

---

*Selekcija ir sėklininkystė*  
*Selection and Seed growing*  
*Селекция и семеноводство*

---

## Vasarinio rapso hibridų embriogeninio potencialo įvertinimas

---

**Natalija Burbulis,**  
**Algirdas Sliesaravičius**

*Lietuvos žemės ūkio universitetas,*  
*Studentų g. 11,*  
*LT-4324 Akademija,*  
*Kauno rajonas,*  
*el. paštas natalija@nora.lzua.lt*

Lietuvos žemės ūkio universiteto (LŽŪU) Genetikos-biotechnologijos laboratorijoje tirti vasarinio rapso (*Brassica napus* L.) F<sub>1</sub> hibridai Nr. 268, Nr. 269 ir Nr. 274, gauti sukryžminus veisles 'Star', 'Bolero' ir 'Cyclone'. Hibridų Nr. 268 ir Nr. 269 mikrosporos dulkinėje vystėsi sinchroniškai – vienoje dulkinėje tuo pačiu metu buvo tik dviejų gretimų vystymosi stadijų mikrosporos, todėl lengva atrinkti žiedpumpurius, kuriuose dauguma mikrosporų būna vėlyvos vienbranduolinės išsivystymo stadijos. Mikrosporų kultūrai tinkamiausi yra 3,8 mm (hibridas Nr. 268) ir 3,6 mm (hibridas Nr. 269) ilgio žiedpumpuriai. Priešingai, hibridas Nr. 274 pasižymėjo mikrosporų vystymosi asinchroniškumu – vienoje dulkinėje tuo pačiu metu buvo trijų, o kartais net ir keturių vystymosi stadijų mikrosporos. Tai apsunkino žiedpumpurių, turinčių potencialiai embriogenines mikrosporas, atranką, todėl hibrido Nr. 274 embriogenezės procesas sustojo, embrionams pasiekus rutulišką išsivystymo stadiją. Didžiausiu embriogeniniu potencialu pasižymėjo hibridas Nr. 268, kurio embrionų susiformavimo dažnumas buvo 2,7 karto didesnis negu hibrido Nr. 269 ir net 5,3 karto didesnis negu hibrido Nr. 274. Be to, šio hibrido embrionai vystėsi greičiau, palyginus su kitų hibridinių augalų embrionais.

**Raktažodžiai:** vasarinio rapso hibridai, mikrosporų išsivystymo stadija, embriogenezė

---

### IVADAS

Po to, kai Lichter [13] pirmasis indukavo rapsų embriogenezę izoliuotų mikrosporų kultūroje, šis metodas vis plačiau taikomas kuriant rapsų dihaploidus. Daugelį metų Lichter pasiūlyta technologija buvo tobulinama, siekiant padidinti androgeninių embrionų susiformavimo dažnumą. Mokslininkai nustatė, kad pradiniam etape yra svarbi genotipo atranka ir donorinio augalo auginimo sąlygos [1, 2, 17]. Vienas svarbiausių veiksnių, indukuojančių embriogenezę *in vitro*, yra tinkamai parinkta mikrosporų išsivystymo stadija. Literatūroje nurodoma, kad daugumos auga-

lų, izoliuotų dulkinų kultūroje, geriausi rezultatai gaunami izoliuojant dulkinės, kai dauguma mikrosporų būna vienbranduolinės išsivystymo stadijos. Taisant dulkinų kultūrą *Brassicaceae* genties augalams, tinkamų mikrosporų išsivystymo stadijų spektras yra gana platus, pavyzdžiui, vienbranduolinė išsivystymo stadija kaip tinkamiausia nurodoma *Brassica alba* [12] ir *Brassica napus* ssp. *oleifera* [4]; vienbranduolinė ir ankstyva dvibranduolinė stadijos – *Brassica campestris* [9]; kalius formuojasi iš dvibranduolių žiedadulkių *Brassica oleracea* [8] ir *Brassica napus* [16]. Rapso (*Brassica napus* L.) izoliuotų mikrosporų kultūrai tinkamiausios vėlyvos vienbranduolinės stadijos mik-

