīgas (Herklots et al. 2019). Daudziem augiem veģetatīvā vairošanās ir dabisks process, tomēr šis process var būt arī cilvēka inducēts vai atvieglināts, kas tādā gadījumā tiek saukts par augu veģetatīvo pavairošanu (Urry et al. 2017).

Viena no visplašāk izmantotajām metodēm augu veģetatīvajā pavairošanā ir augu pavairošana ar dzinuma spraudņiem (Hartmann et al. 2014), kas dod iespēju ātri un efektīvi saglabāt un pavairot ģenētiskās izmaiņas augos, kas iegūtas mutāciju, transgēnu notikumu vai attālās hibridizācijas ceļā (da Costa et al. 2013).

Veiksmīgu augu pavairošanu ar dzinuma spraudņiem ietekmē vairāki faktori, kā mātes auga stāvoklis, substrāta veids, spraudņa veids, apsākšanas hormoni un vides apstākļi pavairošanas laikā, kā gaisma, temperatūra, gaisa un augsnes mitrums, un visu šo faktoru ietekme atsauca uz jaunas sakņu sistēmas veidošanu, kas ir centrālais uzdevums augu veģetatīvās pavairošanas praksē (Hassanein 2013).

## 1.2. Adventīvo sakņu veidošanās process spraudņos

Adventīvo sakņu rizoģenēze ir process, kur jaunas saknes veidojas kādā no auga pēcembrionālās attīstības fāzēm, turklāt, no vasas audiem (Druege et al. 2019).

Lai gan adventīvās saknes augiem var veidoties dabiski kā daļa no normāla to attīstības cikla, kā tas ir vairumam viendīgļlapju, adventīvo sakņu veidošanos var ierosināt arī stresu izraisoši apstākļi, kā piemēram, ievainojums, plūdi, etiolācija vai arī dārzkopībā izmantotās augu veģetatīvās pavairošanas metodes (Pacurar et al. 2014), tai skaitā spraudņu ieguve, kur adventīvo sakņu veidošanās izriet no ievainojuma griezuma veikšanas vietā un atdalīšanas no mātes auga kopējās resursu un signalizēšanas sistēmas (Druege et al. 2016).

Adventīvo sakņu veidošanos parasti iedala trīs secīgās, bet savstarpēji atkarīgās fāzes: indukcijā, iniciācijā un ekspresijā. Indukcijas fāzē, pericikla vai kambija šūnu dediferencēšanās ceļā veidojas sakņu iniciāļu šūnas, kam seko šo šūnu dalīšanās. Iniciācijas fāzē notiek sakņu aizmetni veidojošo meristemātisko šūnu dalīšanās un diferencēšanās, veidojot saknei raksturīgos

šūnu slāņus. Ekspresijas fāzē notiek adventīvās saknes aizmetņa augšana un virzība uz ārvidi caur stumbra šūnu slāņiem (Guan et al. 2019).

Adventīvo sakņu veidošanās ir pārmantojama kvantitatīva ģenētiska iezīme, kuru kontrolē vairāki endogēni un eksogēni faktori, kā fitohormoni, gaiss, temperatūra un barības vielas (Pacurar et al. 2014).

### **1.3. Auksīns un tā ietekme uz adventīvo sakņu veidošanos**

Augu hormoni jeb fitohormoni ir paša auga sintezētas bioloģiski aktīvas vielas, kuras jau ļoti zemās koncentrācijās kontrolē augu augšanu un attīstību (Durner 2013).

Svarīgākos augu hormonus iedala piecās grupās - auksīnos, giberelīnos, citokinīnos, abscizskābē un etilēnā (Kochhar 2020), un, lai gan visi augu hormoni tieši vai netieši ietekmē augu sakņu veidošanos (Hartmann et al. 2014), adventīvo sakņu veidošanās stimulēšanā centrālo lomu ieņem tieši auksīns (Pacurar et al. 2014).

Auksīnam ir liela nozīme dažādos augu attīstības procesos, kā piemēram, agrīnos embriogēneses posmos, apikālās meristēmas filotaksijā, auga virszemes daļu zarošanā, galvenās saknes veidošanā, kā arī laterālo un adventīvo sakņu iniciācijā. Šo auksīna efektu pamatā ir auksīna kontrolēta šūnu dalīšanās, stiepšanās un diferencēšanās (Sauer et al. 2013).

Augos visbiežāk sastopamais auksīns ir  $\beta$ -indol-3-etilskābe (IES). Auksīna biosintēze galvenokārt notiek auga virszemes daļās, it īpaši jaunās lapās un meristēmās, no kurienes tas tiek transportēts uz citām auga daļām (Rosquete et al. 2012). Viens no auksīna pārnēs mehānismiem augā ir polārais auksīna transports, kur auksīns pārvietojas no šūnas uz šūnu ar transportproteīnu starpniecību virzienā no auga galotnes audiem uz auga pamatni un tālāk uz sakņu galiem (Michniewicz et al. 2007), tomēr, augu pavairošanā izmantojot dzinuma spraudņus, auga daļa tiek atdalīta no kopējās auksīna transporta sistēmas, kā rezultātā ir vērojama endogēnā auksīna akumulācija spraudņa pamatnē (da Costa et al. 2013). Tiek uzskatīts, ka šī agrīnā, polārā auksīna transporta atkarīgā endogēnā auksīna akumulācija spraudņa pamatnē iniciē pašregulētu auksīna pārvietošanos un maksimizēšanos noteiktās mērķa šūnās, tādējādi aizsākot adventīvo sakņu veidošanās procesu (Druege et al. 2016).

Ņemot vērā auksīna nozīmīgumu adventīvo sakņu veidošanās procesā, endogēnā auksīna koncentrāciju var palielināt ar eksogēna auksīna pielietošanu, ar mērķi uzlabot apsākšanās procesu (da Costa et al. 2013). Šī metode bieži tiek pielietota pavairojot augus veģetatīvi ar

spraudeņiem, parasti izmantojot sintētiskos auksīnus, kuru aktivitāte ir līdzīga  $\beta$ -indol-3-etīkskābei, kā  $\beta$ -indol-3-sviestskābi (ISS) un  $\alpha$ -naftiletīkskābi (NES) (Kochhar 2020).

#### 1.4. Auga lapu novecošanās

Lapu novecošanās ir pēdējā fāze lapu attīstības procesā (Hou et al. 2013), kuras laikā šūnas pāriet no oglekļa asimilācijas un citām anaboliskām reakcijām uz katabolisku modeli, kas rezultējas ar šūnu disfunkciju, strukturālu noārdīšanos un šūnu nāvi (Lim et al. 2010). Lapu novecošanās iekļauj barības vielu mobilizāciju uz citām augošām auga daļām, kā jaunām lapām auga veģetatīvās augšanas laikā vai sēklām, ja augs ir iegājis reproduktīvās attīstības fāzē (Mueller-Roeber et al. 2013).

Lapu novecošanās ir saistīta ar auga vecumu, tomēr to var ietekmēt arī dažādi ārējās vides faktori, kā patogēnu infekcija, ekstrēmas temperatūras, oksidatīvais stress, ierobežots barības vielu daudzums, vai arī iekšējie faktori, kā reproduktīvo orgānu veidošanās vai izmaiņas augu augšanas regulatoru, tai skaitā auksīna, daudzumā (Lim et al. 2010).

Auksīna loma lapu novecošanās procesā nav līdz galam skaidra, un, lai gan ir pieņemts uzskatīt, ka auksīnam ir kavējoša ietekme šajā procesā (Guo et al. 2021), ir atsevišķi pētījumi, kuru rezultāti, iespējams, liecina par auksīna veicinošu ietekmi uz lapu novecošanos (Hou et al. 2013).

Viena no vizuāli redzamajām izmaiņām lapu novecošanās procesā ir to dzeltēšana, kas ir saistīta ar bioķīmiskām izmaiņām, kā hlorofila daudzuma samazināšanos, proteīnu degradēšanos un fotosintētiskās aktivitātes samazināšanos (Kim et al. 2011). Lapu hlorofila daudzumu bieži izmanto kā lapu novecošanos raksturojošu parametru (Hou et al. 2013; Mahmood et al. 2016).

#### 1.5. Modeļobjekta raksturojums

Dārza pupiņa (*Phaseolus vulgaris*) ir viengadīgs tauriņziežu (*Fabaceae*) dzimtas augs. Auga izcelsmes vieta ir Dienvidamerika, tomēr dārza pupiņa tiek plaši kultivēta visā pasaulē gan nenobriedušu pākšu, gan sauso sēklu ieguvei. Auga sausās sēklas ir nozīmīgs olbaltumvielu avots miljoniem tropu reģionos dzīvojošo cilvēku uzturā, papildinot to aminoskābju uzņemšanu, kas iztrūkst rīsu, kukurūzas un citu graudaugu balstītās diētās. Plašas auga pavairošanas rezultātā dārza pupiņa ietver vairākus kultivārus ar lielu morfoloģisko un agronomisko īpašību daudzveidību (OECD 2016).

Dārza pupiņai ir raksturīga mietsakne ar sānsaknēm, kas parasti ir izvietotas augsnes augšējā kārtā līdz 15 cm dziļumam. Lapas ir trīskārt plūksnaini saliktas, auglis ir 8 – 20 cm gara pāksts, kas parasti satur 4 – 6 sēklas (OECD 2016). Ziedi ir kleistogāmi un parasti vērojama pašappute (< 1% svešappute)(Miklas et al. 2007). Nobriedušas sēklas ķīmiskais sastāvs: 54% ogļhidrāti, 24% proteīns, 14% tauki, 5% pelnvielas, 3,5% šķiedrvielas (Ikezu et al. 2015).

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Augu materiāla iegūšana

#### 2.1.1. Augu kultivēšana

Augu materiāla iegūšanai atlasīja 100 dārza pupiņas sēklas ("Black Turtle Bean" šķirne, ievāktas 2021. gada rudenī,  $m = 59.84$  g). Sēklas stādīja divās dēstu audzēšanai paredzētās plastmasas kastēs ( $55 \times 28.5 \times 6$  cm), kā substrātu izmantojot augsni, kas piemērota sēšanai un dēstu piķēšanai ("Biolan" augsne;  $\text{pH} = 6.0$ ). Katrā kastē stādīja 50 sēklas, augsni iepriekš samitrinot ar dejonizētu ūdeni un ievietojot sēklas  $0.5 - 1.0$  cm dziļumā. Kastes notina ar caurspīdīgu plēvi, lai nodrošinātu sēklu dīgšanai piemērotus mitruma apstākļus. Plēvi noņēma pēc piecām dienām un kastes ar augiem novietoja zem gaismas emisijas diožu (LED) moduļiem (15 W Philips GP LED production B 120 LO modulis; fotoperiods – 16 stundas gaismas režīms, 8 stundas tumsas režīms; attālums līdz augiem 35 cm; PPF –  $100 \dots 120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), kur turpināja to kultivēšanu līdz spraudeņu pagatavošanas brīdim. Kopējais augu kultivēšanas laiks augsnē – 11 dienas.

