

BIOTEHNOLOĢIJAS METOŽU IZMANTOŠANAS REZULTĀTĀ IEGŪTO SARKANĀ ĀBOLIŅA AUGU NOVĒRTĒJUMS LAUKA APSTĀKĻOS

THE EVALUATION OF RED CLOVER PLANTS OBTAINED IN FIELD CONDITIONS BY USING BIOTEHNOLOGICAL METHODS

Aija Rebāne, Sarmīte Rancāne, Aldis Jansons

LLU Zemkopības zinātniskais institūts

aigarebane@inbox.lv

Abstract. *The Trifolium genus is very wide and has more than 300 different species, but the most widely cultivated and economically valuable species in Latvia is the red clover (Trifolium pratense L.). Diploid (2n) red clover with 14 chromosomes have so far been widely used in meadows and pastures. However, the importance of tetraploid varieties (4n = 28 chromosomes), which is characterized by greater height, broader leaves, higher yields of green and dry matter, has been growing in recent years. All the legumes have excellent ability to bind atmospheric nitrogen and fix it in the root gum. So this valuable plant nutrient comes to the farmer for free and enriches the soil without harming the environment. Red clover is an important fodder, treatment and nectar plant, as well as an effective soil enhancer. In Latvia red clover is one of the most common summer and winter feed crops. With the rapid development of agricultural technologies, there is also a growing demand for new, high-yielding, pest and disease-resistant varieties. Also, climatic conditions are changing, so the selection process is continuous and breeders have the task of creating ever-better, persistent, and more resistant varieties that can compete internationally and meet consumer demand. Successful selection requires a genetically and morphologically diverse breeding material with stable, heritable, improved economically significant properties. Breeders of the LLU Research Institute in Skrīveri, in collaboration with specialists of the Environmental Genetics Laboratory of the Institute of Biology of the University of Latvia (LUBI), use new modern technologies to accelerate the selection process and increase genetic diversity, including in vitro culture of cells and tissues, etc. biotechnology methods. Tetraploid red clover plants obtained by modern biotechnology methods are repeatedly evaluated in field condition for several generations. The selected plants are subjected to laboratory for further accounting and analysis, according to certain criteria, in order to develop a new medium-late tetraploid red clover variety. The article summarizes data on prospective genotypes received from the LU BI laboratory in 2017 and their agronomic evaluation in the field conditions.*

Key words: *biotechnology methods, red clover, breeding, varieties.*

Ievads

Trifolium ģints ir ļoti plaša, zināmas vairāk nekā 300 dažādas sugas, taču Eiropā un daļā Āzijas aug ap 50 dažādu āboliņa sugu, no kurām kultivē tikai 5. Tām veic arī selekciju, un ir radītas vairākas šķirnes. Latvijā plašāk tiek audzētas trīs āboliņa sugas: sarkanais āboliņš – *Trifolium pratense* L., bastarda āboliņš – *Trifolium hybridum* L. un baltais āboliņš – *Trifolium repens* L. (Jansone *et al.*, 2008). Sarkanais āboliņš kā kultivējams tauriņziedis Latvijā ir visizplatītākais sētajos zālajos. Tas ir vērtīgs skrajceru lopbarības augs, kam ir plašas audzēšanas iespējas. Sarkanais āboliņš ir nozīmīgs lopbarības, enerģētiskais, ārstniecības un nektāraugs, kā arī efektīvs augsnes uzlabotājs. Latvijā sarkanais āboliņš ir viens no izplatītākajiem vasaras-ziemas lopbarības kultūraugiem. Strauji attīstoties lauksaimniecības tehnoloģijām, pieaug pieprasījums arī pēc jaunām augstākām, pret kaitēkļiem un slimībām izturīgām šķirnēm (Marrum, 1997), t.sk. tetraploīdajām.