rosporos prieš pirmą mitozę, kai jau baigiasi DNR sintezė [11]. Rapsų mikrosporos potencialiai embriogeninės būna labai trumpą laikotarpį. Pechan ir Keller [14] mano, kad tai trunka ne ilgiau kaip 8 val. Dvibranduolinės mikrosporos paprastai būna neembriogeninės, nors kartais embriogenezė ir vyksta, bet šiuo atveju embrionų formavimasis vyksta vien vegetatyvinis branduolys [5]. Didesnė embrionų išėiga būna, kai donoriniam augalui būdingas mikrosporų vystymosi sinchroniškumas – tuo pačiu metu dulkinėje būna tik dviejų gretimų išsivystymo stadijų mikrosporos [6].

Darbo tikslas – ištirti vasarinio rapsų hibridų mikrosporų vystymosi sinchroniškumą ir įvertinti šių hibridų embriogeninį potencialą izoliuotų mikrosporų kultūroje.

### TYRIMŲ SĄLYGOS IR METODIKA

Tyrimai atlikti LŽŪU Genetikos-biotechnologijos laboratorijoje. Donoriniai augalai izoliuotų mikrosporų kultūrai buvo vasarinio rapsų (*Brassica napus* L.) F<sub>1</sub> hibridai Nr. 268 (gautas sukryžminus veisles 'Star' ir 'Bolero'), Nr. 269 (gautas sukryžminus veisles 'Bolero' ir 'Star'), Nr. 274 (gautas sukryžminus veisles 'Star' ir 'Cyclone'). Donorinių augalų sėkla gauta iš vasarinio rapsų selekcininkės doc. dr. L. Žilėnaitės. Pagal biometrinius ir sėklų kokybės rodiklius selekcininkė išskyrė šiuos hibridus kaip perspektyviausius. Donoriniai augalai buvo auginami šiltnamyje su papildomu apšvietimu. Citologinei analizei iš kiekvieno donorinio augalo imta po 20 skirtingo dydžio žiedpumpurių, kurie buvo laikomi 24 valandas fiksiatoriuje [etilo alkoholis: ledinė acto rūgštis (3:1)]. Išmatavus žiedpumpurių ilgį, išimtos dulkinės dažytos acetokarmino dažais ir sutrintos 45% acto rūgšties laše. Tiriant mikrosporų vystymosi sinchroniškumą dulkių preparatuose, kiekvienoje dulkinėje identifikuota 100 mikrosporų branduolių išsivystymo stadija. Rapsų žiedpumpuriai sterilinti 2 min. 70% etilo alkoholyje, po to 3 kartus perplauti distiliuotu steriliu vandeniu. Sterilūs žiedpumpuriai susmulkinami 13% sacharozės tirpale ir filtruoti per dvigubą Nytex filtrą. Mikrosporos nusodintos 3 kartus po 5 minutes centrifuguojant 1000 aps./min. greičiu. Izoliuotų mikrosporų suspensijai paruošti naudojama modifikuota NLN maitinamoji terpė [7]. Suspensija išpilstyta į sterilias Petri lėkšteles ir laikyta tamsoje 30°C temperatūroje. Po 14 dienų kultūra perkelta ant kratytuvo (60 judesiu/min.). Izoliuotų mikrosporų dalijimasis ir embrionų formavimasis stebimas mikroskopu MBI-6 (10 × 9 × 0,2). Embrionų išsivystymo stadija (rutuliška, širdiška, torpediška) buvo nustatoma pagal literatūroje pateikiamą metodiką [7]. Praėjus 28 dienoms po mikrosporų izoliavimo, pasiekę morfologinę brandą androgeniniai embrionai perkelti ant

agarizuotos B5 terpės ir laikyti augimo kameroje (4°C, fotoperiodas 8 val.). Po 10 dienų auginimo režimas pakeistas į šiltą inkubavimą (27 ± 2°C, fotoperiodas 12 val.). Praėjus dar 30 dienų, atliktas susiformavusių regenerantų įvertinimas. Tyrimų duomenys apdoroti statistiniais metodais, naudojant kompiuterinių programų paketą "Selekcija" [15].

### TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APITARIMAS

Kuriant rapsų haploidus izoliuotų mikrosporų kultūros pagrindu, labai svarbu nustatyti morfometrinius žymenis, atitinkančius mikrosporų išsivystymo stadijas. Patogiausia naudoti lengvai nustatomus žymenis, tokius kaip žiedpumpurio ilgis, dulkinės ilgis, vainiklapio ir dulkinės ilgių santykis. Kiti parametrai (mikrosporų arba jų branduolio dydis, DNR kiekis mikrosporoje) tiksliau nusako mikrosporų išsivystymo stadiją, bet dėl sudėtingos analizės praktikoje beveik nenaudojami. Rapsų žiedpumpurių ilgis – patogus ir pakankamai patikimas žymuo tinkamai mikrosporų stadijai apibūdinti, todėl tyrimuose šis parametras ir buvo pasirinktas.

Atlikus donorinių augalų citologinę analizę nustatyta, kad mikrosporų vystymasis yra savitas kiekvienam genotipui (1 lentelė).

Hibridų Nr. 268 ir Nr. 269 mikrosporos dulkinėje vystėsi sinchroniškai – vienoje dulkinėje tuo pačiu metu buvo tik dviejų gretimų vystymosi stadijų mikrosporos, todėl lengva atrinkti žiedpumpurius, kuriuose dauguma mikrosporų būna vėlyvos vienbranduolinės išsivystymo stadijos. Mikrosporų kultūrai tinkamiausi yra 3,8 mm (hibridas Nr. 268) ir 3,6 mm (hibridas Nr. 269) ilgio žiedpumpuriai. Priešingai, hibridas Nr. 274 pasižymėjo mikrosporų vystymosi asinchroniškumu – vienoje dulkinėje tuo pačiu metu buvo trijų, o kartais net ir keturių vystymosi stadijų mikrosporos. Tai apsunkino žiedpumpurių, turinčių potencialiai embriogenines mikrosporas, atranką, todėl mikrosporoms izoliuoti buvo imami 3,6–4,0 mm ilgio žiedpumpuriai.

Literatūros duomenimis [3], pirmas ląstelių dalijimasis *in vitro* įvyksta praėjus 2–3 dienoms po mikrosporų izoliavimo. Stebint mūsų tiriamų genotipų izoliuotų mikrosporų embriogenezę nustatyta, kad iki penktos dienos visuose hibriduose procesas vyko analogiškai: embriogeninės mikrosporos dalijosi ir pradėjo formuotis rutuliški embrionai. Hibrido Nr. 274 embriogenezės procesas šiame etape sustojo. Taip galėjo įvykti dėl šiam hibridui būdingo mikrosporų vystymosi asinchroniškumo. Atliekant mikrosporų izoliavimą, kartu su potencialiai embriogeninėmis mikrosporomis į kultūrą pateko daug vėlesnių išsivystymo stadijų mikrosporų, kurios išskirdavo inhibitorius, slopinančius embriogenezės procesą [10].

1 lentelė. Vasarinio rapso hibridų mikrosporų ir žiedadulkių išsivystymo stadijos identifikavimas pagal žiedpumpurio ilgį