#### 2.1.2. Spraudeņu pagatavošana

Augu materiāla ievākšanu spraudeņu pagatavošanai veica vienpadsmitajā augu kultivēšanas dienā, kad vairums augu bija vērojams labi attīstījies pirmo īsto lapu pāris. Spraudeņu pagatavošanai izvēlējās vizuāli līdzīgus augus, bez redzamiem bojājumiem. Augu materiālu ievāca atdalot auga virszemes daļu ar asmeņa palīdzību, veicot griezumam hipokotilā tuvu sakņu kakla vietai. Visiem spraudeņiem saglabāja vienādu vasas garumu, tā, lai no pirmo īsto lapu pāra mezgla vietas līdz spraudeņa pamatnei būtu 13 cm garš vasas posms. Kopā sagatavoja 45 spraudeņus.

#### 2.1.3. Spraudeņu apsakņošana

Spraudeņu apstrādei ar ISS šķīdumu un sākotnējai apsakņošanai sagatavoja veģetācijas traukus. Plastmasas glāzītes ( $V = 100$  ml) notina ar melnu plēvi, lai nodrošinātu rizoģenēzes procesam nepieciešamo aptumšojumu, savukārt, lai novērstu šķīduma sasilšanu melnās plēves ietekmē, ap katru glāzīti papildus aplikā baltu papīra loksni. Kopā sagatavoja 15 veģetācijas traukus.

Spraudeņu apstrādei sagatavoja trīs šķīduma variantus:

- dejonizēts ūdens – kontroles variants (K) ( $V = 250$  ml);
- ISS šķīdums ar koncentrāciju  $10 \text{ mg l}^{-1}$  (ISS 10) ( $V = 250$  ml);
- ISS šķīdums ar koncentrāciju  $50 \text{ mg l}^{-1}$  (ISS 50) ( $V = 250$  ml).

ISS šķīdumus pagatavoja, izmantojot izejas ISS šķīdumu ar koncentrāciju  $500 \text{ mg l}^{-1}$ , atšķaidot 5 ml izejas šķīduma ar 245 ml dejonizēta ūdens, lai iegūtu ISS šķīdumu ar koncentrāciju  $10 \text{ mg l}^{-1}$ , un atšķaidot 25 ml izejas ISS šķīduma ar 225 ml dejonizēta ūdens, lai iegūtu ISS šķīdumu ar koncentrāciju  $50 \text{ mg l}^{-1}$ .

Spraudeņu apstrādi veica trijos variantos, izmantojot iepriekšminētos šķīdumus. Katru veģetācijas trauku piepildīja ar 50 ml attiecīgā šķīduma un katrā traukā ievietoja 3 spraudņus, kopā katrā variantā sagatavojot 15 spraudņus. Kopējais spraudņu skaits: 45 gb. Ekspozīcijas laiks šķīdumā – 6 stundas.

Pēc spraudņu inkubēšanas apstrādes šķīdumā, tos noskaloja tekošā ūdenī. Apstrādes šķīdumu katrā variantā nomainīja ar dejonizētu ūdeni ( $V = 100$  ml) un spraudņu kultivēšanu ūdens vidē turpināja 11 dienas.

Divpadsmitajā dienā pēc spraudņu apstrādes ar apsākņošanas šķīdumiem, lai novērstu izmantoto veģetācijas trauku izmēru limitējošu ietekmi uz spraudņu sakņu sistēmas attīstību, spraudņus pārvietoja uz lielākiem veģetācijas traukiem ( $V = 800$  ml), kā arī turpmāko spraudņu kultivēšanu veica plastmasas granulās ( $d = 3$  mm;  $m = 300$  g uz trauku). Papildus granulām, katru veģetācijas trauku piepildīja ar nostādinātu krāna ūdeni ( $V = 400$  ml), kura daudzumu divreiz nedēļā papildināja ar 400 ml ūdens visu turpmāko spraudņu kultivēšanas periodu. Kopā sagatavoja 12 veģetācijas traukus, četrus katrā variantā. Katrā traukā ievietoja trīs spraudņus, katrā variantā saglabājot 12 spraudņus. Kopējais spraudņu skaits: 36 gb. Spraudņu kultivēšanas laiks granulās: 21 diena.

Spraudeņu kultivēšanas laikā, spraudņi atradās zem gaismas diožu moduļiem (15 W Philips GP LED production B 120 LO modulis; fotoperiods – 16 stundas gaismas režīms, 8 stundas tumsas režīms; attālums līdz augiem 35 cm, PPFD –  $100 \dots 120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Kopējais spraudņu kultivēšanas periods: 32 dienas.

## 2.2. Lapu hlorofila daudzuma noteikšana

Spraudeņu lapu hlorofila daudzuma noteikšanai izmantoja CCM-300 hlorofila satura mērītāju (Opti-Science). Mērījumus veica visa spraudņu kultivēšanas perioda laikā, veicot tos ik

pēc 3 - 4 dienām, kopā datu ieguvu veicot deviņas reizes. Pirms katras mērījumu veikšanas reizes, hlorofila satura mērītāju kalibrēja un pārliicinājās, lai ierīces fluorescences emisijas signāla spēks būtu optimāls. Hlorofila daudzuma mērījumus veica spraudēna pirmajām īstajām lapām, katrai lapai veicot trīs mērījumus dažādos lapas reģionos, izvairoties no lapu dzīslām, katram spraudenim kopā veicot sešus mērījumus. Katra varianta ietvaros, mērījumus veica pieciem spraudēniem.

### **2.3. Spraudēnu adventīvo sakņu analīze**

#### **2.3.1. Rizoģenēzes nedestruktīva analīze, izmantojot datorprogrammu WinRHIZO**

Sākot ar spraudēnu kultivēšanas divpadsmito dienu, veica spraudēnu adventīvo sakņu analīzi, izmantojot attēlu analīzes sistēmu WinRHIZO 2007, kas ir īpaši izstrādāta dažādu sakņu parametru noteikšanai. Analizējamo attēlu ieguvei izmantoja augstas izšķirtspējas skeneri Epson Expression 10000 XL.

Spraudēnu sakņu skenēšanu veica ik pēc septiņām dienām līdz spraudēnu kultivēšanas perioda beigām, kopā datu ieguvu veicot četras reizes. Katrā datu ieguves reizē, varianta ietvaros skenēja un datus ieguva par pieciem spraudēniem, pēc skenēšanas tos ievietojot atpakaļ veģetācijas traukos un turpinot to kultivēšanu.

Spraudēnu sakņu skenēšanu veica ūdens vidē, lai atvieglotu individuālu sakņu izkliedi. Plastmasas vanniņu piepildīja ar dejonizētu ūdeni, kas apstrādāts ar vakuuma sūkni ( $t = 10$  min), tādējādi novēršot gaisa burbuļu klātbūtni, un novietoja uz skenera virsmas attēlu ieguvei. Pirms attēlu ieguves WinRHIZO sistēmā atlasīja optimālos iegūstamā attēla parametrus (color levels, 400 dpi) un kalibrēja skenējamās virsmas laukumu, atzīmējot vanniņas izmērus (25 x 15 cm). Iegūtos attēlus analizēja izmantojot WinRHIZO funkciju "Automatic analysis", iegūstot datus par spraudēnu sakņu kopējo garumu, tilpumu un vidējo sakņu diametru.

#### **2.3.2. Sakņu svaigās un sausās masas noteikšana**

Spraudēnu kultivēšanas 32. dienā veica spraudēnu adventīvo sakņu svaigās masas noteikšanu. Katra varianta ietvaros pēc nejaušības principa atlasīja desmit spraudēnus. Katram spraudenim saknes atdalīja no dzinuma ar asmens palīdzību, veicot griezumam maksimāli tuvu epidermai. Tā kā spraudēni līdz to sakņu masas noteikšanas brīdim atradās ūdens vidē, pēc atdalīšanas no dzinuma, saknes novietoja uz filtrpapīra, lai novadītu lieko ūdeni. Sakņu svaigās

masas noteikšanai izmantoja elektroniskos svarus KERN ABJ 220-4NM (Max 220 g, kļūda  $\pm$  0.001 g) katra spraudeņa masu nosakot atsevišķi.

Pēc svaigās sakņu masas noteikšanas, noteica šo sakņu sauso masu. No katra spraudeņa atdalītās saknes ievietoja individuālā no papīra izgatavotā aploksnē, kuras savukārt ievietoja termostatā ( $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), lai no saknēm iztvaicētu ūdeni. Saknes no termostata izņēma pēc 3 dienām un nosvēra izmantojot elektroniskos svarus KERN ABJ 220-4NM (Max 220 g, kļūda  $\pm$  0.001 g), kopā nosakot sauso sakņu masu desmit spraudeņiem katrā variantā.

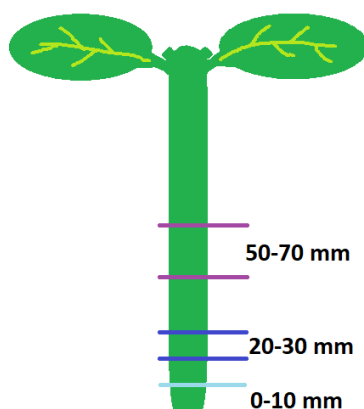
Tā kā turpmāko datu ieguvei neveica tajā pašā dienā, visus 30 spraudeņus, kurus izmantoja sakņu masas noteikšanai, konservēja traukos ar 70% etilspirta šķīdumu.

#### 2.4. Anatomisko preparātu pagatavošana

Spraudeņu adventīvo sakņu un to aizmetņu uzskaitē veica anatomisko preparātu pagatavošanu.

Preparātu pagatavošanai un datu ieguvei izmantoja 70% etilspirta šķīdumā konservētos spraudeņus. Katrā variantā no desmit saglabātajiem spraudeņiem pēc nejaušības principa izvēlējās piecus spraudeņus, katram veicot adventīvo sakņu un to aizmetņu uzskaiti trīs dažādos posmos:

1. 0 – 10 mm;
2. 20 – 30 mm;
3. 50 – 70 mm (1. attēls).



1. attēls. Spraudeņa dalījums posmos.

Figure 1. Cutting's division in segments.

Katra posma ietvaros pagatavoja trīs šķērsriezumu preparātus – pa vienam no posma sākuma, vidus un beigu daļas. Katra varianta ietvaros pagatavoja 45 šķērsriezuma preparātus.

#### **2.4.1. Mikrotomēšana**

Spraudeņu šķērsriezumus anatomiskajiem preparātiem pagatavoja izmantojot rokas mikrotomu Euromex MT 5503 (griezuma biezums regulējams 0.025 mm intervālos). Katrā analizējamajā spraudēna posmā veica vairākus secīgus šķērsriezumus un iegūto augu materiālu ievietoja Petri trauka pamatnē, kas pildīta ar ūdeni. Tālākai preparātu krāsošanai atlasīja plānākos šķērsriezumus bez vizuāliem bojājumiem.

