
Selekcija ir sėklininkystė
Selection and Seed growing
Селекция и семеноводство

**Vasarinio rapso dihaploidinių linijų sėklų kokybė
ir vertingų rekombinantų atranka**

**Natalija Burbulis,
Liuda Žilėnaitė,
Algirdas Sliesaravičius**

*Lietuvos žemės ūkio universitetas,
Studentų g. 11,
LT-4324 Akademija, Kauno rajonas*

1999 m. Lietuvos žemės ūkio universiteto (LŽŪU) Genetikos-biotechnologijos laboratorijoje sukurtos 9 vasarinio rapso (*Brassica napus* L.) dihaploidinės (DH) linijos, taikant izoliuotų mikrosporų metodą. DH augalai yra genetiškai gryni – homozigotiniai pagal visus genus, todėl jų panaudojimas sutrumpintų rapsų naujų veislių kūrimą (selekcinių procesą).

Sukurtos vasarinio rapso DH linijos pasižymi didele visų kokybinių rodiklių įvairove. DH linijų sėklų biocheminius rodiklius lemia genetinės dihaploidų savybės. Įvertinus sukurtų DH linijų sėklų kokybę, atrinkti 5 selekciniu požiūriu vertingi rekombinantai su didesniu riebalų kiekiu (43,11%), oleino ir linolio rūgščių suma (85,02%) bei mažesniu gliukozinolatų kiekiu (13,75 mmol/g).

Įvertinta DH linijų sėklų riebalų rūgščių sudėtis ir nustatytas biocheminių rodiklių tarpusavio ryšys. Atrinkti vertingi rekombinantai bus panaudoti vasarinių rapsų selekciniam procese.

Raktažodžiai: vasarinis rapsas, dihaploidinės linijos, izoliuotų mikrosporų kultūra, sėklų biocheminiai rodikliai

ĮVADAS

Augalų selekcijoje vis dažniau taikomi augalų biotechnologijos metodai: somatinių audinių kultūra, dulkinų kultūra, mikrosporų kultūra, genų inžinerija ir kiti. Šiais metodais galima išspręsti daug augalų pagerinimo uždavinių, kurių sprendimas tradiciniais selekcijos metodais buvo nerezultatyvus [9]. Selekciniame darbe tinkamiausi sporofitai su gametinių chromosomų skaičiumi – haploidai, kurie leidžia analizuoti tiesioginį recesyvinio geno pasireiškimą individo fenotipe. Rapsų haploidams kurti vis plačiau taikomas izoliuotų mikrosporų metodas, leidžiantis gauti neribotą androgeninių embrionų kiekį ribotoje erdvėje. Iš haploidų gauti diploidiniai augalai yra genetiškai gryni – homozigotiniai pagal visus genus. Tai paspartina selekcijos procesą ir labai sumažina darbo apimtį [2, 4]. Palyginus su klasikine selekci-

jos metodais, dihaploidų panaudojimas sutrumpina rapsų selekciją mažiausiai 5 vegetaciniais periodais [7].

Labai svarbi atsarginė medžiaga rapsų sėklose yra riebalai (aliejus), kurių kokybę lemia riebalų rūgščių sudėtis. Riebalų rūgščių santykio pakitimai rapsų linijose ir populiacijose dažnai priklauso nuo aplinkos veiksnių, todėl pageidaujamo riebalų rūgščių santykio genetinė kontrolė ir jo stabilizavimas būna sunkus selekcinio darbo uždavinys. Taikant tradicinius selekcijos metodus, F₂ generacijoje kiekvienas augalas tuo pačiu metu atspindi visas genetines savybes ir aplinkos veiksnių įtaką, todėl dažnai sunku nustatyti vien genetinius pakitimus. Tradiciniai selekcijos metodai yra neefektyvūs, norint pakeisti riebalų sudėtį, išskyrus tuos atvejus, kai siekiama didelių pasikeitimų [6]. Tiriant rapsų riebalų rūgščių sudėtį nustatyta, kad po hibridizacijos tik F₅ kartoje beveik

nevyksta skilimas pagal šį požymį, tuo tarpu dihaploidai jau F_1 kartoje būna homozigotiniai ir atspindi visus galimus riebalų rūgščių sudėties gametinius rinkinius [3].