Pēc bioloģiskajām īpašībām un saimnieciskās izmantošanas sarkanais āboliņš tiek iedalīts divos tipos: agrais sarkanais āboliņš (*Trifolium pratense* var. *Pracocox*) un vēlais sarkanais āboliņš (*Trifolium pratense* var. *Serotinum*). Pa vidu šiem abiem tipiem ir vidēji agrās formas. Jāzina, ka katrs no šiem āboliņiem atšķiras gan pēc morfoloģiskām pazīmēm, gan bioloģiskām īpašībām, gan arī pēc saimnieciskās izmantošanas veida. Vizuāli uz lauka pēc lapu lieluma, to krāsas un formas

vīsus šos āboliņu tipus atšķirt nav iespējams, arī ziedkopas un ziedi tiem ir ļoti līdzīgi, taču pēc stublāju garuma, posmu skaita un stublāju skaita cerā tie jau ir labi atšķirami.

Sarkanā āboliņa selekcijas mērķis ir piedāvāt patērētājam šķirnes ar augstu adaptācijas potenciālu, kas ir spējīgas nodrošināt labu ražu dažādos augsnes tipos, kas ātri veido lielu fotosintētisko virsmu, ir konkurētspējīgas cīņā ar nezālēm, var veidot lielu un stabilu biomasas un sēklu ražu, ir ziemcietīgas, ilggadīgas, izturīgas pret slimībām un kaitēkļiem. Tetraploīda sarkanā āboliņa iegūšana ar tradicionālajām selekcijas metodēm ir ļoti sarežģīta, jo tetraploīdi āboliņi veidojas reti un to izlase ir ļoti apgrūtinoša. Fenotipiski tos agrīnās augšanas stadijās nav viegli atšķirt no diploīdajām formām. Arī laiks, kādā var izveidot šķirni, ir ļoti ilgstošs, tādēļ nepieciešams atrast ātru un efektīvu metodi tetraploīdā sarkanā āboliņa ieguvei. Sarkanā āboliņa selekcijas programmās liela uzmanība tiek pievērsta tetraploīdu šķirņu veidošanai. Tetraploīdajam sarkanajam āboliņam raksturīga labāka ekoloģiskā pielāgošanās spēja, lielāka biomasa un izturība pret slimībām, salīdzinot ar diploīdiem augiem. Sadarbojoties ar Latvijas Universitātes Bioloģijas institūta (LUBI) Vides ģenētikas laboratoriju, Skrīveru selekcionāri selekcijas procesa paātrināšanai izmanto jaunas, modernas tehnoloģijas, t.sk. šūnu un audu *in vitro* kultūras, kā arī citas biotehnoloģijas metodes.

Materiāli un metodes

Tetraploīdu ieguvei tika izmantotas vidējā agrīnuma tipa sarkanā āboliņa šķirņu 'Dižstende', 'Stendes agrais' un 'Jancis' sēklas.

LUBI Vides ģenētikas laboratorijā sarkanā āboliņa sēklas tika sterilizētas pēc agrāk izstrādātas metodes (Grauda u. c., 2004; Kokina u. c., 2005; Lapiņa u. c., 2009). Pēc sterilizācijas sēklas tika stādītas uz MS (Murashige, Scoog, 1962) barotnes. Pēc 4 dienām 1–1.5 cm garie dīgsti ar divām dīgļlapām tika apstrādāti ar kolhicīna šķīdumu ūdenī. Pēc tam dīgstus uzstādīja uz L2 barotnes (Phillips, 1996), iespraužot saknīti un cerošanas mezglu barotnē. Pēc 1 mēneša augiem ar labi izveidotu sakņu sistēmu un 3–4 lapām tika noteikta ploīditāte. Tās noteikšanai izmantoja BD "FACSJazz" šūnu šķirotāju ar plūsmas citometra funkciju. Par kontroli izmantoja diploīdo (2n) āboliņu. Ploīditāti noteica visiem augiem, kurus ieguva R1 paaudzē. Augus ar izmainītu ploīditāti izstādīja 100 ml podiņos ar augsnes substrātu un audzēja 1 mēnesi siltumnīcā daļēji kontrolētos apstākļos. Pēc mēneša, kad augi bija labi iesaņņojušies augsnē, tos izstādīja LLU ZZI selekcijas augsekas laukos, ierīkojot izlases audzētavu.