#### **2.4.2. Griezumu krāsošana**

Atlasīto spraudēna šķērsriezumu novietoja uz priekšmetstikla un veica parauga krāsošanu, izpildot sekojošas darbības:

1. no griezuma ar filtrpapīru atfiltrēja lieko ūdeni;
2. uz griezuma uznesa pilienu krāsvielu maisījuma (astra zilais + safranīns) (krāsošanas laiks - 1 minūte);
3. no griezuma ar filtrpapīru atfiltrēja nesaistīto krāsvielu;
4. veica griezuma skalošanu, uznesot divus pilienus destilēta ūdens;
5. no griezuma ar filtrpapīru atfiltrēja ūdens un nesaistītās krāsvielas šķīdumu (4. – 5. darbību veica divos atkārtojumos).

Anatomisko šķērsriezumu, pēc tā apstrādes ar krāsvielu, sagatavoja mikroskopēšanai, uzpildot vienu līdz divus destilēta ūdens pilienus un uzliekot paraugam segstiklu.

#### **2.5. Anatomisko preparātu mikroskopēšana**

Anatomisko šķērsriezumu izpētei un datu ieguvei izmantoja gaismas mikroskopu Leica DM500. Katram pagatavotajam šķērsgriezumam veica vizuālu novērtējumu un uzskaitīja spraudēna epidermu šķērsojušās adventīvās saknes, kā arī, dažādās attīstības stadijās esošos adventīvo sakņu aizmetņus.

Datu vizualizēšanai veica atsevišķu šķērsriezumu attēlu ieguvi izmantojot digitālo fotokameru Leica ICC50W.

## 2.6. Datu statistiskā apstrāde

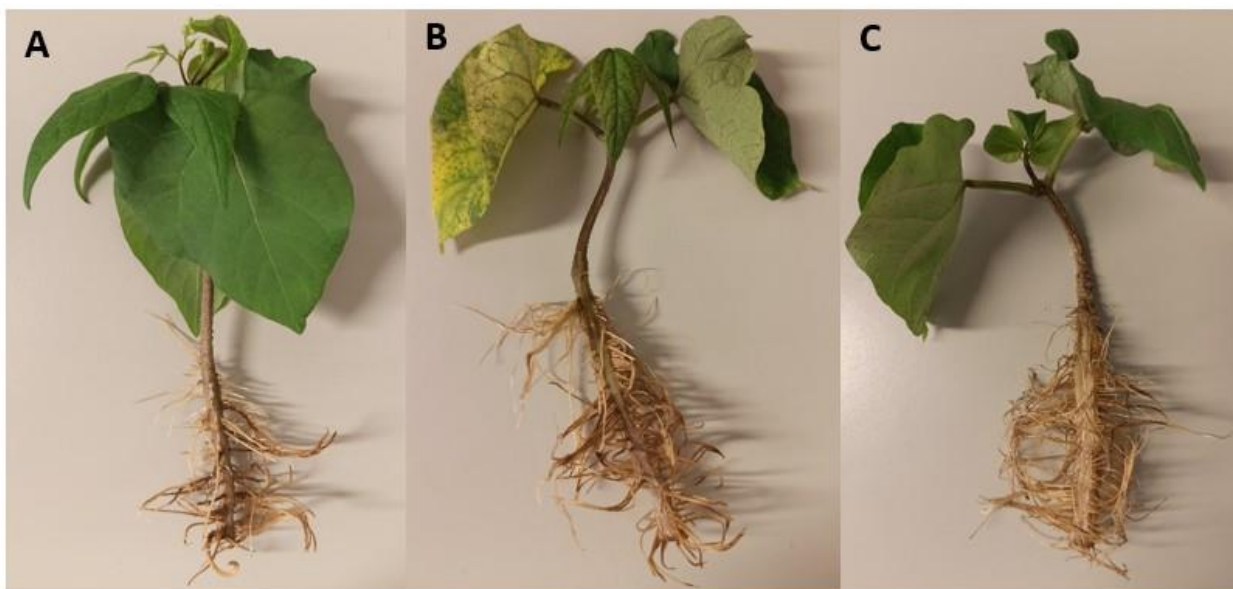
Iegūto datu statistiskai apstrādei, analīzei un vizualizēšanai izmantoja Microsoft Excel programmatūru v. 2204 un integrētās izstrādes vidi R programmēšanas valodai RStudio v. 1.4.1103. Datu statistisko būtiskumu noteica pie būtiskuma līmeņa  $\alpha = 0.05$ , veicot dispersijas analīzi (ANOVA) un Post-Hoc testu.

### 3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

#### 3.1. Spraudeņu vizuāla novērtēšana

Spraudeņu kultivēšanas laikā, sākot ar dienu (0), kad spraudēņus ieguva un apstrādāja ar apsākņošanas šķīdumiem līdz dienai (32), kad spraudēņiem veica sakņu atdalīšanu, spraudēņus vizuāli novērtēja.

Pirmās 14 dienas visu variantu spraudēņi saglabāja dārza pupiņai raksturīgo tumši zaļo lapu krāsojumu, savukārt, 18. dienā atsevišķiem augiem jau bija vērojama lapu dzeltēšana (2. attēls). Turpmākajā spraudēņu kultivēšanas laikā, lapu dzeltēšana kļuva vizuāli izteiktāka un novēroja gan nekrotisku audu veidošanos, gan pirmo īsto lapu atdalīšanos no spraudēņa dzinuma.



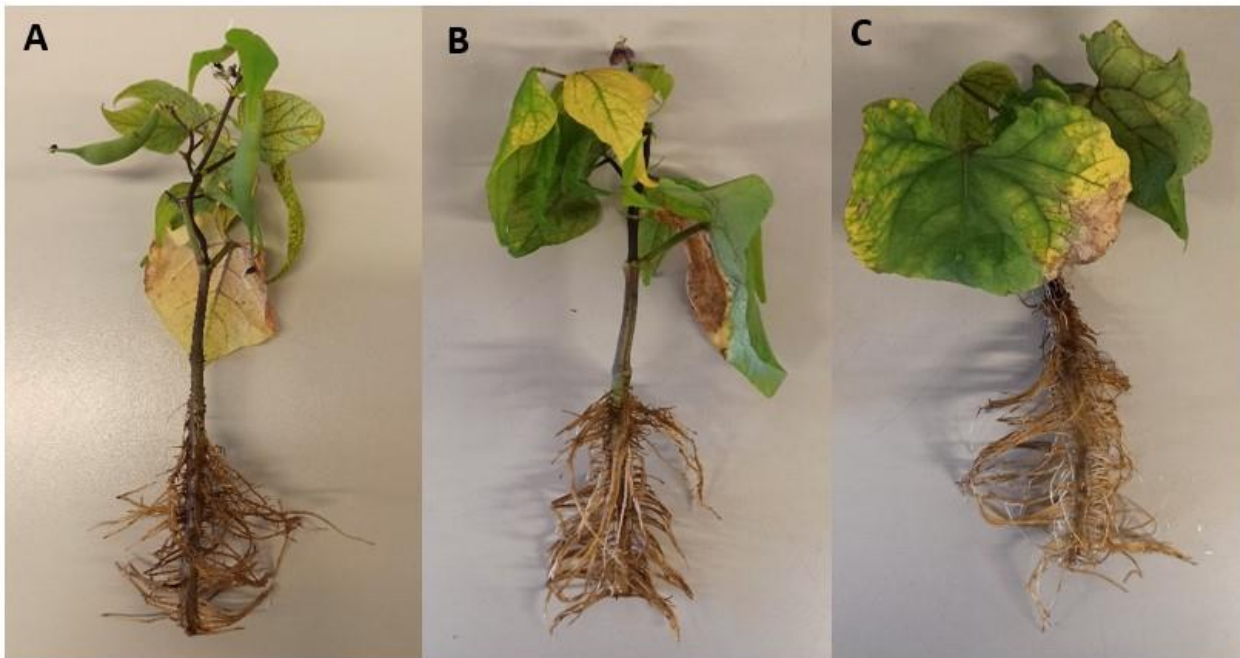
2. attēls. *Phaseolus vulgaris* spraudēņi 18 dienas pēc to ieguves un ekspozīcijas apsākņošanas šķīdumos. A – kontrole; B – ISS 10; C – ISS 50.

Figure 2. Cuttings of *Phaseolus vulgaris* 18 days after exposure in rooting solutions. A – control; B – IBA 10; C – IBA 50.

Spraudeņu kultivēšanas laikā, variantu ietvaros papildus novēroja sekojošas sakarības:

- K – līdz 32. dienai visi augi bija ziedējuši un katram augam bija izveidojies vismaz viens auglis (3. attēls). Visiem augiem 32. dienā bija vērojams attīstījies otrais lapu pāris, tomēr, visiem augiem novēroja izteiktu lapu dzeltēšanu un bija atdalījusies vizmas viena pirmā īstā lapa;

- ISS 10 – līdz 32. dienai desmit augi bija ziedējuši, tomēr, ziedēšanas laiks augiem ļoti atšķīrās varianta ietvaros un, līdz ar to, 32. dienā tikai pieciem augiem bija attīstījies auglis. Otrais lapu pāris bija izveidojies visiem augiem un lielākā daļa augu bija zaudējuši vismaz vienu pirmo īsto lapu;
- ISS 50 – līdz 32. dienai nevienam augam nebija vērojams attīstījies zieds. Visiem augiem bija izveidojies otrs lapu pāris, tomēr, lapas bija salīdzinoši ļoti nelielas. Pirmajam lapu pārim, salīdzinot ar pārējiem variantiem, nebija tik izteikta dzeltēšana un nekrotisko audu veidošanās, kā arī, tikai trīs augi bija zaudējuši vienu pirmo īsto lapu.



3. attēls. *Phaseolus vulgaris* spraudeņi 32 dienas pēc to ieguves un ekspozīcijas apsākņošanas šķīdumos. A – kontrole; B – ISS 10; C – ISS 50.

Figure 3. Cuttings of *Phaseolus vulgaris* 32 days after exposure in rooting solutions. A – control; B – IBA 10; C – IBA 50.