Rapsai, kaip ir visi kryžmažiedžiai augalai, akumuliuoja gliukozinolatus, kurių skilimo produktai yra toksiški. Gliukozinolatų kiekis rapsų sėklose ribojamas ir leistina jų norma sėkliniuose rapsuose yra 20 $\mu\text{mol/g}$. Labai svarbu, kad sukurtos vasarinio rapsa DH linijos pagrindiniais kokybės rodikliais atitiktų standarto reikalavimus ir būtų įtrauktos į vasarinio rapsa selekcijos procesą. Darbo tikslas – sukurti vasarinio rapsa dihaploidus ir atrinkti tinkamiausias linijas auginti Lietuvos sąlygomis.

TYRIMŲ SĄLYGOS IR METODIKA

Dihaploidinės linijos (DH) buvo sukurtos 1999 m. LŽŪU Genetikos-biotechnologijos laboratorijoje, taikant izoliuotų mikrosporų kultūros metodą. Donoriniai augalai buvo vasarinio rapsa (*Brassica napus* L.) F_1 hibridai Nr. 268 ir Nr. 269, gauti kryžminant veisles ‘Bolero’ ir ‘Star’ reciprokinio būdu LŽŪU Bandytųjų stotyje 1997 m. Mikrosporų izoliavimas atliktas, panaudojus Kanados mokslininkų metodiką (Fletcher, 1998). Donorinių augalų sterilūs butonai susmulkinti 13% sacharozės tirpale ir perfiltruoti. Mikrosporos nusodintos centrifuguojant 1000 aps./min. greičiu. Izoliuotų mikrosporų suspensijai paruošti naudojama modifikuota NLN maitinamoji terpė. Palaikius suspensiją 14 dienų tamsoje 30°C temperatūroje, ji perkeliama ant kratytuvo (60 jud./min.). Praėjus 28 d. po mikrosporų izoliavimo, pasiekę morfologinę brandą androgeniniai embrionai perkelti ant agarizuotos B_5 terpės ir laikyti augimo kameroje (4°C, fotoperiodas 8 val.). Po 10 d. augimo režimas pakeistas į šiltą inkubavimą (27 \pm 2°C, fotoperiodas 12 val.).

Vasariinių rapsų haploidai buvo poliploidizuoti 0,34% kolchicino tirpalu. Kiekvienas dihaploidinis augalas butonizacijos tarpsnyje izoliuojamas, siekiant išlaikyti linijos grynumą.

Sukurtos vasariinių rapsų DH linijos buvo auginamos vienu pakartojimu LŽŪU Bandytųjų stoties vasarinio rapsa selekciniam augyne. Tiriamųjų laukelių dydis – 1,7 x 1,2 = 2,04 m². Standartinėmis pasirinktos vasarinio rapsa veislės ‘Bolero’, ‘Star’ ir jų hibridai Nr. 268 ir Nr. 269. Bandymai buvo įrengti sukultūrintame karbonatingame sekliai paglėjęjusiam išplautžemyje.

Vasariinių rapsų DH linijų sėklų biocheminė sudėtis nustatyta Kanados Guelpho universiteto Rapsų biotechnologijos laboratorijoje. Riebalų ir baltymų kiekiai nustatyti NIR infraraudonųjų spindulių analizatoriumi. Riebalų rūgščių sudėtis įvertinta aukšto slėgio skystiniu chromatografu (HPLC). Gliuko-

zinolatų kiekis sėklose nustatytas dujiniu chromatografu (Hewlett-Packard GC). Tyrimų duomenys apdoroti statistiniais metodais, naudojant kompiuterinių programų paketą „Selekcija“.

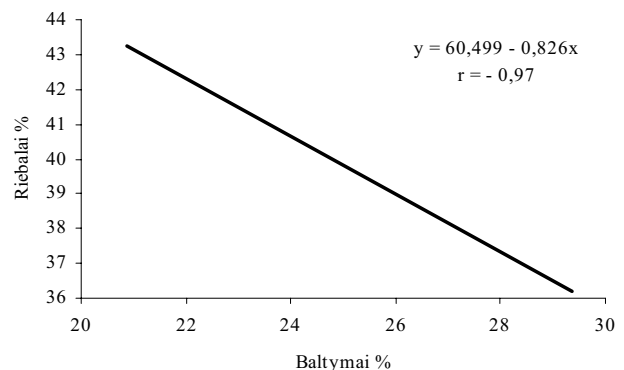
TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Kiekvienas dihaploidas reprezentuoja unikalias genetines tėvinių formų rekombinacijas. Todėl dihaploidinės linijos, sukurtos izoliuotų mikrosporų metodo pagrindu, pasižymėjo didele įvairove visais kokybės rodikliais. Tyrimo metais vasarinio rapsa dihaploidinių linijų sėklose nustatyta nuo 36,68 iki 43,11% riebalų. Literatūros duomenimis [8, 10], tarp baltymų ir riebalų kiekių rapsų sėklose visada egzistuoja atvirkštinis ryšys, kuris, daugelio mokslininkų nuomone, mažai priklauso nuo augimo sąlygų ir auginimo technologijų. Tai patvirtina ir mūsų tyrimų rezultatai.