Tauriņziežu selekciju, t.sk. sarkanā āboliņa tetraploīdo augu vērtēšanu, veica LLU Zemkopības zinātniskā institūta zālaugu selekcijas augsekas laukos Skrīveros, kur pārsvarā ir velēnu vidēji podzolētas, vidēji iekultivētas smilšmāla un mālsmilts augsnes ar vāji skābu augsnes reakciju (pH KCl 5.4–6.4) un zemu līdz vidēju fosfora (P_2O_5 66–132 mg kg⁻¹) un kālija (K_2O 55–92 mg kg⁻¹) nodrošinājumu. Organiskās vielas saturs augsnē dažādās izmēģinājumu vietās ir atšķirīgs, tas ir robežās no 17 līdz 28 g kg⁻¹.

Ziemas periodā 2017. gadā tika veikta ievāktu elites augu analīze. Izvērtējam iepriekšējo gadu datus un mērķtiecīgi veicām atlasīti pēc noteiktiem kritērijiem. Sarkanā āboliņa sēkliņas 2017. gada pavasarī dīdēja „Petri” trauciņos (katrā 100 sēklas). Kad sēklas bija sadīgušas, tās izpīķēja augsnes substrātā kastītēs (24., 27. un 28. martā). Kad augi kastītēs bija sasnieguši attiecīgu attīstības stadiju, 2017. gada 9. jūnijā tos izstādīja lauka apstākļos – sarkanā āboliņa augu izlases audzētavā. Izmēģinājumā tika iestādīti 17 tetraploīdā sarkanā āboliņa dēsti. No 13 paraugiem tika iestādīti dēsti no katra parauga pa trīs rindām, rindā – 24 augi. No trīs paraugiem tika iestādīti dēsti pa divām rindām no katra. Šajā pašā audzētavā tika iestādīti arī 44 LUBI Vides ģenētikas laboratorijas augi. Āboliņi tika vērtēti pēc sarkanā āboliņa deskriptoriem (IBPGR deskriptori (1985)).

Pirms izstādīšanas uz lauka augi tika novērtēti un aprakstīti, tiem vērtēja attīstības fāzi, auga garumu, lapu formu, krāsu, matiņus un zīmējumu uz lapām. Kopumā augi bija spēcīgi un veidoja lapu rozeti. Augu veģetācijas periodā tos vērtēja pēc sarkanā āboliņa kritērijiem: agrīnuma, posmu skaita, lapu krāsas un zīmējuma, ziedu krāsas, augu garuma, stiebru skaita augam, 1000 sēklu masas. Augu veģetācijas periodā 2018. gadā tika turpināta augu vērtēšana, atlase un brāķēšana. Vasarā bija redzams, ka augiem nepietika mitrums, tika kavēta augu augšana un attīstība. Jūnija beigās un jūlija sākumā augi, kuri neatbilda tetraploīdā sarkanā āboliņa auga pazīmēm un bija neveselīgi, tika brāķēti. Paraugi, kas atbilda tetraploīdā sarkanā āboliņa augu pazīmēm, tika atsieti

pie bambusa koka mietiņiem. 31. jūlijā un 8. augustā paraugi, kas atbilda tetraploīdā sarkanā āboliņa augu pazīmēm un nogatavināja sēklas, tika nogriezti, sasieti kūļos un nolikti žāvēties šķūnī. Vēlāk tos analizēja pēc noteiktām pazīmēm, t.sk. augu garuma, posmu skaita, stiebru skaita augam, galviņu skaita augam, sēklu skaita galviņā (10 galviņām), sēklu svara no 1 auga, sēklu krāsas, 1000 sēklu masas.

Rezultāti

Mēnesi pēc kolhicionēšanās augiem tika noteikta ploīditāte. Tika konstatēts, ka 6% augu nebija ploīditātes izmaiņu, 10% bija triploīdi, 84% augu bija miksoploīdi. Pēc ploīditātes noteikšanas turpmākai audzēšanai tika atlasīti tikai tie augi, kuru lapās konstatēja vairāk par 50% tetraploīdu šūnu.