Visi augi bija izveidojuši adventīvās saknes un, lai gan vizuāli bija vērojamas atšķirības sakņu morfoloģijā starp variantiem, tomēr, arī katra varianta ietvaros bija 4 – 5 spraudeņi, kuriem sakņu uzbūve vizuāli ļoti atšķīrās no pārējiem tā paša varianta spraudeņiem. Šīs atšķirības varianta ietvaros atspoguļojas arī turpmākajos rezultātos, kur ir vērojamas vairākas izlecošās vērtības, lielas standartnoviržu vērtības, kā arī plašs datu izkliedes intervāls. Ņemot vērā, ka katra varianta ietvaros visi ārējie apstākļi spraudeņiem bija vienādi, tad šādas atšķirības ir skaidrojamas ar individuālām ģenētiskām īpašībām, un, piemēram, pētījumā ar neļķēm, kur dažādiem

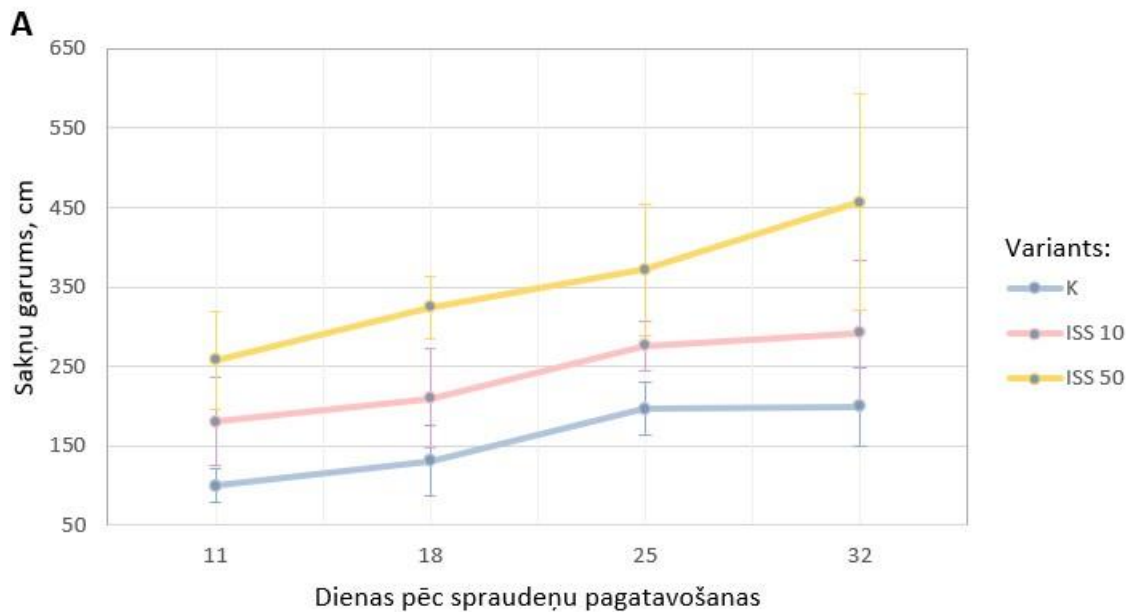
kultivāriem veica gēnu ekspresijas analīzi adventīvo sakņu veidošanās laikā, iegūtie rezultāti liecināja, ka vislielāko ietekmi uz atšķirībām gēnu ekspresijā radīja tieši kultivāra dažādība, savukārt, no pārējiem pārbaudītajiem faktoriem, vismazāko ietekmi radīja ārēji pievadītā augsīna veids (Villacorta-Martin et al. 2015).

## **3.2. Adventīvo sakņu morfoloģijas parametri**

### **3.2.1. Adventīvo sakņu kopējais garums**

Veicot ar WinRhizo programmu iegūto datu analīzi, vērojams, ka spraudēju adventīvo sakņu kopējais garums, spraudēju kultivēšanas periodā, visu variantu ietvaros ir ar pieaugošu tendenci (4. attēls – A). Veicot statistiskā būtiskuma analīzi, vērojams, ka sakņu garuma pieaugums katras atsevišķas nedēļas ietvaros (mērījums veica ik pēc 7 dienām, sākot ar 11 dienu pēc spraudēju pagatavošanas) nav statistiski būtisks (4. attēls – C), liecinot par vienmērīgu adventīvo sakņu augšanu garumā, pārbaudītajā laika posmā.

Nosakot adventīvo sakņu kopējā garuma atšķirības starp variantiem katras mērījumu dienas ietvaros (4. attēls – B), vērojams, ka ISS 50 variantā spraudējiem ir būtiski garākas saknes nekā ISS 10 un kontroles variantos, savukārt, lai gan spraudēju apstrāde eksogēna augsīna šķīdumā ar koncentrāciju  $10 \text{ mg l}^{-1}$  ir veicinājusi sakņu garuma pieaugumu, šīs izmaiņas nav statistiski būtiskas.



**B**

	11	18	25	32
K	a	a	a	a
ISS 10	ab	a	a	a
ISS 50	b	b	b	b

**C**

	11	18	25	32
K	b	ab	a	a
ISS 10	a	a	a	a
ISS 50	b	ab	ab	a

4. attēls. Spraudēju adventīvo sakņu kopējais garums. A – vidējās vērtības ± standarta novirze; B – statistiski būtiskas atšķirības starp variantu vidējām vērtībām attiecīgās mērījumu dienas ietvaros; C - statistiski būtiskas atšķirības starp variantu vidējām vērtībām mērījumu veikšanas periodā, katra varianta ietvaros. Atšķirīgi burti apzīmē būtiskas atšķirības.

Figure 4. Total length of cuttings' adventitious roots. A – mean ± standard deviation; B – statistically significant differences between the average values of the variants within the respective measurement day; C – statistically significant differences between the average values of the variants during the measurement period, within each variant. Different letters indicate significant differences.

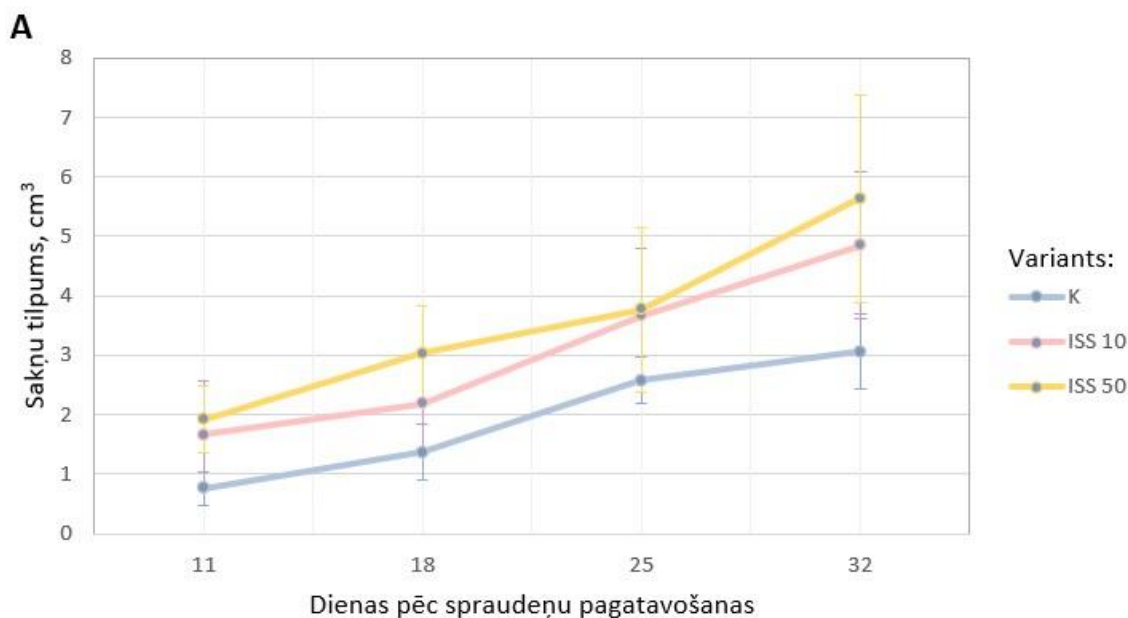
Jāatzīmē, ka eksogēni pievadītam augsīnam, visticamāk, nav tieša veicinoša ietekme uz adventīvo sakņu augšanu garumā, jo, lai gan augsīna koncentrācija ir nozīmīga adventīvo sakņu indukcijas fāzē, kas parasti rezultējas lielākā adventīvo sakņu skaitā, kā arī, ekspresijas fāzē, adventīvo sakņu aizmetnim augot cauri spraudēja audiem virzienā uz ārvidi (Pop et al. 2011), augsīnam kopumā ir vērojama inhibējoša ietekme uz sakņu augšanu garumā (Woodward et al.

2005). Būtiski lielāku adventīvo sakņu kopējo garumu ISS 50 variantā varētu skaidrot ar izteiktāku sakņu zarošanos, bet ņemot vērā, ka arī individuālas saknes šajā variantā bija garākas nekā pārējos variantos, iespējams, attiecīgās auksīna koncentrācijas sistēmiskā ietekme spraudenī kopumā ir rezultējusies adventīvo sakņu pastiprinātā augšanā garumā.

### **3.2.3. Adventīvo sakņu tilpums**

Līdzīgi kā adventīvo sakņu kopējais garums, arī sakņu tilpums visu variantu ietvaros ir ar pieaugošu tendenci (5. attēls – A). ISS 10 un ISS 50 variantos adventīvo sakņu tilpuma pieaugums ir bijis vienmērīgs, savukārt, lai gan kontroles variantā ir vērojama līdzīga tendence, no 18. līdz 25. dienai tilpuma pieaugums šajā variantā ir bijis izteiktāks (5. attēls – C). Šāds novērojums varētu būt skaidrojams ar būtisku hlorofila daudzuma samazinājumu kontroles variantā attiecīgajā laika posmā un, līdz ar to, strauju lapu novecošanos un tā rezultātā iegūto resursu pārdali uz citām aktīvi augošām auga daļām, tādējādi veicinot adventīvo sakņu tilpuma pieaugumu (lapu hlorofila daudzuma mērījumi apkopoti 3.3. nodaļā).

Salīdzinot adventīvo sakņu vidējā tilpuma vērtības starp variantiem, vērojams, ka ISS 50 varianta augiem ir būtiski lielāks sakņu tilpums nekā kontroles varianta augiem, savukārt, nav vērojamas būtiskas atšķirības starp kontroles un ISS 10 variantu augiem, kā arī, starp ISS 10 un ISS 50 variantu augiem (5. attēls – B).



**B**

	11	18	25	32
K	a	a	a	a
ISS 10	ab	ab	a	ab
ISS 50	b	b	a	b

**C**

	11	18	25	32
K	b	b	a	a
ISS 10	c	bc	ab	a
ISS 50	b	b	ab	a

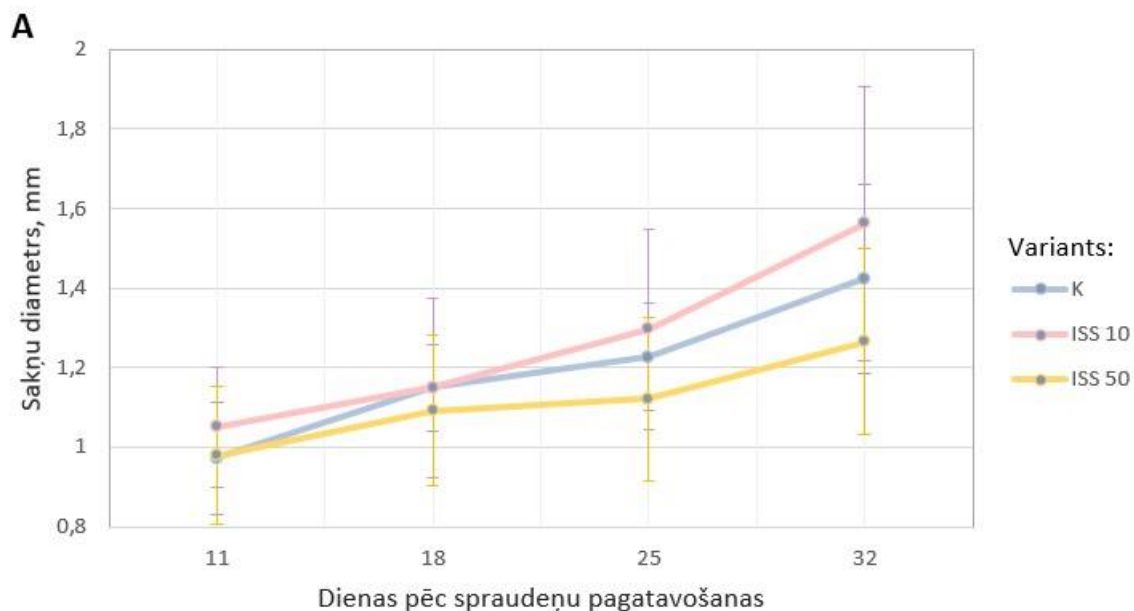
5. attēls. Spraudeņu adventīvo sakņu tilpums. A – vidējās vērtības ± standarta novirze; B – statistiski būtiskas atšķirības starp variantu vidējām vērtībām attiecīgās mērījumu dienas ietvaros; C – statistiski būtiskas atšķirības starp variantu vidējām vērtībām mērījumu veikšanas periodā, katra varianta ietvaros. Atšķirīgi burti apzīmē būtiskas atšķirības.

