

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 3, Number 309 (2015), 5 – 11

**DOUBLE HAPLOID PRODUCTION OF SPRING RAPESEED
WITH THE VALUE TRAITS****M. H. Shamekova, D. V. Volkov, A. K. Zatybekov, K. Zh. Zhambakin**

RSE "Institute of Plant Biology and Biotechnology" CS MES RK, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: spiritdem@gmail.com

Key words: rapeseed, hybrids, dihaploids.

Abstract. Doubled haploid were obtained from nine interspecific hybrid lines of rapeseed through isolated microspore culture method. We used varieties of spring rapeseed food trends of Belarusian and Russian breeding. Obtained doubled haploids were tested by quantitative and qualitative characteristics and selected valuable homozygous lines. Top line by weight of seeds per plant and by weight of 1000 seeds turned out hybrid combinations Viking x Antaeus, Gedemin x Chris, Granite x Chris. Doubled haploid line of rapeseed from hybrid combination Viking x Antaeus, having a high content of oleic acid (68,25%) and a low content of saturated fatty acids was obtained. On the content of linoleic acid is marked line combinations Gademin x Chris (24,11%), while the total content of saturated fatty acids in the line is one of the smallest among all the studied material. Most doubled haploids derived from rapeseed hybrid combinations had good fatty acid composition - low content of saturated fatty acids (palmitic and stearic) and a high percentage of unsaturated fatty acids (oleic, linoleic and linolenic acids).

Studies have demonstrated the possibility to get quick stable homozygous lines with high yield of rapeseed and high quality oilseeds. The resulting line of rapeseed will be tested in various ecological regions of Kazakhstan to create domestic varieties of spring rape.

Haploid biotechnology makes it possible not only to obtain homozygous lines of hybrid combinations, but use genetic diversity microspores to create valuable material for selection.

УДК 633 853 494; 575 113 2

**ПОЛУЧЕНИЕ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ ЯРОВОГО РАПСА
С ЦЕННЫМИ ПРИЗНАКАМИ****М. Х. Шамекова, Д. В. Волков, А. К. Затыбеков, К. Ж. Жамбакин**

РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: рапс, гибриды, дигаплоиды.

Аннотация. В результате применения культуры изолированных микроспор получены удвоенные гаплоиды рапса из девяти межсортовых гибридных комбинаций. В работе использовались сорта ярового рапса пищевого направления белорусской и российской селекции. Проведен анализ полученных удвоенных гаплоидов по количественным и качественным признакам, и из них выделены хозяйственно-ценные гомозиготные линии рапса пищевого направления. Наилучшие показатели по массе семян с одного растения и по массе 1000 семян, показали удвоенные гаплоиды комбинаций Викинг x Антей, Гедемин x Крис и Гранит x Крис. Получена дигаплоидная линия комбинации Викинг x Антей с высоким содержанием олеиновой кислоты (68,25%) и низким содержанием насыщенных жирных кислот. По содержанию линолевой кислоты отмечена линия комбинаций Гадемин x Крис (24,11%), при этом суммарное содержание насыщенных жирных кислот у линии одно из самых наименьших среди всего изучаемого материала. Большинство полученных дигаплоидных растений имели хорошие показатели жирнокислотного состава - низкое содержание насыщенных жирных кислот (пальмитиновой и стеариновой), и высокий процент содержания ненасыщенных

жирных кислот (олеиновой, линолевой и линоленовой). Проведенная работа доказала возможность за относительно короткий срок создания стабильных нерасщепляющихся линий рапса с признаками высокой урожайности и ценного качества семян. Полученные линии будут испытаны в различных экологических регионах Казахстана с целью создания отечественного сорта ярового рапса.

Гаплоидная биотехнология позволяет не только получить гомозиготные линии из гибридных комбинаций, но и использовать генетическое разнообразие микроспор, для создания селекционно-ценного материала сельскохозяйственных культур.

Мировой опыт свидетельствует о том, что возделывание рапса (*Brassica napus olifera* Metzg) является одним из наиболее коммерчески выгодных направлений в растениеводстве. Высокое содержание эруковой кислоты и глюкозинолатов вредных для здоровья человека и животных сдерживало расширение посевных площадей этой культуры. В 1974 году селекционером Б. Стефансоном в Канаде был выведен первый сорт рапса "Tower" в котором было достигнуто низкое содержание как эруковой кислоты, так и глюкозинолатов. Этот сорт первым получил торговое название «канола» (canola – Canadian oil low acid), которым начало пользоваться Правительство штата Манитоба [1] (Канада). В настоящее время семена рапса и сурепицы (*Brassica campestris*) называются канолой, если содержат менее 0,2 % эруковой кислоты и менее 15 микромолей глюкозинолатов [2].

Каноловое масло по пищевой ценности близко к оливковому маслу и пользуется широким спросом на мировом рынке. При этом его стоимость по сравнению с оливковым маслом гораздо ниже. Каноловое масло особо ценится своими уникальными целебными свойствами. Высокое содержание ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав масла, играют важную роль в укреплении стенок кровеносных сосудов, снижая уровень заболеваний инсультом и инфарктом миокарда, регулировании жирового обмена людей, уменьшает уровень холестерина, риск тромбообразования и ряда других заболеваний, в том числе онкологических.

Вместе с тем классическая селекция – это длительный процесс отбора и закрепления признаков. Поэтому постоянно растущий спрос на производство высококачественных масел требует ускорения темпов создания новых улучшенных и конкурентоспособных на мировом рынке сортов рапса. Современная селекция подразумевает использование прикладных методов, значительно ускоряющих получение растений с заданными хозяйственно-ценными признаками. Одними из таких методов является создание гаплоидных растений методами культуры *in vitro*.

Цель исследований: создание дигаплоидных линий рапса с низким содержанием эруковой кислоты и ценными хозяйственно-полезными признаками.

Рентабельность выращивания рапса зависит от того, насколько стабильным и достаточно высоким будет урожай. Кроме того, для соответствия стандартам, предъявляемым к пищевым маслам, кормам и биотопливам, качественные характеристики растительного материала должны быть стабильными и не изменяться значительно. Однако этого можно достичь только в том случае, если получать генетически выровненные, «чистые», гомозиготные линии и сорта масличных культур. В тоже время, генетическая изменчивость рапса обусловлена тем, что у этой культуры возможно до 30 % перекрестного опыления. Для ускоренного получения генетически стабильного, маркированного по хозяйственно ценным генам материала, ускорения сроков создания новых сортов рапса необходима разработка эффективных методов культуры *in vitro* с целью получения гаплоидных растений-регенерантов и удвоенных гаплоидов рапса и их широкое использование в селекционном процессе. Такая необходимость связана с тем, что методы андрогенеза, основными из которых являются культура пыльников и микроспор, позволяют получать исходный селекционный материал – удвоенные гаплоиды за одно поколение и исключают длительный процесс инбридинга, применяемый в классической селекции для закрепления признаков. Разработка и внедрение гаплоидной биотехнологии позволит сократить сроки создания новых сортов рапса в 2-3 раза, что позволит, в конечном счете, значительно увеличить производство высококачественной, коммерчески выгодной импортозамещающей продукции – рапсового масла. Следует также отметить, что гаплоиды значительно расширяют генетическое разнообразие исходного селекционного материала, во-первых, за счет рекомбинаций при мейотическом делении в процессе гаметогенеза, во-вторых, за счет мутаций, возникающих в процессе культивирования клеток *in vitro* [3]. Кроме того, проводимая селекция *in vitro* по формированию устойчивости растений к

различного рода факторам окружающей среды и получение трансгенных растений с использованием культуры пыльников или микроспор позволяют расширить спектр изменчивости и создавать растения с новыми полезными свойствами, получить которые обычным путем не удастся. В настоящее время с помощью культуры микроспор созданы новые сорта рапса в Канаде, Дании, Франции, Германии [4].

В Казахстане до 2003 г. селекционные исследования по рапсу не проводились, за исключением некоторых исследований по агротехнике и сортоиспытанию рапса на кормовые цели. Впервые в 1971 г. некоторые сорта рапса из Канады были испытаны в условиях Северного Казахстана. На сортоучастках Павлодарской и Целиноградской областей урожайность семян составила соответственно 13,4 и 19 ц/га при масличности 39,9 и 45,3%. На сегодняшний день в Казахстане селекцией рапса занимаются НПЦ земледелия и растениеводства и НПЦ зернового хозяйства им. А.И. Бараева.

Для Казахстана, как и во всем мире, создание высокоурожайных сортов рапса с типом 000 (безруковых, низкоглюкозинолатных и желтосемянных) для различных экологических условий является основным направлением селекции [5]. На сегодняшний день целью селекции рапса пищевого и кормового использования является получение сортов с содержанием не более 2% эруковой кислоты и не более 18 микромолей /г сухого вещества глюкозинолатов. Кроме того, необходимо оптимальное содержание и соотношение жирнокислотного состава масел. Наиболее ценными являются сорта с высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот, в особенности олеиновой кислоты, при этом процентное содержание насыщенных жирных кислот должно быть наименьшим.

Объекты и методы исследований

Объекты. Объектами исследований данной работы являются коллекционные образцы рапса пищевого направления российской селекции: Крис, Таврион из Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур им. В.С. Пустовойта. Белорусской селекции: Гедемин, Гермес, Викинг, Скиф, Неман, Антей, Яварь, Янтарь, Гранит, Смак получены из РУП «Научно-практического центра НАН Беларуси по земледелию» от автора сортов Я.Э Пиллук и гибридный сорт Н-401 (Иранского происхождения) из Института пищевой перерабатывающей промышленности МСХ РК.

Методы. Посев изучаемого материала проводился на экспериментальном участке института с соблюдением общепринятых для рапса агротехнических мероприятий. Проводились фенологические наблюдения в процессе роста и развития растений. Структурный анализ растений проводился по общепринятой методике [6].

Метод определения жирнокислотного состава. Подготовку образца для хроматографии проводили следующим образом: на прессе извлекали из семян 0,5 мл масла, навеска 5 г, 8 мкл масла переносили пипеткой в пробирку, приливали 2 мл гексана в пробирку, затем приливали 0,1 мл 5% метилата натрия, в течении получаса взбалтывали 3 раза, приливали 1 мл дистиллированной воды в пробирку, взбалтывали и оставляли до полного отстаивания. Затем 1 мл верхнего гексанового слоя переносили в пенициллиновый пузырек, ставили под вентилятор до полного испарения гексана при комнатной температуре. В пенициллиновый пузырек после просушки добавляли 600 мкл химически чистого гексана. Определение жирнокислотного состава рапса проводился методом газовой хроматографии [7].

Результаты и их обсуждения

В связи с тем, что у рапса возможно перекрестное опыление, необходимо проводить принудительное самоопыление растений сортов, для создания родительских форм. С этой целью нами был получен семенной материал чистолинейных сортов. В дальнейшем в результате их скрещивания, создано 9 гибридных комбинаций рапса. Структурный анализ сортов показывает, что исследуемые сорта рапса не различаются значительно по признакам продуктивности. При этом не наблюдается строгой зависимости от количества семян в стручке от длины стручка, а также массы

семян с растения от количества семян в стручке. С целью повышения эффективности получения гибридных растений была использована методика культуры незрелых зародышей, результате которой получено 105 гибридных растений *in vitro*. В дальнейшем на экспериментальном участке Института были выделены линии в гибридном питомнике по продуктивности семян с одного растения и массе 1000 семян. В результате самоопыления этих линий получено семенное потомство растений F₁. Данные гибриды были использованы для получения удвоенных гаплоидов [8]. Первые поколения гибридов наиболее ценный материал для получения дигаплоидов посредством культуры изолированных микроспор, поскольку в этих поколениях микроспоры генетически наиболее разнообразны. В связи с этим, вероятность отбора наиболее ценных и в тоже время гомозиготных генотипов возрастает.

В наших предыдущих экспериментах была разработана технология получения удвоенных гаплоидов рапса в культуре пыльников и изолированных микроспор [9]. Определено, что культура изолированных микроспор эффективнее культуры пыльников в количестве индуцируемых эмбриоидов на количество отобранных бутонов. Кроме того, в культуре микроспор индуцируются только эмбриоиды, без образования каллусов, таким образом практически исключается регенерация химер, анеуплоидов, самоклональной изменчивости. В дальнейшем из созданных нами гибридных комбинаций F₁ методом культуры изолированных микроспор получено 103 удвоенных гаплоидных регенеранта [8].

Таблица 1 – Показатели выделенных по признакам урожайности дигаплоидов, полученных из гибридов F₂ по сравнению с родительскими формами (2014 г.)

Наименование	Масса семян с растения, г	Масса 1000 семян, г
Викинг	3,9±0,9	2,5±0,7
Антей	3,8±1,5	2,5±0,3
ДГ Викинг х Антей (1)	10,1	3,1
ДГ Викинг х Антей(2)	3,4	4,4
Викинг	3,9±0,9	2,5±0,7
Крис	3,6±1,1	2,4±0,6
ДГ Викинг х Крис(1)	1,5	3,3
ДГ Викинг х Крис(2)	0,5	3,9
Гедемин	2,2±0,7	3,0±0,7
Крис	3,6±1,1	2,4±0,6
ДГ Гедемин х Крис(1)	0,1	3,7
ДГ Гедемин х Крис(2)	0,9	3,9
ДГ Гедемин х Крис(3)	1,2	3,6
ДГ Гедемин х Крис(4)	1,1	3,9
ДГ Гедемин х Крис(5)	0,1	4,0
ДГ Гедемин х Крис(6)	11,1	3,1
ДГ Гедемин х Крис(7)	0,6	3,7
ДГ Гедемин х Крис(8)	14,5	3,8
ДГ Гедемин х Крис(9)	6,4	2,2
ДГ Гедемин х Крис(10)	2,1	4,8
Гранит	2,6±0,8	2,3±0,6
Крис	3,6±1,1	2,4±0,6
ДГ Гранит х Крис(1)	11,1	3,6
ДГ Гранит х Крис(2)	2,1	4,4
ДГ Гранит х Крис(3)	15,0	3,8
Н-401	2,5±0,8	2,9±0,5
Крис	3,6±1,1	2,4±0,6
ДГ Н-401 х Крис	6,2	3,7

В 2014 году на экспериментальном поле Института были высеяны дигаплоиды второго семенного поколения. В таблице 1 представлены данные только тех дигаплоидных растений, у которых признаки урожайности – масса семян с растения и масса 1000 семян превышали такие показатели у родительских форм. Наилучшие показатели по массе семян с одного растения показали удвоенные гаплоиды комбинаций Викинг х Антей, Гедемин х Крис и Гранит х Крис. По массе 1000 семян выделились дигаплоиды комбинаций Викинг х Антей, Гедемин х Крис и Гранит х Крис. Кроме того, следует отметить появление желтосемянных дигаплоидных растений в комбинации Гедемин х Крис. Желтосемянность для рапса является одним из важнейших технологических признаков, повышающих выход масла из семян.

В таблице 2 представлены результаты анализа жирнокислотного состава дигаплоидных линий рапса. У всех полученных линий эруковой кислоты обнаружено не было. По содержанию олеиновой кислоты выделилась дигаплоидная линия комбинации Викинг х Антей с наибольшим процентом из всего изучаемого материала, при этом эта же линия показала наилучшие результаты по массе 1000 семян (таблица 1). По содержанию линолевой кислоты отмечена линия комбинации Гедемин х Крис, при этом суммарное содержание насыщенных жирных кислот у линии одно из самых наименьших среди всего изучаемого материала. Эта же линия имела хорошие показатели по массе семян с одного растения (таблица 2). Следует отметить, что большинство полученных дигаплоидных растений имели хорошие показатели жирнокислотного состава – низкое содержание насыщенных жирных кислот (пальмитиновой и стеариновой), и высокий процент содержания ненасыщенных жирных кислот (олеиновой, линолевой и линоленовой).

Таблица 2 – Состав жирных кислот масла семян удвоенных гаплоидов рапса (% от суммы кислот)

Наименование образца	P (C16:0)	S (C18:0)	O (C18:1)	L (C18:2)	Ln (C18:3)
Антей	5,99	3,27	60,26	18,59	10,74
ДГ Викинг х Антей (1)	6,05	2,08	64,86	16,32	7,21
ДГ Викинг х Антей(2)	4,88	2,22	68,25	14,85	6,5
Крис	5,6	3,46	65,13	16,07	8,84
ДГ Викинг х Крис(1)	7,02	3,06	59,94	19,84	7,32
ДГ Викинг х Крис(2)	5,80	1,92	63,64	19,71	5,24
Гедемин	6,74	2,69	56,79	19,96	6,92
Крис	5,6	3,46	65,13	16,07	8,84
ДГ Гедемин х Крис(1)	5,51	2,60	62,37	21,37	5,45
ДГ Гедемин х Крис(2)	5,98	2,01	63,89	20,18	5,10
ДГ Гедемин х Крис(3)	7,14	2,62	63,67	21,05	5,52
ДГ Гедемин х Крис(4)	5,35	2,33	64,29	17,96	6,47
ДГ Гедемин х Крис(5)	5,43	2,49	58,53	23,42	7,49
ДГ Гедемин х Крис(6)	5,8	2,25	62,04	20,35	7,15
ДГ Гедемин х Крис(7)	8,12	1,97	61,02	19,68	9,22
ДГ Гедемин х Крис(8)	8,12	1,97	61,02	19,68	9,22
ДГ Гедемин х Крис(9)	5,79	1,84	55,03	24,11	10,01
ДГ Гедемин х Крис(10)	4,88	2,07	64,67	18,14	7,57
Крис	5,6	3,46	65,13	16,07	8,84
ДГ Гранит х Крис(1)	6,20	2,34	59,04	21,87	7,72
ДГ Гранит х Крис(2)	5,7	2,87	63,81	18,83	6,03
ДГ Гранит х Крис(3)	5,83	3,12	59,54	21,08	6,62
Нуола 401	5,58	3,09	65,02	15,78	9,22
Крис	5,6	3,46	65,13	16,07	8,84
ДГ Н-401 х Крис	5,62	2,08	64,00	19,56	6,75

В результате проведенных экспериментов получены удвоенные гаплоиды ярового рапса из гибридных комбинаций второго поколения. Анализ удвоенных гаплоидов по количественным и качественным признакам показал, что полученный материал имеет пищевое направление, с низким содержанием эруковой кислоты и ценными хозяйственно-полезными признаками. Следует отметить появление желтых семян у одной из линий удвоенных гаплоидов из черносемянного гибрида, родители которого также имели черные семена. Возможно, что данное событие произошло в результате мутагенеза в процессе культивирования микроспор. Все выделенные дигаплоидные линии будут высеяны в последующие годы для размножения и испытания в различных экологических регионах Казахстана.

Таким образом, показано, что за относительно короткий срок возможно получение стабильных нерасщепляющихся линий рапса с признаками высокой урожайности и ценного качества семян. Полученные линии имеют высокий потенциал для создания сорта в течение последующих 3–4 лет.

Работа выполнена в рамках МГ.0591: Межгосударственная целевая программа ЕвразЭС «Инновационные биотехнологии» на 2012–2014 годы.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Prem D., Gupta K., Agnihotri A. Doubled haploids: A powerful biotechnological tool for genetic enhancement of oilseed brassicas // Plant biotechnology and molecular marker. Springer Netherlands. – 2004. – P. 18-30.
- [2] Weber S., Zarhloul M. K., Friedt W. Modification of oilseed quality by genetic transformation // Progress in Botany. – 2000. – Vol. 62. – P. 140-174.
- [3] Amitava R., Saha P.K. Isolation of low erucic acid-containing genotype of Indian mustard (*Brassica juncea* Czern. and Coss.) through F1 hybrid anther culture // African Journal of Biotechnology. – 2006. – Vol. 5 (22). – P. 2092-2096.
- [4] FAOSTAT <http://faostat.fao.org/>
- [5] Информационное агентство «Казак-Зерно» <http://ksdp-ayu1.kz>
- [6] Корсаков Н.И., Адамова О.П., Буданова В.И. Методические указания по изучению коллекции зерновых бобовых культур; ВАСХНИЛ, Всесоюз. науч.-исслед. ин-т растениеводства им. Н. И. Вавилова. – Ленинград : ВИР, 1975. – 59 с.
- [7] ГОСТ Р 51483-99. Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме, Государственный стандарт Российской Федерации. – М., 1999. – С. 151-159.
- [8] Волков Д.В., Затыбеков А.К., Дауров Д.Л., Даурова А.К., Шамекова М.Х., Жамбакин К.Ж. Getting diggaploidnyh rape plants of the most promising hybrid combinations by androgenesis. Research Results. – 2013. – № 4(060). – p. 83-89.
- [9] Жамбакин К.Ж., Шамекова М.Х., Волков Д.В., Затыбеков А.К., Дауров Д.Л., Жорабекова А.К., Халиков А.Р. Getting doubled haploid canola. Bulletin of KazNU. Алматы, 2012. – № 3(55). – p. 47-57.

REFERENCES

- [1] Prem D., Gupta K., Agnihotri A. Doubled haploids: A powerful biotechnological tool for genetic enhancement of oilseed brassicas. Plant biotechnology and molecular marker. Springer Netherlands. 2004. P. 18-30.
- [2] Weber S., Zarhloul M. K., Friedt W. Modification of oilseed quality by genetic transformation. Progress in Botany. 2000. Vol. 62. P. 140-174.
- [3] Amitava R., Saha P.K. Isolation of low erucic acid-containing genotype of Indian mustard (*Brassica juncea* Czern. and Coss.) through F1 hybrid anther culture. African Journal of Biotechnology. 2006. Vol. 5 (22). P. 2092-2096.
- [4] <http://faostat.fao.org/>
- [5] <http://ksdp-ayu1.kz>, «Kazah-Zerno»
- [6] Korsakov N.I., Adamova O.P., Budanova V.I. Guidelines for the study of the collection of grain legumes; Academy of Agricultural Sciences, All-Union. nauch.-research. Institute of Plant Industry n.a. Vavilov. Leningrad: VIR, 1975. P. 59. (in Russ.).
- [7] GOST R 51483-99. Vegetable oils and animal fats. Determination by gas chromatography mass of methyl esters of individual fatty acids to their sum, the State Standard of the Russian Federation. M., 1999. P. 151-159. (in Russ.).
- [8] Volkov D.V., Zatybekov A.K., Daurov D.L., Daurova A.K., Shamekova M.H., Zhambakin K.Zh. Poluchenie digaploidnyh rastenij rapsa iz perspektivnyh gibridnyh kombinacij metodom androgeneza. Issledovaniya, rezul'taty. 2013. № 4(060). P. 83-89.
- [9] Zhambakin K.Zh., Shamekova M.H., Volkov D.V., Zatybekov A.K., Daurov D.L., Zhorabekova A.K., Halikov A.R. Poluchenie udvoemnyh gaploidov rapsa. Vestnik KazNU. Almaty, 2012. № 3(55). P. 47-57.