No Salaspils LUBI Vides ģenētikas laboratorijas 2017. gada 26. jūnijā tika saņemti kopumā 44 augi. Viens no šiem augiem bija novājināts, bet citi LU Bioloģijas institūtā ar modernām biotehnoloģijas metodēm izveidotie mākslīgie tetraploīdi tika nodoti turpmākai vērtēšanai lauka apstākļos. Šiem augiem lapās tika konstatēts vairāk par 80% tetraploīdu šūnu. Stādīšanas gadā augiem vērtēja šādas pazīmes: attīstības fāzi, augu garumu, posmu skaitu, ziedu krāsu, slimību noturību, kā arī tika veikts auga kopējais novērtējums ballēs. Pirms ziemošanas 2017. gada rudenī visiem iestādītajiem augiem bija veselīga lapu rozete. Labi pārziemo āboliņš, kuram pirms ziemošanas rudenī ir izveidojusies spēcīga sakņu sistēma, stingrs stublājs un veselīga lapu rozete (Jansone *et al.*, 2008). Veģetācijas sezonā 2018. gadā turpinājās šo augu vērtēšana, brāķēšana un atlase. Vērtējot augus pēc ziemošanas 19. aprīlī, vairāk nekā 35 augi bija pārziemojuši. Lai gan pavasarī augšanas apstākļi sarkanajam āboliņam bija labvēlīgi, tikai 9 augi turpināja augt un attīstīties. Pavasarī 80% laboratorijā iegūto augu iznīka – acīmredzot ķīmiski apstrādātie augi ir neizturīgāki, tiem nav izveidojusies spēja adaptēties un piemēroties lauka apstākļiem. Tikai 2 augi nogatavināja sēklas, bet laboratorijā veiktās analīzes liecināja, ka tie neatbilst tipiska tetraploīdā sarkanā āboliņa pazīmēm.

Tetraploīdā sarkanā āboliņa izlases audzētavā 2017. gadā iestādīja ZZI izaudzētos 1080 sarkanā āboliņa paraugus, no kuriem 2018. gadā tika atlasīti 59 augi ar vēlamajām pazīmēm. Laboratorijā analizētajiem paraugiem noteica šādas pazīmes: augu garumu, posmu skaitu (5 stiebriem), stiebru skaitu augam, galviņu skaitu augam (pilnas, neattīstītas, ziedošas), sēklu skaitu galviņā (10 galviņas), sēklu svaru no 1 auga, sēklu krāsu un 1000 sēklu masu.

Vērtējot laboratorijā analizētos sarkanā āboliņa paraugus, tika konstatēts, ka fenotipiski un genotipiski tie ir atšķirīgi. Augu garums bija robežās no 65 līdz 105 cm. Optimālais vidēji vēlā sarkanā āboliņa garums būtu 70–90 cm, starp iegūtajiem augiem (no 59 paraugiem) tādi ir 21. Vidēji vēlā sarkanā āboliņa posmu skaits ir no 8 līdz 10, šādu rādītāju sasniegta 48 augi. Stiebru skaits no viena auga bija robežās no 18 līdz 65 stiebriem. Vērtīgs rādītājs ir stiebru skaits katram augam, lielai daļai paraugu tika konstatēts liels stiebru skaits. Svarīgi rādītāji ir kopējais sēklu svars no 1 auga un 1000 sēklu masa. Vairumam analizēto paraugu sēklu svars no viena auga bija lielāks par 5 gramiem. Tetraploīdajām šķirnēm 1000 sēklu masa parasti veido 2.7–3.1 g, lielāka par 2 gramiem tā bija 12 paraugiem. Nepietiekams nokrišņu daudzums vasaras sezonā kavēja sarkanā āboliņa augu augšanu un attīstību, ar to arī varētu izskaidrot zemo 1000 sēklu masu. Izanalizējot elites augu garumu, posmu skaitu, stiebru skaitu, sēklu svaru no viena auga un 1000 sēklu masu vienam augam, tika atlasīti 16 paraugi, kuri varētu atbilst tetraploīdā sarkanā āboliņa pazīmēm (1. tab.). Atlasītos paraugus iesēs atkārtoti, lai tiem noteiktu ploīditāti un pārlicinātos, vai tie atbilst tetraploīdā sarkanā āboliņa auga pazīmēm. Daļa no šiem augiem nākotnē varētu izrādīties arī miksoploīdi. Tāpat nākamajā paaudzē varētu rasties arī 3n augi, tomēr šobrīd šādiem āboliņa indivīdiem ar lielu 4n šūnu daudzumu ir laba prognoze tetraploīdo augu selekcijai. Auga lapas var saturēt arī 3n šūnas, tas varētu būt fizioloģiska efekta rezultāts, ko būtu interesanti noskaidrot, pārsējot vai analizējot vēl kādas auga daļas – saknes vai ziedputekšņus. Analizēto paraugu dati atspoguļo faktu, ka laboratorijā iegūtais izejmateriāls ir daudzveidīgs un atšķirīgs. Turpmākajā selekcijas procesā lauka apstākļos ir iespējams iegūt vērtīgu materiālu jaunas šķirnes radīšanai.