Figure 5. Volume of cuttings' adventitious roots. A – mean ± standard deviation; B – statistically significant differences between the average values of the variants within the respective measurement day; C – statistically significant differences between the average values of the variants during the measurement period, within each variant. Different letters indicate significant differences.

### 3.2.3. Adventīvo sakņu vidējais diametrs

Visu variantu ietvaros, spraudeņu adventīvo sakņu vidējais diametrs pārbaudītajā laika posmā palielinās (6. attēls – A), tomēr, līdzīgi kā iepriekšējiem parametriem, arī vidējais sakņu diametrs visos variantos ir palielinājies vienmērīgi (6. attēls – C).

Eksogēna augsna pielietojumam nav bijusi būtiska ietekme uz spraudēju adventīvo sakņu vidējo diametru (6. attēls - B), tomēr, jāatzīmē, ka ISS 50 variantā saknēm bija vismazākais vidējais diametrs un, līdz ar to, būtiski lielāka adventīvo sakņu tilpuma vērtība ir iegūta pateicoties sakņu izteiktai augšanai garumā.



**B**

	11	18	25	32
K	a	a	a	a
ISS 10	a	a	a	a
ISS 50	a	a	a	a

**C**

	11	18	25	32
K	a	ab	ab	b
ISS 10	a	ab	ab	b
ISS 50	a	a	a	a

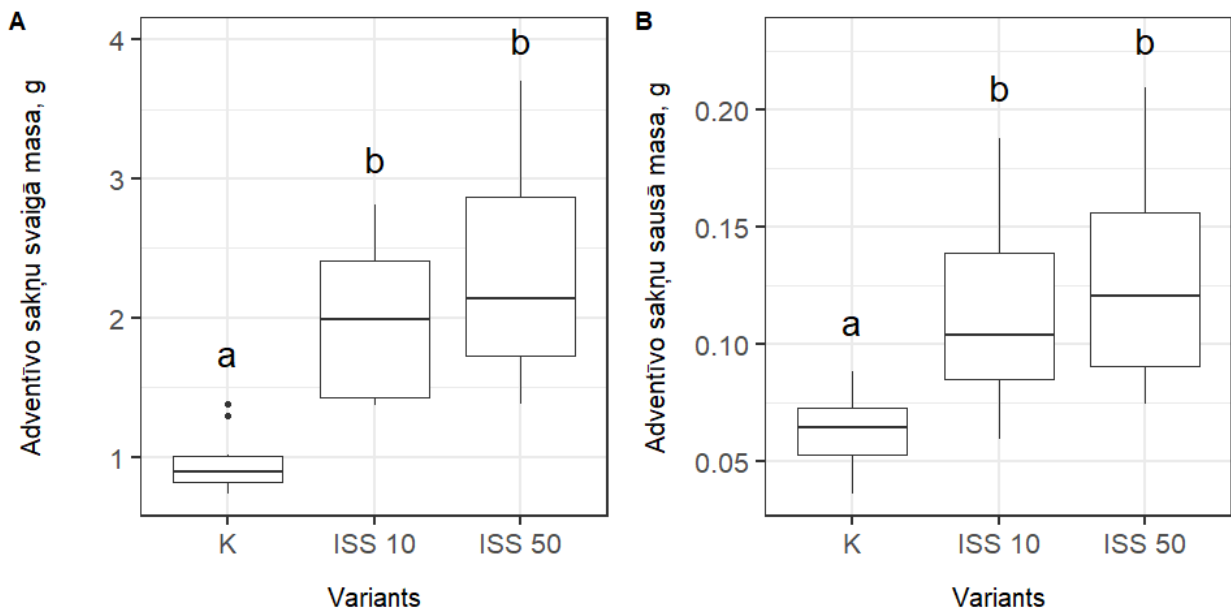
6. attēls. Spraudēju adventīvo sakņu diametrs. A – vidējās vērtības  $\pm$  standarta novirze; B – statistiski būtiskas atšķirības starp variantu vidējām vērtībām attiecīgās mērījumu dienas ietvaros; C - statistiski būtiskas atšķirības starp variantu vidējām vērtībām mērījumu veikšanas periodā, katra varianta ietvaros. Atšķirīgi burti apzīmē būtiskas atšķirības.

Figure 6. Diameter of cuttings' adventitious roots. A - mean  $\pm$  standard deviation; B - statistically significant differences between the average values of the variants within the respective measurement day; C - statistically significant differences between the average values of the variants during the measurement period, within each variant. Different letters indicate significant differences.

### 3.2.4. Adventīvo sakņu svaigā un sausā masa

Eskogēna augsīna pielietojums ir būtiski palielinājis spraudēju adventīvo sakņu masu, gan to nosakot svaigām saknēm, gan pēc ūdens iztvaicēšanas, tomēr, eksogēnā augsīna koncentrācijai nav vērojama būtiska ietekme (7. attēls).

Adventīvo sakņu masas pieaugums eksogēna augsīna ietekmē, visticamāk, ir skaidrojams ar iepriekšminētajām izmaiņām sakņu morfoloģijas raksturojošajos parametros. Lai gan ISS 10 variantā atsevišķi adventīvo sakņu parametri būtiski neatšķīrās no kontroles varianta, tomēr, vidējās vērtības bija augstākas, it īpaši vidējais sakņu diametrs, un to kombinēta ietekme rezultējās būtiski lielākā sakņu masas pieaugumā. ISS 50 variantā adventīvās saknes bija ievērojami garākas un ar lielāku kopējo tilpumu, līdz ar to, lai gan eksogēnā augsīna izmantotajai koncentrācijai šķietami nav būtiska ietekme uz adventīvo sakņu masu, abi izmantotie augsīna šķīdumi ir ietekmējuši atšķirīgas sakņu arhitektūras veidošanos, kas kopumā veidoja līdzīgu sakņu masas pieaugumu.



7. attēls. Spraudēju adventīvo sakņu masa. A – adventīvo sakņu svaigā masa; B – adventīvo sakņu sausā masa. Atšķirīgi burti apzīmē būtiskas atšķirības.

Figure 7. Mass of cuttings' adventitious roots. A – fresh mass of adventitious roots; B – dry mass of adventitious roots. Different letters indicate significant differences.

### 3.2.5. Adventīvo sakņu un to aizmetņu skaits dažādos spraudēna posmos

Katra varianta pieciem spraudēniem veica epidermu šķērsojušu adventīvo sakņu uzskaiti dažādos spraudēna posmos, veicot spraudēna šķērsriezumu pagatavošanu un analīzi izmantojot gaismas mikroskopu (8. attēls).



8. attēls. *Phaseolus vulgaris* spraudēna sakņu zonas šķērsriezums. S – adventīvā sakne. Mērogs – 500  $\mu\text{m}$ .

Figure 8. Cross-section of *Phaseolus vulgaris* cutting's rooting zone. S – adventitious root. Scale - 500  $\mu\text{m}$ .

Atsevišķos gadījumos bija vērojama ne tikai sakņu augšana horizontālā virzienā, bet arī vertikāli, kas ļauj aplūkot adventīvās saknes uzbūvi šķērsriezumā (9. attēls). Adventīvajai saknei ir vērojama tipiska divdīgļlapim raksturīga saknes uzbūve, kas sastāv no perifērijā lokalizēta rizodermas šūnu slāņa, primārās mizas un centrālā cilindra, kurā vērojams triarhs vadaudu kūlīšu sakārtojums.



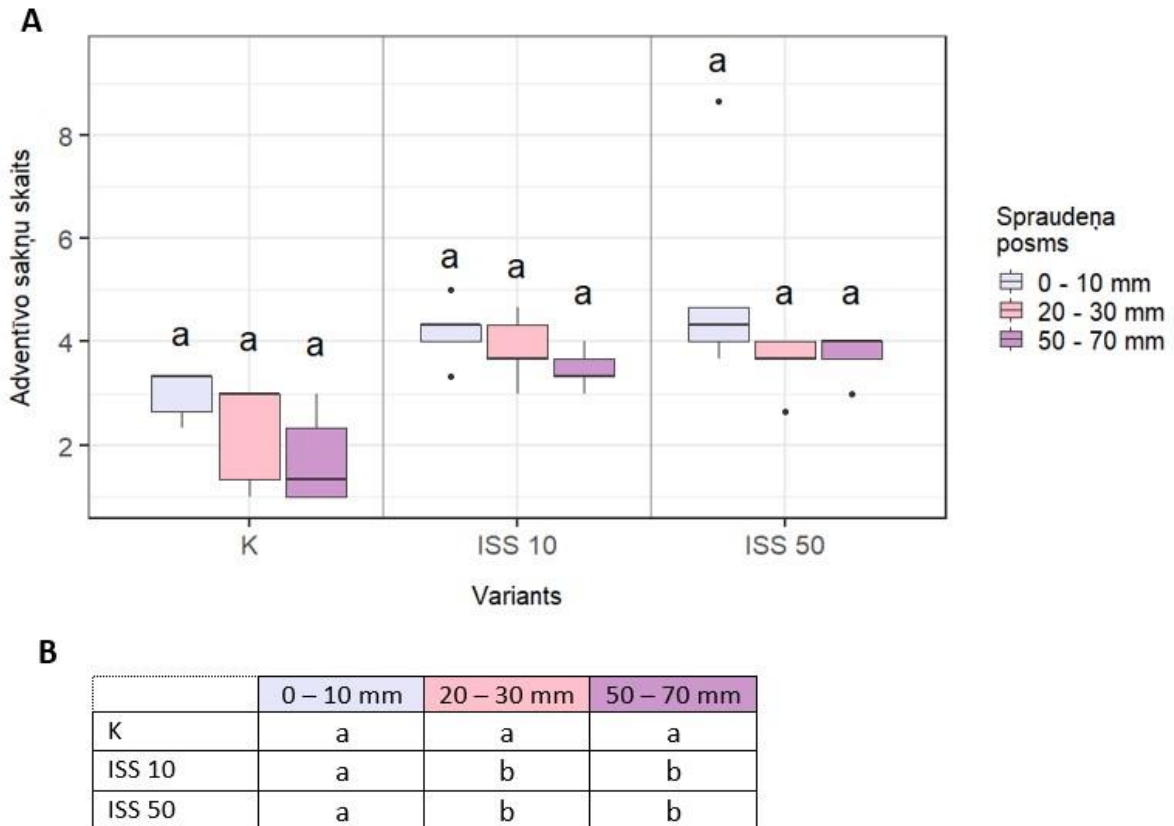
9. attēls. *Phaseolus vulgaris* spraudeņa sakņu zonas šķērs griezumā. S – adventīvā sakne; R – rizoderma; PM – primārā miza; CC – centrālais cilindrs. Mērogs – 200 μm.