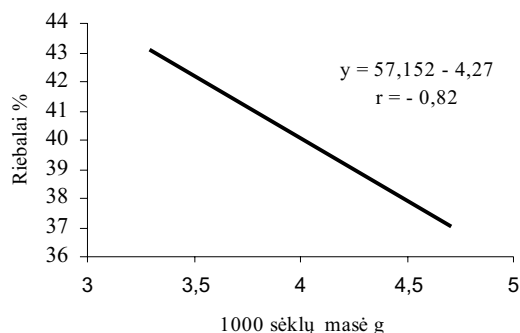
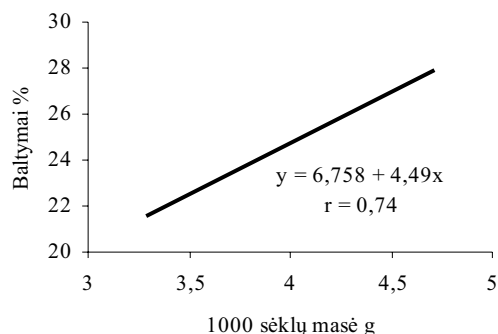
Tyrimais nustatyta koreliacija tarp baltymų ir riebalų kiekių vasarinio rapsa DH linijų sėklose. Šią priklausomybę statistiškai patikimai atspindi atvirkštinė tiesinė regresijos lygtis (1 pav.). Koreliacijos koeficientas labai artimas vienetui ir matematiškai patikimas esant 01 tikimybės lygiui.

Sėkloms bręstant, jose vyksta du pagrindiniai konkuruojantys ir glaudžiai tarpusavyje susiję procesai – baltymų sintezė iš aminorūgščių ir riebalų sintezė iš glicerino ir riebalų rūgščių. Literatūros duomenimis [12], meteorologinės sąlygos vegetacijos metu turi įtaką sėklos cheminei sudėčiai. Riebalai turi kur kas daugiau vandens negu baltymai, todėl trūkstant drėgmės, jų sintezė sulėtėja ir sėklose didėja baltymų kiekis. Didėjant kritulių kiekiui, kai saulės spinduliuotė bei oro temperatūra žemėja, lapuose stiprėja angliavandenių sintezė, o sėklose – riebalų sintezė. Tai reiškia, kad, didėjant riebalų kiekiui sėklose, baltymų kiekis mažėja, ir atvirkščiai.

Riebalų ir baltymų suma dihaploidinių linijų sėklose tyrimų metais kito tarp 63,19 ir 66,05%. Šie duomenys yra analogiški literatūroje skelbiamiems duomenims [1].



1 pav. Koreliacija tarp baltymų ir riebalų kiekio vasarinio rapsa DH linijų sėklose



2 pav. Koreliacija tarp 1000 sėklų masės, baltymų ir riebalų kiekio vasarinio rapso DH linijų sėklose

Atlikta koreliacinė-regresinė duomenų analizė parodė, kad riebalų ir baltymų kiekis vasarinio rapso sėklose priklauso ir nuo sėklų masės (2 pav.).

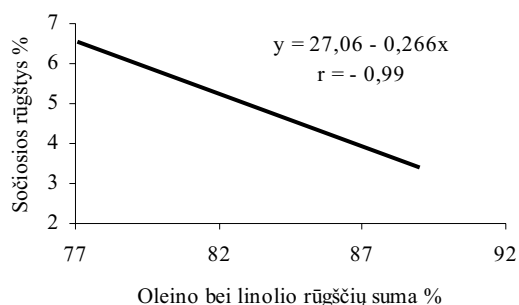
Didėjant vasarinio rapso dihaploidinių linijų sėklų masei, riebalų kiekis jose mažėjo, o baltymų – didėjo. Šias priklausomybes statistiškai patikimai atspindi tiesinės regresijos lygtys, o koreliacijos koeficientai patikimi 05 tikimybės lygiu. Skaičiavimai rodo, kad 1000 sėklų masei padidėjus 0,50 g, riebalų sumažėjo 2,14 proc. vnt., o baltymų padaugėjo 2,24 proc. vnt.