Sarkanā āboliņa elites augu analīzes
Analysis of red clover elite plants

Nr.	Genotips / Genotype	Auga Nr. / Plant Nr.	Augu garums, cm / Plant length	Posmu skaits / Internodes	Stiebru skaits augam / Number stripes for plant	Vidējais sēklu skaits galviņā / Average number of seeds in the head	Sēklu svars augam / Seed weight for plant	1000 sēklu svars, g / 1000 seed weight
1	3-18 (2016)	1	74	8	31	41.5	9.7	2.01
2		2	87	7	65	58.7	9.22	2.23
3		3	70	8	42	40.1	12.96	2.55
4		4	70	8	31	34.7	7.39	2.11
5		6	88	7	28	29.9	4.82	2.01
6	2-23 (2016)	1	79	8	52	48.8	12.55	1.94
7		2	70	7	23	40.9	8.55	1.96
8		3	65	8	40	49.4	9.93	2.01
9		5	75	8	44	34.7	8.92	2.09
10	67 (2016)	1	80	9	37	58	18.86	2.11
11	DU 1	2	73	8	40	44.2	13.43	1.93
12	1-11 (2015)	2	89	8	23	48.7	17.34	2.06
13		5	90	9	36	52.3	10.14	2.19
14		8	90	8	55	47.8	12.42	1.95
15	2-8 (2015)	4	75	8	65	38	20.94	1.96
16	2-9 (2015)	5	100	8	42	73.5	25.72	2.09

Secinājumi

Izmantojot biotehnoloģijas metodes, īsā laika periodā iespējams iegūt daudzveidīgu sarkanā āboliņa selekcijas izejmateriālu.

Ar jaunākajām kolhicionēšanas metodēm iegūtie augi atšķiras pēc fenotipiskām un genotipiskām īpašībām.

Izvērtējot laboratorijā analizētos sarkanā āboliņa paraugus, tika atlasīti 16 paraugi, kuriem atkārtoti jānosaka ploīditāte.

Pēc noteiktiem sarkanā āboliņa kritērijiem, veicot elites augu analīzi un atlasīti, selekcijas darbs jāturpina.

Izmantotā literatūra

1. *Ceļvedis daudzgadīgo zālaugu sēklaudzēšanā* (2008). Jansones B. red. Skrīveri, 265 lpp.
2. Grauda D., Jansone B., Kokina I. (2004). Pļavas (sarkanā) āboliņa (*Trifolium pratense* L.) selekcijas izejmateriāla iegūšana, izmantojot *in vitro* metodes. *Agronomijas Vēstis*, Nr. 6, 155.–158. lpp.
3. Kokina I., Grauda D., Jermaļonoka M., Rashal I. (2005). Some aspects of inducing callus culture and subsequent plant regeneration of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis*, Vol. 5, No. 2, p. 165–168.
4. Lapiņa L., Grauda D., Jansone B., Jansons A., Rashal I. (2009). Restoration of Latvian alfalfa (*Medicago sativa*) genetic resources perspective for breeding. *In: Proceedings of the 7th International Scientific and Practical Conference „Environment. Technology. Resources”*, Rēzekne, Latvia, June 25–27, Vol. 1, Rēzekne, 2009, p. 166–168.
5. Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco ocltures. *Physiol. Plant*, Vol. 15, p. 473–497.

6. Phillips G. (1996). Tissue Culture. *In: Red Clover Science*, Eds.: Taylor N. L., Quesenberry K.H., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 170–187.