Figure 9. Cross-section of *Phaseolus vulgaris* cutting's rooting zone. S – adventitious root; R – rhizodermis; PM – primary cortex; CC – central cylinder. Scale - 200 μm.

Visos variantos nav vērojama būtiska atšķirība starp adventīvo sakņu skaitu atsevišķos spraudeņa posmos paša varianta ietvaros (10. attēls - A), kas liecina par vienmērīgu sakņu izvietojumu spraudeņa sakņu zonā. Ņemot vērā endogēnā augsnes akumulēšanos spraudeņa pamatnē neilgi pēc tā atdalīšanas no mātes auga, bieži ir novērojams būtisks adventīvo sakņu skaita pieaugums tuvu spraudeņa pamatnei (Alaguero-Cordovilla et al. 2021), tomēr, lai gan arī šī pētījuma ietvaros visos variantos vidēji vislielākais adventīvo sakņu skaits bija vērojams spraudeņa posmā 0 – 10 mm, tomēr, adventīvo sakņu skaits šajā posmā būtiski neatšķīrās no to skaita pārējos posmos, kas varētu liecināt par augstu endogēnā augsnes koncentrāciju spraudeņos un par salīdzinoši vienmērīgu tā koncentrācijas gradientu visā hipokotila garumā.

Salīdzinot adventīvo sakņu skaitu starp variantiem (10. attēls – B), vērojams, ka 0 – 10 mm posmā eksogēnā augsnes pievadīšana nav rezultējusi lielākā adventīvo sakņu skaitā, tomēr, posmos 20 – 30 mm un 50 – 70 mm ir vērojams būtiski lielāks sakņu skaits eksogēnā augsnes ietekmē, bet augsnes koncentrācijai nav bijusi būtiska nozīme. Eksogēni pievadīts augsnes šķīduma veidā augā galvenokārt tiek uzņemts caur vadaudu sistēmu, pateicoties lapu

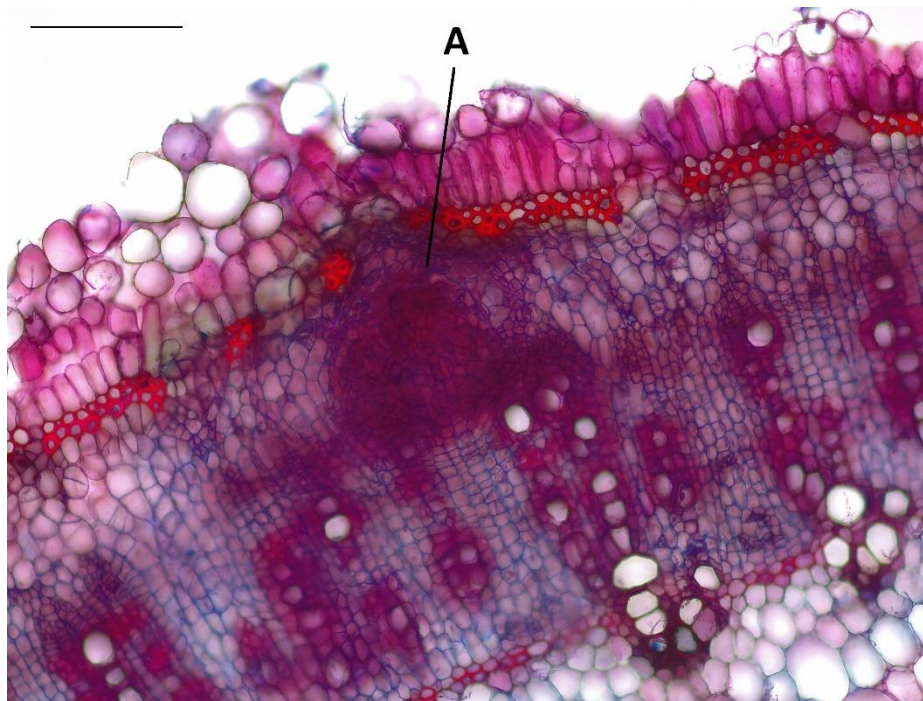
transpirācijas mehānisma nodrošinātajai šķīduma augšupejošai plūsmai (Blythe et al. 2007), tādējādi augsīna koncentrācijai pieaugot arī augstākos spraudņa posmos, kas var palielināt adventīvo sakņu skaitu attiecīgajos posmos.



10. attēls. Adventīvo sakņu skaits atsevišķos spraudņa posmos. B – statistiski būtiskas atšķirības starp variantu vidējām vērtībām attiecīgā spraudņa posma ietvaros. Atšķirīgi burti apzīmē būtiskas atšķirības.

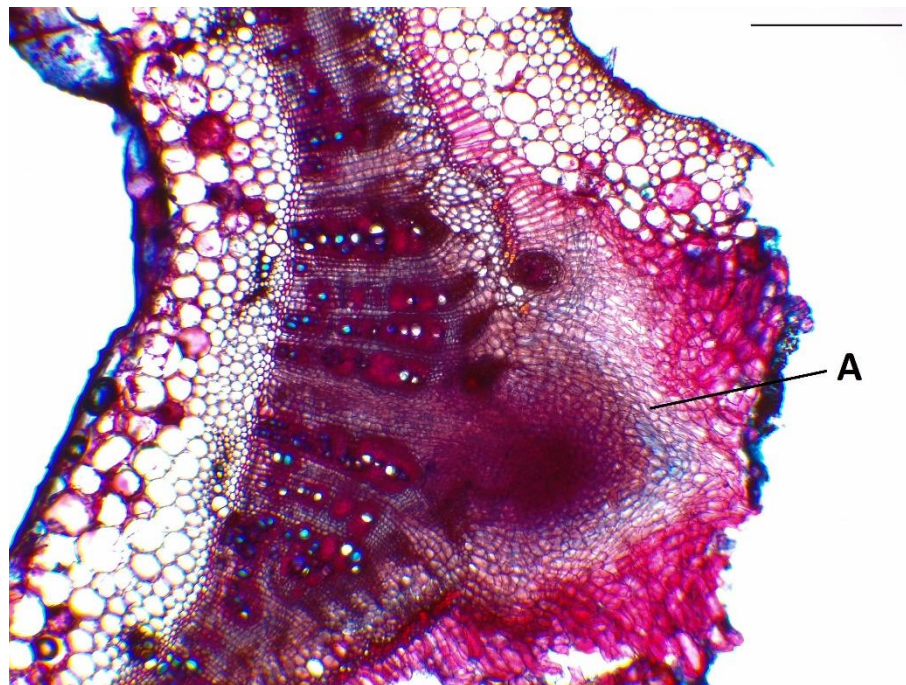
Figure 10. Number of adventitious roots in cuttings' individual segments. B - statistically significant differences between the average values of the variants within the cuttings' segment. Different letters indicate significant differences.

Paralēli adventīvo sakņu uzskaiti, veica arī dažādās attīstības stadijās esošu adventīvo sakņu aizmetņu uzskaiti (11. un 12. attēls).



11. attēls. *Phaseolus vulgaris* spraudņa sakņu zonas šķērs griezums. A – adventīvās saknes aizmetnis. Mērogs – 200  $\mu$ m.

Figure 11. Cross-section of *Phaseolus vulgaris* cutting's rooting zone. A – adventitious root's primordia. Scale - 200  $\mu$ m.



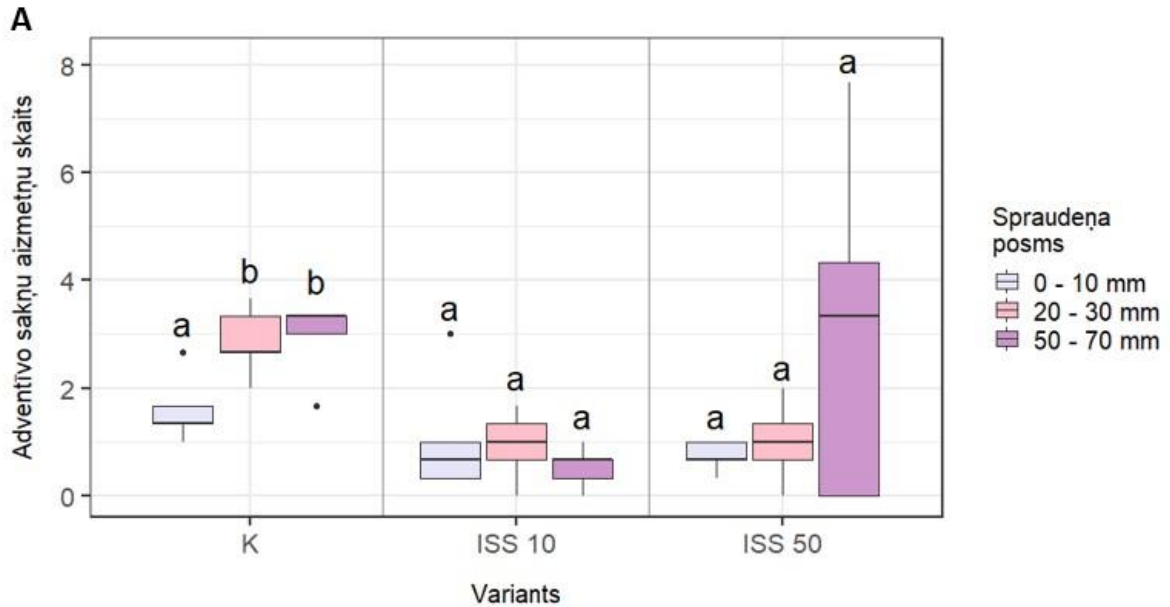
12. attēls. *Phaseolus vulgaris* spraudņa sakņu zonas šķērs griezums. A – adventīvās saknes aizmetnis. Mērogs – 500  $\mu$ m.

Figure 12. Cross-section of *Phaseolus vulgaris* cutting's rooting zone. A – adventitious root's primordia. Scale - 500  $\mu$ m.

Veicot iegūto datu apstrādi, vērojams, ka ISS 10 un ISS 50 variantos nav būtisku atšķirību starp sakņu aizmetņu skaitu dažādos spraudeņa posmos (13. attēls - A), savukārt, kontroles varianta 0 – 10 mm posmā ir ievērojami mazāk aizmetņu nekā abos pārējos posmos. Šādu novērojumu varētu skaidrot ar jau iepriekšminēto iespējamo endogēnā auksīna akumulāciju spraudeņa pamatnē, kā rezultātā vairāk aizmetņu ir varējis attīstīties par pilnvērtīgām saknēm, ņemot vērā nedaudz lielāku adventīvo sakņu skaitu kontroles variantā šajā posmā, nekā pārējos posmos.