Egzistuojanti atvirkštinė neigiama koreliacija tarp riebalų ir 1000 sėklų masės apsunkina stambiasėklių riebalingų linijų kūrimą. Nors tarp šių rodiklių nustatytas gana stiprus koreliacinis ryšys, kai kuriose linijose šios priklausomybės nenustatyta. DH linija 711–06 subrandino stambias (3,99 g) ir didelio riebalingumo (43,06 proc. vnt.) sėklas.

Rapsų selekcijoje svarbu ne tik sėklų riebalingumas, bet ir riebalų rūgščių sudėtis. Dihaploidinės linijos yra patogus objektas įvertinti rapsų sėklų biocheminių rodiklių tarpusavio ryšį. Nustatyta, kad vasarinio rapso dihaploidinių linijų riebalų kiekis teigiamai koreliuoja su oleino rūgštimi ir neigiamai su linolio rūgštimi (lentelė).

Fiziologiškai aktyvi oleino rūgštis neigiamai koreliuoja su nepageidaujamos palmitino, stearino ir linoleno rūgštimis bei teigiamai – su linolio rūgštimi. Linoleno rūgšties kiekio vasarinio rapso sėklose padidėjimas glaudžiai susijęs su palmitino rūgšties kiekio padidėjimu – koreliacijos koeficientas artimas vienetui ir patikimas 05 tikimybės lygiu.

Selekcinių uždavinių – sukurti stabilias rapsų dihaploidines linijas su didesne oleino ir linolio riebalų rūgščių suma bei mažesniais sočiųjų (palmitino ir stearino) rūgščių kiekiais [11]. Tyrimai rodo, kad tarp šių rodiklių egzistuoja stiprus koreliacinis ryšys, kurį statistiškai patikimai atspindi atvirkštinė tiesinė regresijos lygtis (3 pav.), o koreliacijos koeficientas patikimas 01 tikimybės lygiu.



3 pav. Koreliacija tarp oleino bei linolio rūgščių sumos ir sočiųjų rūgščių vasarinių rapsų DH sėklose

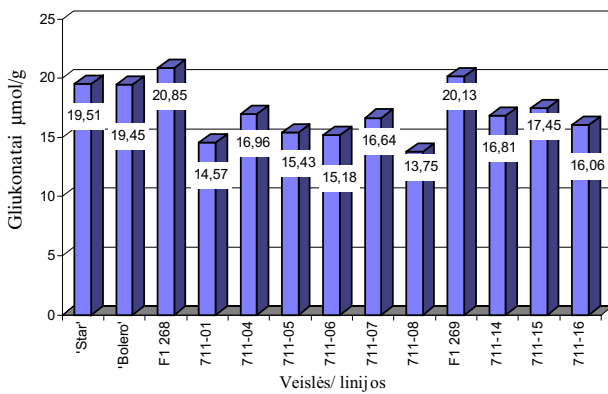
Oleino ir linolio rūgščių suma vasarinio rapso DH linijų sėklose svyruoja nuo 77,09 iki 85,02%.

Visose vasarinio rapso dihaploidinėse linijose gliukozinolatų kiekis neviršijo Lietuvos Respublikos standarto reikalavimų sėkliniams rapsams – 20 $\mu\text{mol/g}$ (4 pav.).

Tyrimų metais vasarinio rapso dihaploidinės linijos sukauptė nuo 13,75 iki 17,45 $\mu\text{mol/g}$ gliukozinolatų. Iš grupės Nr. 268 mažiausias (13,75 $\mu\text{mol/g}$) gliukozinolatų kiekis nustatytas sėklose DH linijos 711-08, kuri sukauptė mažiau gliukozinolatų: 5,7 $\mu\text{mol/g}$ negu veislė ‘Bolero’, 5,76 $\mu\text{mol/g}$ – negu veislė ‘Star’ ir 7,1 $\mu\text{mol/g}$ – nei šių veislių hibridas. Kiek didesnis (14,57 $\mu\text{mol/g}$) gliukozinolatų kiekis nustatytas dihaploidų 711-01 sėklose.

Iš grupės Nr. 269 mažiausias (16,06 $\mu\text{mol/g}$) gliukozinolatų kiekis nustatytas DH linijos 711-16 sėklose. Šios linijos augalai sukauptė mažiau gliukozinolatų: 3,45 $\mu\text{mol/g}$ – negu veislė ‘Star’,

| Lentelė. Vasarinio rapso DH linijų riebalų rūgščių kiekių koreliaciniai ryšiai | | | | | |
|--|-----------|----------|--------|---------|----------|
| | Palmitino | Stearino | Oleino | Linolio | Linoleno |
| Riebalai | - 0,20 | - 0,02 | 0,38 | - 0,36 | - 0,18 |
| Palmitino | | 0,85 | - 0,81 | 0,17 | 0,99 |
| Stearino | | | - 0,89 | 0,52 | 0,84 |
| Oleino | | | | - 0,70 | - 0,76 |
| Linolio | | | | | 0,16 |



4 pav. Gliukozinolatų kiekis vasarinio rapso DH linijų, tėvinių formų bei donorinių augalų sėklose

3,39 µmol/g – negu veislė 'Bolero' ir 4,07 µmol/g – negu šios grupės donorinis augalas.

Tyrimais nustatyta, kad gliukozinolatų kiekis vasarinių rapsų dihaploidinių linijų sėklose teigiamai koreliuoja su baltymų kiekiu ir 1000 sėklų mase, bei neigiamai – su riebalų kiekiu. Skaičiavimai rodo, kad gliukozinolatų kiekiui padidėjus 1 µmol/g, riebalų sumažėja 0,91 proc. vnt. (koreliacijos koeficientas – 0,85), o baltymų padaugėja 1,09 proc. vnt. (koreliacijos koeficientas 0,81).

IŠVADOS

1. Sukurtos genetiškai stabilios vasarinio rapso dihaploidinės linijos, kurių sėklos išsiskyrė geriausiai kokybiniais rodikliais.

2. DH linijų sėklų kokybinių rodiklių ir 1000 sėklų masės kitimus atspindi skirtingos krypties koreliaciniai ryšiai: baltymų ir riebalų kiekio – stiprus neigiamas koreliacinis ryšys; 1000 sėklų masės ir riebalų kiekio – stiprus teigiamas koreliacinis ryšys (išskyrus DH liniją 711-06); 1000 sėklų masės ir baltymų kiekio – stiprus teigiamas koreliacinis ryšys.

3. Įvertinta DH linijų sėklų riebalų rūgščių sudėtis ir nustatytas biocheminių rodiklių tarpusavio ryšys: DH linijų riebalų kiekis teigiamai koreliuoja su oleino rūgštimi ir neigiamai – su linolio rūgštimi; nustatyta sočiųjų riebalų rūgščių, oleino ir linolio rūgščių sumos atvirkštinė tiesinė koreliacija. Oleino ir linolio rūgščių sumai padidėjus 1proc. vnt., sočiųjų rūgščių suma sumažėja 0,27 proc. vnt.

4. Visose DH linijų sėklose nustatytas mažesnis gliukozinolatų kiekis (nuo 13,75 iki 17,45 µmol/g) negu tėvinių veislių (19,45–19,51 µmol/g) ir donorinių augalų sėklose (20,13–20,85 µmol/g). Mažiausias gliukozinolatų kiekis – DH linijų 711-01 ir 711-08 sėklose, atitinkamai 25 ir 29% mažesnis negu tėvinių formų, 30 ir 34% mažesnis negu donorinių augalų sėklose.

5. Nustatytas gliukozinolatų, riebalų ir baltymų kiekio stiprus koreliacinis ryšys. Vasarinio rapso DH linijų sėklose gliukozinolatų kiekiui padidėjus 1 µmol/g, riebalų sumažėja 0,91 proc. vnt., o baltymų padaugėja 1,09 proc. vnt.

Gauta
2001 07 11

Literatūra

1. Butkutė B., Mašauskienė A., Šidlauskas G. ir kt. Agronominių veiksnių ir augimo sąlygų įtaka žaliųjų baltymų ir žaliųjų riebalų kiekiui bei riebalų rūgščių kompozicijos kitimui vasarinių rapsų sėklose // Žemdirbystė. Mokslo darbai. Akademija, 2000. T. 70. P. 160–174.
2. Charne D. G. Comparative analyses of microspore-derived and conventional inbred populations of spring oilseed rape (*Brassica napus* L.). Ph. D. Thesis, department of Crop Science, University of Guelph, Ontario, Canada, 1990. 78 p.
3. Chen J. L. and Beversdorf W. D. Fatty acid inheritance in a microspore-derived population of spring rapeseed (*Brassica napus* L.) // Theoretical and Applied Genetics. 1990. Vol. 80. P. 465–469.
4. Chen J. L. and Beversdorf W. D. A comparison of traditional and haploid-derived breeding population of oilseed rape (*Brassica napus* L.) for fatty acid composition of seed oil // Euphytica. 1990. Vol. 51. P. 59–65.
5. Fletcher R., Coventry J., Kott L. S. Doubled haploid technology for spring/winter *Brassica napus*. OAC Publication. Guelph, Ontario, Canada: University of Guelph, 1998. 48 p.
6. Kott L. S. Production of mutants using the rapeseed doubled haploid system // Induced mutations and molecular techniques for crop improvement / IAEA/FAO Proceedings and International Symposium on the Use of Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement. Vienna, Austria, 1996. P. 505–515.
7. Kott L. S. Application of doubled haploid technology in breeding of oilseed *Brassica napus* // AgBiotechNews and Information. 1998. Vol. 10 (3). P. 69N–74N.
8. Rudolf F. Inter- and intraspecific differences in the variability and correlation of seed oil fatty acids // Proceedings of the 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, 1995. Vol. 4. P. 1141–1143.
9. Stanys V. *In vitro* kultūra augalų selekcijoje. Kintamumas ir stabilumas. Baltai, 1997. 120 p.
10. Uppström B. Seed chemistry // D. S. Kimber and D. J. McGregor (Eds.). *Brassica Oilseeds – Production and Utilization*, CAB, Wallingford, UK, 1995. P. 217–242.
11. Wiberg E., Rahlen L., Tillberg E. et al. The microspore derived embryos of *Brassica napus* as a tool for studying embryos-specific lipid biogenesis and regulation of oil quality // Theoretical and Applied Genetics. 1991. Vol. 82. P. 515–520.

12. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений / Под ред. Третьякова Н. Н. Москва, 1998. С. 590–597.

Natalija Burbulis, Liuda Žilėnaitė,
Algirdas Sliesaravičius

SEED QUALITY OF SPRING RAPE DOUBLE HAPLOID LINES AND SELECTION OF VALUABLE RECOMBINANTS

S u m m a r y

Nine spring rape double haploid (DH) lines have been developed in 1999 at the Genetic-Biotechnology Laboratory of the Lithuanian University of Agriculture. The DH line of spring rape (*Brassica napus* L.) was obtained using an isolated microspore culture.

DH plants are genetically fixed – homozygous by all genes. Double haploid lines differ greatly by all quality traits. The biochemical composition of rapeseed depended on the genetic features of DH lines.

Valuable seed quality combinations of oil (43.11%), high oleic-linolic acid (85.02%) and low glucosinolates (13.75 μmol/g) were identified in five DH lines. A strong correlation of the biochemical parameters was observed. Valuable recombinants have been involved into the breeding process.

Key words: spring rapeseed, double haploid, isolated microspore culture, biochemical traits

Наталия Бурбулис, Люда Жиленайте,
Альгирдас Слесаравичюс

КАЧЕСТВО СЕМЯН ДИГАПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ ЯРОВОГО РАПСА И ОТБОР ЦЕННЫХ РЕКОМБИНАНТОВ

Р е з ю м е

Дигаплоидные линии (ДГ) ярового рапса (*Brassica napus* L.) были созданы в Лаборатории генетики и биотехнологии Литовского сельскохозяйственного университета в 1999 г. с использованием культур изолированных микроспор. Дигаплоидные растения гомозиготны по всем генам, поэтому их использование сокращает процесс селекции рапса по меньшей мере на 5 лет.

Созданные дигаплоидные линии ярового рапса различаются по всем качественным признакам. Биохимический состав семян ДГ линий зависит в основном от их генотипа. В результате оценки качества семян созданных линий отобрано 5 ценных для селекции рекомбинантов с повышенным количеством масла (43,11%) и суммой олеиновой и линолевой кислот и уменьшенным количеством глюкозинолатов (13,75 μmol/g).

Проведена оценка состава жирных кислот и установлена взаимосвязь биохимических признаков. Отобранные ценные рекомбинанты намечено использовать в селекции ярового рапса.

Ключевые слова: яровой рапс, дигаплоидные линии, культура изолированных микроспор, биохимический состав семян