Hibrido Nr.	Žiedpumpurio ilgis mm	Mikrosporų / žiedadulkių išsivystymo stadija* %				
		AV	VV	VLV	DB	TB
268	3,0	92,24 ± 0,37	8,15 ± 0,36			
	3,2	65,33 ± 0,52	35,34 ± 0,82			
	3,4		42,17 ± 0,75	57,83 ± 0,75		
	3,6		20,33 ± 0,82	80,00 ± 0,89		
	3,8			96,17 ± 0,75	4,00 ± 0,63	
	4,0			62,14 ± 0,90	38,29 ± 0,76	
	4,2				73,86 ± 0,90	26,14 ± 0,69
269	3,0	93,71 ± 0,76	6,14 ± 0,68			
	3,2	74,14 ± 0,69	25,80 ± 0,84			
	3,4		37,20 ± 0,82	62,80 ± 0,84		
	3,6			91,00 ± 0,71	9,00 ± 0,71	
	3,8			57,85 ± 0,38	42,16 ± 0,72	
	4,0				79,86 ± 0,64	21,14 ± 0,42
	4,2				47,78 ± 0,89	52,21 ± 0,65
274	2,8	12,16 ± 0,54	83,72 ± 0,68	4,12 ± 0,17		
	3,0	7,23 ± 0,62	74,59 ± 0,75	18,21 ± 0,69		
	3,2	3,06 ± 0,39	77,24 ± 0,90	19,79 ± 0,75		
	3,4		60,43 ± 0,89	25,16 ± 0,52	14,77 ± 0,75	
	3,6		34,18 ± 0,57	49,83 ± 0,76	16,09 ± 0,69	
	3,8		18,35 ± 0,82	54,76 ± 0,72	27,16 ± 0,72	
	4,0		6,04 ± 0,37	59,83 ± 0,84	22,26 ± 0,71	11,93 ± 0,82
	4,2			16,31 ± 0,58	51,79 ± 0,67	32,14 ± 0,76

\*AV – ankstyva vienbranduolė,  
 VV – vidutinė vienbranduolė,  
 VLV – vėlyva vienbranduolė,  
 DB – dvibranduolė,  
 TB – tribranduolė.

Hibridų Nr. 268 ir Nr. 269 embrionai vystėsi toliau ir po 11–12 dienų kai kurie iš jų buvo širdinės vystymosi stadijos, o praėjus 14 dienų po mikrosporų izoliavimo, jau be optinių prietaisų buvo galima pastebėti torpedos stadijos embrionus. Besiformuojantys embrionai vystėsi asinchroniškai, ir po 14 auginimo dienų jie buvo skirtingų išsivystymo stadijų (2 lentelė).

Iš mūsų tirtų genotipų didžiausiu embriogeniniu potencialu pasižymėjo hibridas Nr. 268, kurio embrionų susiformavimo dažnumas buvo 2,7 karto didesnis negu hibrido Nr. 269 ir net 5,3 karto dides-

nis negu hibrido Nr. 274. Be to, šio hibrido embrionai vystėsi greičiau, palyginus su kitų hibridinių augalų embrionais. Tai yra labai svarbus rodiklis, nes iš embrionų, pasiekusių per 14 dienų tik rutulišką stadiją, beveik niekada nesusiformuoja embrionai, tinkantys augalų regeneracijai. Vėlesnių išsivystymo stadijų embrionai išskiria etilena, kuris blokuodamas skatinantį augsino poveikį lėtina ląstelių tįsimą ir mitozinį aktyvumą.

Tyrimų duomenys rodo, kad embriogenezės procesą lemia ne vien mikrosporų vystymosi sinchroniškumas, bet ir genotipo pasirošimas pakeisti raidos

pobūdį iš būdingo gametofito kartai į būdingą sporofito kartai. Nors hibridų Nr. 268 ir Nr. 269 kūrimui buvo kryžmintos tos pačios tėvinės formos ('Star' × Bolero' bei 'Bolero' × Star'), šie donoriškai augalai skirtingai reaguavo į mikrosporų izoliavimą. Tai dar kartą patvirtina, kad embriogenezės procesas izoliuotų mikrosporų kultūroje

2 lentelė. Embrionų vystymosi stadijos (14 d. po mikrosporų izoliavimo)

Hibrido Nr.	Susiformavo embrionų vnt.	Embrionai					
		rutuliški		širdiški		torpediški	
		vnt.	%*	vnt.	%*	vnt.	%*
268	341	100	29,33 c	139	40,76 b	102	29,91 a
269	126	55	43,65 b	43	34,13 a	28	22,22 b
274	64	64	100 a	0	0	0	0

\*Duomenys grupuoti pagal Duncan kriterijų  $P \leq 0,01$ .

labiausiai priklauso nuo konkretaus augalo genotipo.

Augalų regeneracijos procesas prasideda perkėlus morfologinės brandos embrionus ant regeneracijos terpės. Morfologinės brandos embrionas būna apie 5 mm ilgio, turi gerai išvystytus šaknų ir stiebų pradmenis ir dvi padidėjusias sėklaskiltes.

Morfologiškai subrendusių embrionų formavimo dažnumas kinta nuo 0 iki 31,67%, priklausomai nuo genotipo (3 lentelė).

3 lentelė. Morfologinės brandos embrionai			
Hibrido Nr.	Suformuota embrionų vnt.	Morfologiškai subrendę embrionai	
		vnt.	%
268	341	108	31,67
269	126	27	21,43
274	64	0	
		$R_{0,01}$ 8,17	

Daugiausia (31,67%) morfologinės brandos embrionų išsivystė iš hibrido Nr. 268 mikrosporų. Kadangi hibrido Nr. 274 embrionų vystymasis sustojo esant dar globulos fazei, todėl jie nepasiekė morfologinės brandos. Tarp donorinių augalų Nr. 268 ir Nr. 269, pagal morfologiškai subrendusių embrionų išeią, yra esminių skirtumų. Tai patvirtina teiginį, kad nors besiformuojančių embrionų kokybei įtakos turi daugelis veiksnių (inkubacijos temperatūra ir kitos auginimo sąlygos), svarbiausias vaidmuo vis dėlto tenka genetiniams veiksniams.

## IŠVADOS

Embriogenezės indukcija priklauso nuo donorinio augalo mikrosporų vystymosi sinchroniškumo. Hibridams Nr. 268 ir Nr. 269 būdingas mikrosporų vystymosi sinchroniškumas, todėl jie tinka haploidams kurti izoliuotų mikrosporų kultūros metodu. Vasarinio rapso embriogenezės indukcijai izoliuotų mikrosporų kultūroje tinkamiausi 3,8 mm (hibridas Nr. 268) ir 3,6 mm (hibridas Nr. 269) ilgio žiedpumpuriai.

Embriogenezės procesas izoliuotų mikrosporų kultūroje priklauso nuo donorinio augalo embriogeninio potencialo. Iš mūsų tirtų genotipų didžiausiu embriogeniniu potencialu pasižymėjo hibridas Nr. 268.

Gauta  
2002 05 02

## Literatūra

1. Chuong P. V., and Beversdorf W. D. High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in

*Brassica napus* L. and *B. carinata* Braun // Plant Science. 1985. Vol. 39. P. 219–226.

2. Chuong P. V., Deslauriers C., Kott L. S., and Beversdorf W. D. Effects of donor genotype and bud sampling in microspore culture of *Brassica napus* // Canadian Journal of Botany. 1988. Vol. 66. P. 1653–1657.

3. Coventry J., Kott L., and Beversdorf W. D. Manual for microspore culture technique for *Brassica napus*. OAC Publication. Guelph, Ontario, Canada: University of Guelph, 1988. 56 p.

4. Dunwell J. M., Thurling N. Role of sucrose in microspore embryo production in *Brassica napus* ssp. *oleifera* // Journal Experimental Botany. 1985. Vol. 36. P. 1478–1491.

5. Fan Z., Armstrong K. C., and Keller W. A. Development of microspores *in vivo* and *in vitro* in *Brassica napus* // Protoplasma. 1988. Vol. 147. P. 191–199.

6. 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.

7. Gland A., Lichter R., and Schweiger H-G. Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore culture of *Brassica napus* L. // Journal of Plant Physiology. 1988. Vol. 132. P. 613–617.

8. Kameya T., and Hinata K. Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica* // Japanese Journal of Breeding. 1970. Vol. 20. P. 82–87.

9. Keller W. A., Rajhathy T., and Lacapra J. *In vitro* production of plants from pollen in *Brassica campestris* // Canadian Journal of Genetics and Cytology. 1975. Vol. 17. P. 655–666.

10. Kott L. S., Polsoni L., Ellis B., and Beversdorf W. D. Autotoxicity in isolated microspore cultures of *Brassica napus* // Canadian Journal of Botany. 1988. Vol. 66. P. 1665–1670.

11. Kott L. S., Polsoni L., and Beversdorf W. D. Cytological aspects of isolated microspore culture of *Brassica napus* // Canadian Journal of Botany. 1988. Vol. 66. P. 1658–1664.

12. Leelavathi S., Reddy V. S., and Sen S. K. Somatic cell genetic studies in *Brassica* species. I. High frequency production of haploid plants in *Brassica alba* L. // Plant Cell Reports. 1984. Vol. 3. P. 102–105.

13. Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* // Zeitschrift Pflanzenphysiologie. 1982. Vol. 105. P. 427–434.

14. Pechan P. M., and Keller W. A. Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus* // Physiology Plantarum. 1988. Vol. 74. P. 377–384.

15. Tarakanovas P. Statistinių duomenų apdorojimo programų paketas „Selekcija“. Akademija. 1999. 57 p.

16. Thomas E., and Wenzel G. Embryogenesis from microspores of *Brassica napus* // Zeitschrift Pflanzenphysiologie. 1975. Vol. 74. P. 77–81.

17. Thurling N., Chay Patricia M. The influence of donor plant genotype and environment on production of multicellular microspores in cultured anthers of *Brassica napus* ssp. *oleifera* // Annual Botany. 1984. Vol. 54. P. 681–693.

Natalija Burbulis, Algirdas Sliesaravičius

#### EVALUATION OF EMBRIOGENIC POTENTIAL OF SPRING RAPE HYBRIDS

##### Summary

Hybrids No. 268, No. 269 and No. 274 obtained from crosses between plants of spring rape cultivars 'Bolero', 'Star' and 'Cyclone' have been investigated at the Genetic-Biotechnology Laboratory of the Lithuanian University of Agriculture. Microspores of hybrids No. 268 and No. 269 within a single anther at any size were very well synchronised in the cell cycle, falling into only two developmental stages at any time. Therefore it is easy to select buds with spores in late uninucleate stage. For hybrid No. 268 this stage corresponded to bud length of 3.8 mm, for hybrid No. 269 to 3.6 mm. Microspore development in hybrid No. 274 was more asynchronous. This meant that within a single anther of No. 274 it was common to find spores in the miduninucleate stage and others in the trinucleate stage, as well as all intermediate types. This may explain why hybrid No. 274 produced low frequencies of embryos, which were all in globular stage. The highest embryogenic potential was obtained from hybrid No. 268. Embryo production frequency in this hybrid was 2.7-fold higher than in No. 269 and 5.3-fold higher than in No. 274. Moreover, embryos of hybrid No. 268 developed more rapidly in comparison with embryos of the another hybrids.

**Key words:** hybrids of spring rape, microspore development stage, embryogenesis

Наталия Бурбулис, Альгирдас Слесаравичюс

#### ОЦЕНКА ЭМБРИОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ГИБРИДОВ ЯРОВОГО РАПСА

##### Резюме

В Лаборатории генетики-биотехнологии Литовского сельскохозяйственного университета изучались гибриды ярового рапса (*Brassica napus* L.) № 268, № 269 и № 274, полученные при скрещивании сортов 'Star', 'Bolero' и 'Cyclone'. Микроспоры гибридов № 268 и № 269 развиваются синхронно – в пыльнике были микроспоры только двух стадий развития. Это существенно облегчает отбор бутонов, содержащих микроспоры поздней одноядерной стадии развития. Культуре изолированных микроспор наиболее подходят бутоны длиной 3,8 мм (гибрид № 268) и 3,6 мм (гибрид № 269). Гибриду № 274 свойственна асинхронность развития микроспор – в пыльнике присутствуют микроспоры трех, а иногда даже и четырех различных стадий развития. Это значительно затрудняет отбор бутонов, содержащих потенциально эмбриогенные микроспоры, поэтому процесс эмбриогенеза гибрида № 274 остановился на стадии формирования глобулярных зародышей. Наибольшим эмбриогенным потенциалом обладает гибрид № 268, который по количеству сформировавшихся эмбрионов в 2,7 раза превосходит гибрид № 269 и в 5,3 раза – гибрид № 274. Кроме того, эмбрионы этого гибрида развиваются скорее по сравнению с эмбрионами других гибридов.

**Ключевые слова:** гибриды ярового рапса, стадия развития микроспор, эмбриогенез