Salīdzinot adventīvo sakņu aizmetņu skaitu starp variantiem (13. attēls – B), 0 – 10 mm posmā visi varianti ir bez būtiskām atšķirībām, savukārt, 20 – 30 mm posmā eksogēna auksīna ietekmē ir vērojams mazāks aizmetņu skaits, kā arī, 50 – 70 mm posmā ISS 10 variantā ir būtiski mazāk aizmetņu nekā kontroles variantā. Arī šis novērojams varētu būt saistīts ar lielāka aizmetņu skaita attīstību par funkcionējošām saknēm, ņemto vērā, ka spraudeņu šķērs griezumā ir pagatavoti 32. dienā pēc to apstrādes apsākņošanas šķīdumos.

Jāatzīmē, ka, lai gan ISS 10 un ISS 50 variantos bija ievērojami mazāks adventīvo sakņu aizmetņu skaits, šajos variantos bija vērojama izteikta lūksnes vadaudu parenhimatisko šūnu dalīšanās (11.attēls), kas varētu būt saistīta ar augstu endogēnā auksīna koncentrāciju, kas rezultējusies no eksogēni pievadītā auksīna, tomēr, šī pētījuma ietvaros ir grūti izskaidrot, kāpēc nav vērojama šo šūnu tālāka diferenciacija un sakņu aizmetņu veidošanās, ņemot vērā, ka ar eksogēnu auksīnu apstrādātiem spraudeņiem bieži ir novērojams ievērojami lielāks adventīvo sakņu aizmetņu skaits salīdzinājumā ar kontroles variantu, un, piemēram, pētījumā ar tomātu spraudeņiem jau trešajā dienā pēc to apstrādes ar eksogēnu auksīnu bija vērojams pat astoņas reizes lielāks adventīvo sakņu aizmetņu skaits nekā kontroles variantā (Guan et al. 2019).



**B**

	0 – 10 mm	20 – 30 mm	50 – 70 mm
K	a	a	a
ISS 10	a	b	b
ISS 50	a	b	ab

13. attēls. Adventīvo sakņu aizmetņu skaits dažādos spraudeņa posmos. B – statistiski būtiskas atšķirības starp variantu vidējām vērtībām attiecīgā spraudeņa posma ietvaros. Atšķirīgi burti apzīmē būtiskas atšķirības.

Figure 13. Number of adventitious root's primordia in cuttings' individual segments. B - statistically significant differences between the average values of the variants within the cuttings' segment. Different letters indicate significant differences.

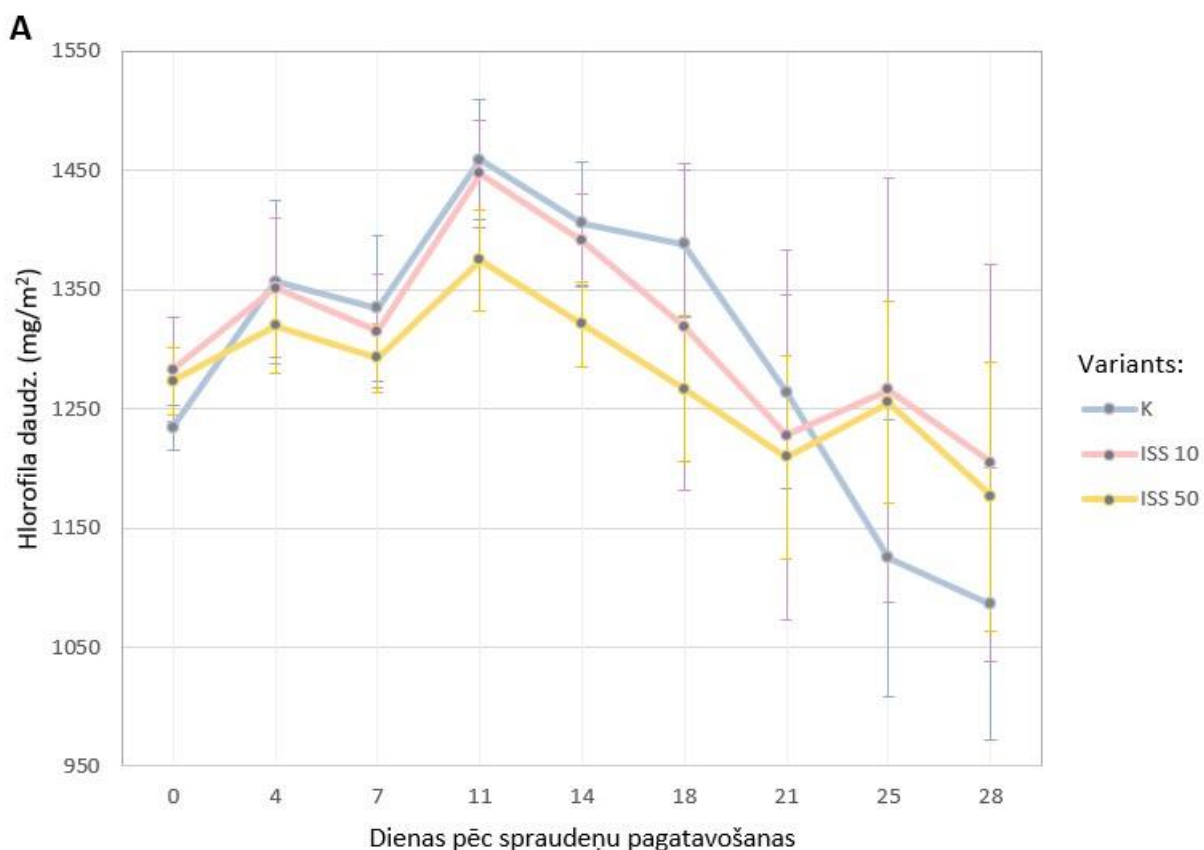
### 3.3. Lapu hlorofila daudzums

Veicot lapu hlorofila daudzuma mērījumus, visos variantos ir vērojamas līdzīgas hlorofila daudzuma vidējo vērtību izmaiņas (14. attēls), kur līdz 11. mērījumu dienai pēc spraudeņu apstrādes ar apsākņošanas šķīdumiem ir vērojams lapu hlorofila daudzuma pieaugums, savukārt, pēc 11. dienas hlorofila daudzums pakāpeniski samazinās.

Ņemot vērā, ka līdz 11. dienai hlorofila daudzums pieauga visos variantos, arī kontroles variantā, šāds novērojums varētu būt skaidrojams ar pirmo lapu pāra augšanu, jo dārza pupiņai pirmo īsto lapu pāris ir pilnība nobriedis augam esot aptuveni divas nedēļas vecam (Makrides et

al. 1981), savukārt, spraudēņu pagatavošanas dienā augi ir 10 dienas veci, un, ņemot vērā, ka vairākiem augiem lapu hlorofila daudzums ir lielāks nobriedušās lapās nekā jaunās lapās (Kamble et al. 2015), tad arī šajā gadījumā, hlorofila daudzuma pieaugums, iespējams, ir skaidrojams ar lapu nobriešanu.

Lapu hlorofila daudzuma straujā samazināšanās pēc 11. mērījumu dienas, visticamāk, ir skaidrojama ar lapu novecošanās procesu, jo arī citā pētījumā ar dārza pupiņām bija vērojama lapu hlorofila daudzuma samazināšanās augam sasniedzot 18 dienu vecumu, kuru pavadīja vairāku citu lapu šūnu komponentu noārdīšanās (Makrides et al. 1981).



**B**

	0	4	7	11	14	18	21	25	28
K	a	a	a	a	a	a	a	a	a
ISS 10	b	ab	ab	a	a	b	ab	b	b
ISS 50	b	b	b	b	b	b	b	b	b

**C**

	0	4	7	11	14	18	21	25	28
K	d	bc	c	a	ab	bc	d	e	e
ISS 10	cde	bc	bcd	a	ab	bc	de	cde	e
ISS 50	bc	b	bc	a	b	c	de	cd	e

14. attēls. Lapu hlorofila daudzums. A – vidējās vērtības ± standarta novirze; B – statistiski būtiskas atšķirības starp variantu vidējām vērtībām attiecīgās mērījumu dienas ietvaros; C – statistiski būtiskas atšķirības starp variantu vidējām vērtībām mērījumu veikšanas periodā, katra varianta ietvaros. Atšķirīgi burti apzīmē būtiskas atšķirības.

Figure 14. Leaf chlorophyll content. A - mean ± standard deviation; B - statistically significant differences between the average values of the variants within the respective measurement day; C - statistically significant differences between the average values of the variants

during the measurement period, within each variant. Different letters indicate significant differences.

Salīdzinot lapu hlorofila daudzumu starp variantiem, vērojams, ka gandrīz visās mērījumu dienās ISS 50 variantā ir būtiski zemāks vidējais lapu hlorofila daudzums nekā kontroles variantā (14. attēls - B). ISS 10 variantam šāda atšķirība no kontroles varianta nav tik izteikta.

Literatūrā ir aprakstīti dažādi iegūtie rezultāti saistībā ar lapu hlorofila daudzuma izmaiņām augus apstrādājot ar eksogēnu augsni un, lai gan bieži ir novērojams būtisks hlorofila daudzuma pieaugums auga lapās (Pacholczak 2015), ir vairāki pētījumi, kuros norādīts, ka eksogēna augsna ietekmē hlorofila daudzums ir mazāks nekā kontroles variantā (Sosnowski et al. 2019; Mesejo et al. 2012), līdz ar to, augsns, iespējams, nav centrālais regulējošais komponents šajā procesā un būtu jāizvērtē citu faktoru ietekme uz lapu hlorofila daudzuma izmaiņām.

Lai gan lapu hlorofila daudzuma samazināšanās pēc 11. mērījumu dienas ir vērojama visos variantos, eksogēna augsna ietekmē šis process ir bijis lēnāks, kas, visticamāk, apstiprina augsna kavējošo ietekmi uz lapu novecošanās procesu.

Izvērtējot šajā pētījumā iegūtos rezultātus, ir vērojams, ka eksogēna augsna pielietojums spraudņu apsākšanas procesā ir ne tikai palielinājis adventīvo sakņu morfoloģiju raksturojošo parametru vērtības, bet arī izraisījis dažādas sistemātiskas izmaiņas augos kopumā.

Dažādas eksogēna augsna koncentrācijas pielietojums ir rezultējis atšķirīgā spraudņu adventīvo sakņu arhitektūras un morfoloģijas veidošanā, kur izmantojot augsna šķīdumu ar koncentrāciju 10 mg l<sup>-1</sup> adventīvās saknes ir vairāk augušas resnumā, bet izmantojot augsna šķīdumu ar koncentrāciju 50 mg l<sup>-1</sup> adventīvās saknes ir izteikti augušas garumā, tomēr, neskatoties uz atšķirībām sakņu morfoloģijā, abos variantos bija vērojams ne tikai lielāks adventīvo sakņu skaits nekā kontroles variantā, bet arī ievērojams sakņu biomasas pieaugums, tādējādi, apstiprinot arī citos pētījumus iegūtos rezultātus, ka eksogēna augsna pielietojums uzlabo spraudņu spēju apsāknoties (Caplan et al. 2018; Kim et al. 2021).

Spraudņu apstrāde ar eksogēnu augsni ir ietekmējusi arī augu vasas tālāku attīstību. Kontroles variantā augi, neskatoties uz to, ka bija jāizveido jauna sakņu sistēma, uzsāka ģeneratīvo daļu attīstību dārza pupiņai raksturīgajā laika posmā, ņemot vērā, ka augu ziedēšana vidēji bija vērojama 31 dienu pēc sēklu iestādīšanas. Spraudņus apstrādājot ar augsna šķīdumu koncentrācijā 10 mg l<sup>-1</sup>, nebija vērojamas lielas atšķirības augu vasas attīstībā, tomēr augi ziedēja vēlāk nekā kontroles variantā, kas, iespējams, ir skaidrojams ar atšķirībām resursu sadalē starp

aktīvi augošām auga daļām, ņemot vērā šajā variantā vērojamo būtisko pieaugumu sakņu biomasā. Spraudeņus apstrādājot ar augsīna šķīdumu koncentrācijā  $50 \text{ mg l}^{-1}$ , ir vērojama paildzināta auga veģetatīvās augšanas fāze, jo neviens no augiem nebija ziedējis pat sasniedzot 49 dienu vecumu un, ņemot vērā, ka endogēnais augsīns ir iesaistīts auga ziedēšanā (Sauer et al. 2013), iespējams, izmantotā eksogēna augsīna koncentrācija bija pārāk liela un inhibēja augu ziedēšanu. Novēlotu augu ziedēšanu varētu arī skaidrot ar eksogēnā augsīna pielietojuma ietekmē novēroto palēnināto lapu novecošanos un, tā kā lapu novecošanās procesā iegūtie resursi tiek transportēti uz aktīvi augošām auga daļām (Thakur et al. 2016), iespējams, nepietiekamais resursu daudzums aizkavēja ziedēšanu.

## SECINĀJUMI

1. Eksogēna augsnes pielietojums palielina dārza pupiņas spraudeņu adventīvo sakņu morfoloģiju raksturojošo parametru vērtības.
2. Atšķirīgu eksogēna augsnes šķīduma koncentrāciju ietekmē dārza pupiņas spraudeņi veido adventīvās saknes ar atšķirīgu arhitektūru un morfoloģiju, kas, tomēr, rezultējas līdzīgā adventīvo sakņu biomasas pieaugumā.
3. Eksogēna augsnes pielietojums palēnina dārza pupiņas spraudeņu lapu novecošanos.
4. Eksogēna augsnes šķīdums ar koncentrāciju  $50 \text{ mg l}^{-1}$  paildzina dārza pupiņas spraudeņu veģetatīvās augšanas fāzi.
5. Saglabājot pētījumā izmantotos vides apstākļus, dārza pupiņas šķirnes “Black Turtle Bean” spraudeņus ir iespējams veiksmīgi apsakņot bez eksogēna augsnes pielietošanas.

## PATEICĪBAS

Izsaku pateicību darba vadītājam Uldim Kondratovičam par ieguldīto darbu un enerģiju bakalaura darba tapšanā, kā arī, izsaku pateicību profesoram Ģedertam Ieviņam par ieguldījumu darba recenzēšanā.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

- Alaguero-Cordovilla A., Sánchez-García A.B., Ibáñez S., Albacete A., Cano A., Acosta M. and Pérez-Pérez J.M. 2021. An auxin-mediated regulatory framework for wound-induced adventitious root formation in tomato shoot explants. *Plant, Cell & Environment*, 44(5): 1642-1662 pp.
- Blythe E.K., Sibley J.L., Tilt K.M. and Ruter J.M. 2007. Methods of auxin application in cutting propagation: A review of 70 years of scientific discovery and commercial practice. *Journal of Environmental Horticulture*, 25(3): 166-185 pp.
- Caplan D., Stemeroff J., Dixon M. and Zheng Y. 2018. Vegetative propagation of cannabis by stem cuttings: effects of leaf number, cutting position, rooting hormone, and leaf tip removal. *Canadian Journal of Plant Science*, 98(5): 1126-1132 pp.
- da Costa C.T., de Almeida M.R., Ruedell C.M., Schwambach J., Maraschin F.S. and Fett-Neto A.G. 2013. When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in plant science*, 4: 133 pp.
- Druege U., Franken P. and Hajirezaei M.R. 2016. Plant hormone homeostasis, signaling, and function during adventitious root formation in cuttings. *Frontiers in Plant Science*, 7: 381 pp.
- Druege U., Hilo A., Pérez-Pérez J.M., Klopotek Y., Acosta M., Shahinnia F., Zerche S., Franken P. and Hajirezaei M.R. 2019. Molecular and physiological control of adventitious rooting in cuttings: phytohormone action meets resource allocation. *Annals of botany*, 123(6): 929-949 pp.
- Durner E.F. 2013. *Principles of horticultural physiology*. CABI. 13-33 pp.
- Guan L., Tayengwa R., Cheng Z.M., Peer W.A., Murphy A.S. and Zhao M., 2019. Auxin regulates adventitious root formation in tomato cuttings. *BMC plant biology*, 19(1): 1-16 pp.
- Guo Y., Ren G., Zhang K., Li Z., Miao Y. and Guo H. 2021. Leaf senescence: Progression, regulation, and application. *Molecular Horticulture*, 1(1): 1-25 pp.
- Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.T., Geneve R.L. 2014. *Hartmann & Kester's plant propagation: principles and practice*. 8th ed. Harlow: Pearson Education, 293-361 pp.

- Hassanein A.M. 2013. Factors influencing plant propagation efficiency via stem cuttings. *Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants*, 5(3): 171-176 pp.
- Herklots G.A.C., Janick J., Synge P.M., Perrott R. 2019. *Horticulture*.  
<https://www.britannica.com/science/horticulture>.
- Hou K., Wu W. and Gan S.S. 2013. SAUR36, a small auxin up RNA gene, is involved in the promotion of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 161(2): 1002-1009 pp.
- Ikezu U.J.M., Udeozo I.P. and Egbe D.E. 2015. Phytochemical and proximate analysis of Black Turtle Beans (*Phaseolus vulgaris*). *Afr J Basic Appl Sci*, 7(2): 88-90 pp.
- Kamble P.N., Giri S.P., Mane R.S. and Tiwana A. 2015. Estimation of chlorophyll content in young and adult leaves of some selected plants. *Universal journal of environmental research and technology*, 5(6): 306-310 pp.
- Kim J.I., Murphy A.S., Baek D., Lee S.W., Yun D.J., Bressan R.A. and Narasimhan M.L. 2011. YUCCA6 over-expression demonstrates auxin function in delaying leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, 62(11): 3981-3992 pp.
- Kochhar S.L. 2020. *Plant physiology: theory and application*. 2nd ed. New York, NY: Cambridge Univeristy Press. 468-480 pp.
- Leakey R.R. 2004. *Physiology of vegetative reproduction*. London: Academic Press, 1655-1668 pp.
- Lim P.O., Lee I.C., Kim J., Kim H.J., Ryu J.S., Woo H.R. and Nam H.G. 2010. Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *Journal of experimental botany*, 61(5): 1419-1430 pp.
- Mahmood K., El-Kereamy A., Kim S.H., Nambara E. and Rothstein S.J. 2016. ANAC032 positively regulates age-dependent and stress-induced senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 57(10): 2029-2046 pp.
- Makrides S.C. and Goldthwaite J. 1981. Biochemical changes during bean leaf growth, maturity, and senescence: Content of DNA, polyribo som es, ribosomal rna, protein, and chlorophyll. *Journal of Experimental Botany*, 32(4): 725-735 pp.

- Mesejo C., Rosito S., Reig C., Martínez-Fuentes A. and Agustí M. 2012. Synthetic auxin 3, 5, 6-TPA provokes *Citrus clementina* (Hort. ex Tan) fruitlet abscission by reducing photosynthate availability. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31(2): 186-194 pp.
- Michniewicz M., Brewer P.B. and Friml J. 2007. Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 5.
- Miklas P.N. and Singh S.P. 2007. Common bean. In *Pulses, sugar and tuber crops*. Berlin: Springer. 1-31 pp.
- OECD. 2016. Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, Volume 6: OECD consensus documents, harmonisation of regulatory oversight in biotechnology, 187 – 209 pp.
- Pacholczak A. 2015. The effect of the auxin application methods on rooting of *Physocarpus opulifolius* Maxim. cuttings. *Propag Ornament Plants*, 15(4): 147-153 pp.
- Pacurar D.I., Perrone I. and Bellini C. 2014. Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. *Physiologia plantarum*, 151(1): 83-96 pp.
- Pop T.I., Pamfil D. and Bellini C. 2011. Auxin control in the formation of adventitious roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanica Cluj-Napoca*, 39(1): 307-316 pp.
- Rosquete M.R., Barbez E. and Kleine-Vehn J. 2012. Cellular auxin homeostasis: gatekeeping is housekeeping. *Molecular plant*, 5(4): 772-786 pp.
- Sauer M., Robert S. and Kleine-Vehn J. 2013. Auxin: simply complicated. *Journal of experimental botany*, 64(9): 2565-2577 pp.
- Sosnowski J., Malinowska E., Jankowski K., Król J. and Redzik P. 2019. An estimation of the effects of synthetic auxin and cytokinin and the time of their application on some morphological and physiological characteristics of *Medicago x varia* T. Martyn. *Saudi journal of biological sciences*, 26(1): 66-73 pp.
- Thakur N., Sharma V. and Kishore K. 2016. Leaf senescence: an overview. *Indian Journal of Plant Physiology*, 21(3): 225-238 pp.
- Urry L.A., Cain M.L., Wasserman S.A., Minorsky P.V., Reece J.B., Campbell N.A. 2017. *Campbell biology*. 11th ed. New York, NY: Pearson Education, 755-870 pp.

- Villacorta-Martín C., Sánchez-García A.B., Villanova J., Cano A., van de Rhee M., de Haan J., Acosta M., Passarinho P. and Pérez-Pérez J.M. 2015. Gene expression profiling during adventitious root formation in carnation stem cuttings. *BMC genomics*, 16(1): 1-18 pp.
- Woodward A.W. and Bartel B. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of botany*, 95(5): 707-735 pp.

Bakalaura darbs „Eksogēnā auksīna ietekme uz dārza pupiņas (*Phaseolus vulgaris*) spraudēņu rizoģenēzi un lapu hlorofila daudzumu” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

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

Autore: Krista Krišlauka 27.05.2022.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr. biol., asoc. prof. Uldis Kondratovičs 27.05.2022.

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

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē 27.05.2022.

Lietvede: .....

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr. , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: