



Latvijas Lauksaimniecības universitāte
“Zemkopības institūts”

PĀRSKATS

par paveikto 2017.gadā projektā

Ganību airesnes pirmsselekcijas materiāla izvērtēšana

Projekta vadītāja:

LLU ZI pētniece, Mg.agr.
Sarmīte Rancāne

SKRĪVERI 2017

Projekta aktualitāte:

Ganību airene ir viens no nozīmīgākajiem lopbarības zālaugiem. Tai ir izcilas ataugšanas spējas, tā nodrošina augstu ražu un izcilu lopbarības kvalitāti. Prognozēto klimata izmaiņu ietekmē ganību airesnes audzēšanas platības un izplatības areāls tuvākajā nākotnē ievērojami paplašināsies. Šobrīd pieejamais ganību airesnes ģenētiskais materiāls nav pietiekami daudzveidīgs un ekoloģiski plastisks, kas var radīt problēmas nākotnes mainīgajos klimatiskajos apstākļos, tādēļ projekta ietvaros, iesaistoties Ziemeļvalstu un Baltijas valstu selekcionāriem un akadēmiskajām institūcijām, iecerēts veikt plašu ganību airesnes ģenētiskā materiāla izpēti darbu, palielināt tā daudzveidību un noturību pret dažādiem biotiskajiem un abiotiskajiem stresiem.

Projekta mērķi:

1. Starptautiskā Ziemeļvalstu un Baltijas valstu zālaugu selekcionāru publiski-privātā sadarbības projekta “PPP for Pre-breeding in Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.)” ietvaros izvērtēt, pilnveidot un atlasīt ganību airesnes indivīdus un populācijas - ģenētisko materiālu, kas būtu īpaši adaptētās spējīgs nākotnes mainīgajos klimatiskajos apstākļos un kuru nākotnē varētu izmantot jaunu šķirņu veidošanai Ziemeļu un Baltijas reģionā.
2. Sniegt savu ieguldījumu datu materiāla ieguvē ganību airesnes molekulāro marķieru izstrādei mērķtiecīgākai selekcijas virzīšanai nākotnē.
3. Projekta kopējais mērķis ir izveidot sadarbības platformu kapacitātes stiprināšanai un sinerģijai starp augu selekcijas kompānijām un akadēmiskajām institūcijām Ziemeļu un Baltijas reģionā.

Projekta uzdevumi LLU Zemkopības institūtam 2017.gadā:

1. Divās vietās Latvijā atšķirīgos augsnes un klimatiskajos apstākļos, pielietojot tipisku ganību airesnes apsaimniekošanas praksi, pēc starptautiskās Ziemeļvalstu un Baltijas valstu projekta darba grupas izstrādātas metodikas veikt izvērtēšanu plašas izcelsmes ganību airesnes diploīdajām (2n) populācijām, nodrošināt dabisko izlasi un labāko formu hibridizāciju, lai radītu īpaši plastiskas ganību airesnes populācijas – selekcijas izejmateriālu jaunu šķirņu veidošanai nākotnē.
2. Uzturēt un īstenot nepieciešamo agrotehnisko pasākumu kompleksu mākslīgi izveidoto tetraploīdo ganību airesnes augu izlases audzētavā, lai nodrošinātu optimālus augšanas apstākļus un objektīvi novērtētu un aprakstītu visus augus.
3. Iegūt detalizētu fenotipisko informāciju par 250 mākslīgi izveidotajiem tetraploīdiem (kopā 750 augi) saskaņā ar starptautiskās Ziemeļvalstu un Baltijas valstu projekta darba grupas izstrādāto metodiku un ganību airesnes deskriptoriem.
4. Noteikt ploīditāti, izmantojot plūsmas citometru, visiem 750 izmēģinājumā izvietotajiem tetraploīdajiem ganību airesnes augiem.

Metodika un izmēģinājumu apstākļi

Nosprausto mērķu sasniegšanai 2016.gadā tika iekārtotas 3 ganību airesnes audzētavas:

1. Izlases augu audzētava Skrīveros LLU Zemkopības institūta Selekcijas augsekas laukos (56°37'N; 25°06 E), kur katrs mākslīgais tetraploīds tika sadalīts 3 klonos un visi 750 augi randomizēti izstādīti 3 atkārtojumos kvadrātligzdās (60 x 60 cm). Augi tika sanumurēti un katram augam tika fiksēta atrašanās vieta (numurs/rinda/sleja).
2. Hibridizācijas audzētava diploīdajām (2n) populācijām ar plašu ģenētisko daudzveidību Skrīveros LLU Zemkopības institūta Selekcijas augsekas laukos.
3. Hibridizācijas audzētava ganību airesnes diploīdajām (2n) populācijām ar plašu ģenētisko daudzveidību Dunalkā SIA "Krustmaļu Sēklas" saimniecības laukos (56°68'N; 21°32 E)

Izmēģinājumu lauku raksturojums.

Ģeogrāfiskais novietojums. Izmēģinājumu lauks atrodas Skrīveros – vidus Latvijas līdzenumā Madlienas slīpuma dienvidrietumu daļā – uz robežas starp salīdzinoši auksto ziemeļrietumu Vidzemes un siltāko Austrumlatvijas līdzenumu. Gada vidējo gaisa temperatūru summa šajā apvidū parasti ir robežās no 1800 līdz 2000 °C; vidējā augsnes temperatūru summa svārstās no 2000 līdz 2200 °C. Skrīveru meteostacijas ilggadīgie vidējie dati liecina, ka veģetācijas periods Skrīveros ir 180-200 dienas garš, nokrišņu daudzums vidēji 600-750 mm, gaisa temperatūru summa virs 5°C vidēji svārstās starp 2000 līdz 2300°C. Kopumā klimatiskie apstākļi ir piemēroti ganību airesnes kultivēšanai, tomēr mēdz būt problēmas ar ziemošanu nepastāvīgo laika apstākļu dēļ ziemas periodā, t.sk., kailsalu dēļ, bet jo īpaši augi cieš un iet bojā krasi svārstīgo temperatūru dēļ pavasara periodā, kad atsākas veģetācija.

Dunalkā klimatiskos apstākļus lielā mērā nosaka tās atrašanās jūras tuvumā, tādēļ klimats ir salīdzinoši maigāks, gaisa mitrums lielāks un līdz ar to arī labvēlīgāks ganību airesnes audzēšanai. Hibridizācijas audzētavas izvietojumu Dunalkā noteica vairāki faktori. Pirmkārt, tas bija projekta partneru redzējums izvēlēties otro vietu Kurzemes pusē, kur atšķirībā no Skrīveriem dominē izteiktāks piejūras klimats ar izteiktāku jūras ietekmi, maigākām ziemām, nepastāvīgāku sniega segu, biežākiem atkušņiem un par apmēram 1-2 nedēļām garāku veģetācijas periodu. Otrs noteicošais faktors bija SIA "Krustmaļu Sēklas" pieredze zālaugu audzēšanā un izmēģinājumu iekārtošanā, ka arī atsaucība un vēlme sadarboties šajā jomā.

Augsnes raksturojums izmēģinājumu laukos.

- Izmēģinājumi Skrīveros iekārtoti velēnu vāji podzolētā smilšmāla augsnē ar organiskās vielas saturu 1.8 – 2.4 %, kālija (K₂O) saturu 69 - 107 mg kg⁻¹; fosfora (P₂O₅) saturu 66 - 90 mg kg⁻¹; Mg 160 mg kg⁻¹; Ca 679 mg kg⁻¹; augsnes reakciju pH KCl 5.6 - 5.7.

- Dunalkā izmēģinājumi iekārtoti laukā ar šādu agroķīmisko raksturojumu: organiskās vielas saturs 5.0 %, kālija (K_2O) saturs 160 mg kg^{-1} ; fosfora (P_2O_5) saturs 142 mg kg^{-1} , Mg 307 mg kg^{-1} ; Ca 1982 mg kg^{-1} ; augsnes reakcija pH KCl 5.7.

REZULTĀTI – 2017.gadā veiktās aktivitātes projekta ietvaros

Visu sezonu visās trīs audzētavās tika veikti augu kopšanas, mēslošanas, uzturēšanas darbi, lai nodrošinātu optimālus augšanas apstākļus ganību airenei, kā arī radītu apstākļus sekmīgai novērojumu un uzskaišu veikšanai.

Hibridizācijas audzētavas

Abās vietās iekārtotajās hibridizācijas audzētavās sezonas gaitā tika veikta zelmeņu mēslošana 3 reizes: pavasarī pēc veģetācijas atjaunošanās tika izmantota azofoska 375 kg ha^{-1} , nodrošinot $60 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$; $60 \text{ kg ha}^{-1} \text{ P}_2\text{O}_5$ un $60 \text{ kg ha}^{-1} \text{ K}_2\text{O}$; pēc 1.un 2.pļāvuma ar amonija nitrātu nodrošināti $60 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$ tīrvielā.



1.attēls. Ganību airenes hibridizācijas audzētava Skrīveros 28.08.2017



2.attēls. Ganību airenes hibridizācijas audzētava Dunalkā 26.08.2017

Zelmeņa applaušana tika veikta skarošanas fāzē: Skrīveros veikti 3 pļāvumi; Dunalkā 4 pļāvumi. Veikta nezāļu apkarošana, izsmidzinot herbicīdus divdīgļlapju ierobežošanai. Rudenī zelmeņi applauti un sagatavoti ziemošanai.

Izlasses audzētava

Katram augam (750 gab) tika veikta ražas uzskaite - 2 reizes sezonā pilnas skarošanas fāzē, sagatavoti audu paraugi ploīditātes analīžu veikšanai, kā arī veikta detalizēta fenotipisko īpašību novērtēšana un aprakstīšana. Pavisam 2017.gada veģetācijas periodā izlasses augu audzētavā veikti 39 fenoloģiskie vērtējumi un uzskaites, kuri apkopoti 1.tabulā, kur redzama arī vērtējuma atkārtojamība starp 3 vērtējumiem (jo vairāk skaitlis tuvojas 1, jo ciešāk vērtējumi saskan starp atkārtojumiem).



3.attēls. Ganību aīrenes izlasses audzētava Skrīveros 2017.gada jūlijā.

Lielākoties visi vērtējumi veikti 9 ballu skalā ar gradāciju: 1 – pazīmes izpausme zemākā mērā; 9 – pazīmes izpausme augstākā mērā.

Rūsas uzņēmība vērtēta pēc Eucarpia (Eiropas selekcionāru asociācija) izstrādātās metodikas (*Eucarpia Multisite Rust evaluation*):

1 = nav rūsas pazīmju; 2 = minimālas rūsas pazīmes; 3 = 5% no lapu virsmas klāti ar rūsu; 4 = 10% no lapu virsmas klāti ar rūsu; 5 = 25% no lapu virsmas klāti ar rūsu; lielākoties lapas ar izkaisītām pustulām; 6 = 40% no lapu virsmas klāti ar rūsu + plankumainas ar daudzām pustulām; 7 = 60% no lapu virsmas klāti ar rūsu; lapas blīvi klāj rūsas apgabali un neliela nekroze; 8 = 75% no lapu virsmas klāti ar rūsu; lapas blīvi segtas ar rūsu un daudz nekrotisku lapu; 9 = vairāk par 75% no lapu virsmas klāti ar rūsu, dominē nekrotiskas lapas.

2017.gadā ganību airesnes izlases audzētavā veiktās uzskaites

Uzskaites nr.	Uzskaites datums	Uzskaitē/ vērtējums	Atkārtojamība starp 3 vērtējumiem
PP39	6.11.2017.	Ataugšana rudenī S	Atkārt.=0,41
PP38	18.10.2017.	Krāsa S	Atkārt.=0,46
PP37	2.10.2017.	Slimību uzņēmība S	Atkārt.=0,22
PP36	29.09.2017.	Lapu platums S	Atkārt.=0,46
PPP.35	28.09.2017.	Vispārējais novērtējums S	Atkārt.=0,38
PPP.34	29.08.2017.	Augu svars 2.pļāvums	Atkārt.=0,37
PPP.33	28.08.2017.	Slimību uzņēmība	Atkārt.=0,49
PPP.32	28.08.2017.	Stiebrī atālā S	Atkārt.=0,81
PPP31	25.08.2017.	Garaākais stiebris, cm. S	Atkārt.=0,51
PPP 30.	7.08.2017.	Lapojuma augstums I	Atkārt.=0,50
PPP 29.	15.08.2017.	Rūsas izplatība S	Atkārt.=0,38
PPP 28.	7.08.2017.	Stiebrī atālā I	Atkārt.=0,45
PPP 27.	3.08.2017.	Atāla garums S	Atkārt.=0,57
PPP 26.	5.07.2017.	Ataugšanas intensitāte S/I	Atkārt.=0,54
PPP 25.	21.-27.06.2017.	Pieaugumi,0=0,0001	Atkārt.=0,24
PPP 24.	16.27.06.2017.	Garums	Atkārt.=0,31
PPP 23.	27.06.2017.	Augu svars 1.zāle, kg	Atkārt.=0,34
PPP 22.	26.27.06.2017.	Ploiditāte S	Atkārt.=0,52
PPP 21.	26.27.06.2017.	Vispārējais novērtējums S/I	Atkārt.=0,49
PPP 20.	21.06.2017.	Vārpu lielums I	Atkārt.=0,47
PPP 19.	30.05-30.06.2017.	Plaukšana S	Atkārt.=0,76
PPP 18.	21.06.2017.	Veldres izturība S	Atkārt.=0,58
PPP 17.	17.06.2017.	Cera lielums (apjoms)	Atkārt.=0,35
PPP 16.	16.06.2017.	Lapainība S	Atkārt.=0,49
PPP 15.	15.06.2017.	Skarošanas intensitāte S	Atkārt.=0,67
PPP.14	25.05.2017.	Stiebrošanas intensitāte S	Atkārt.=0,53
PPP.13	23.05.2017.	Augšanas virziens S	Atkārt.=0,62
PPP.12	5.05.2017.	Ataugšana pavasarī S	Atkārt.=0,40
PPP.11	3.05.,25.05.2017.	Lapu platums S/I	Atkārt.=0,62
PPP.10	3.4.05.2017.	Cera blīvums S/I	Atkārt.=0,49
PPP.9	28.04.2017.	Augšanas virziens I/S	Atkārt.=0,46
PPP.8	3.05.2017.	Ziemcietība S/I	Atkārt.=0,33
PPP.7	28.04.2017.	Lapu krāsa S/I	Atkārt.=0,48
PPP.6	11.04.2017.	Auga lielums S	Atkārt.=0,21
PPP.5	10.04.2017.	Sniega pelējuma izturība I	Atkārt.=0,15

Ploiditātes noteikšanas metodika

Ganību airesnes cerošanas/stiebrošanas fāzē tika sagatavoti audu paraugi ploiditātes analīzēm – no katra auga noņemtas 3-4 lapas, iefītas filtrpapīrā un ievietotas hermētiskā maisiņā ar silikongēlu, lai paraugi strauji atūdeņotos.

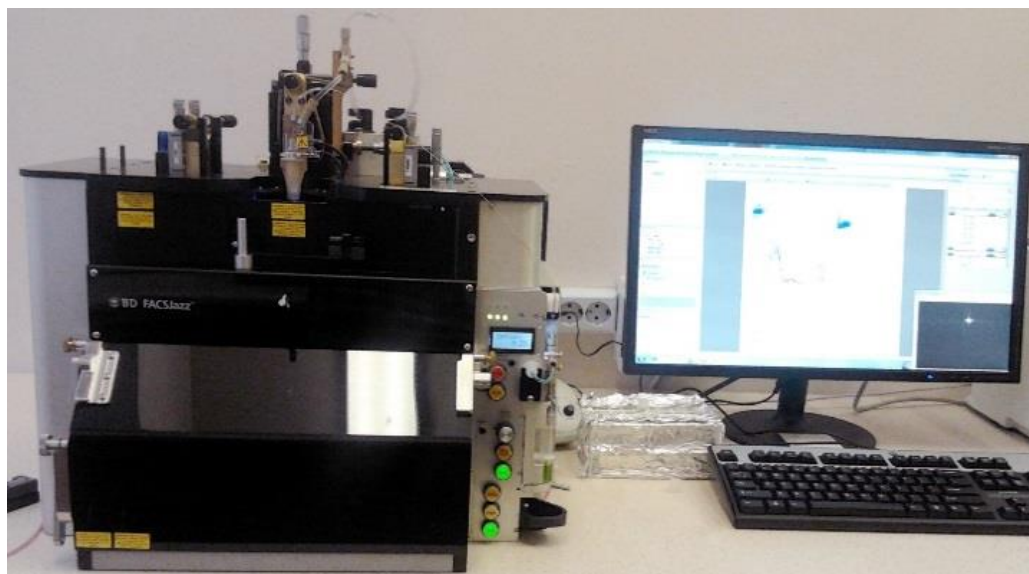
Plūsmas citometrijas metode ganību airesnes paraugu ploiditātes noteikšanai

Lai veiktu ploiditātes mērījumus, paraugi tika sagatavoti pēc (Partec CyStain PI Absolut P komplekta) protokola:

1. Sākotnēji sagatavo krāsošanas šķīdumu, kas sastāv no (1 paraugam): 2,0 mL krāsošanas bufera, 12 µl propīdija jodīda (PI) un 6 µl ribonukleāzes. Krāsošanas šķīdumu ievieto ledusskapī, tumsā 4 °C.
2. Molekulārajā desrtuktorizatorā like ~0,5 cm² lielu lapas daļu un pievieno 500 µl kodolu ekstrakcijas buferi.
3. Izveidoto maisījumu notur istabas temperatūrā 90 sekundes.
4. Maisījumu filtrē caur filtru ar poru diametru 40 µm un nofiltrēto šķīdumu pārnes uz 5,0 mL plastmasas citometrijas stobriņu.
5. Paraugam pievieno 2,0 mL jau iepriekš (1. punktā) sagatavoto krāsošanas šķīdumu un paraugu ievieto ledusskapī, tumsā 4 °C un inkubē 30-60 minūtes.

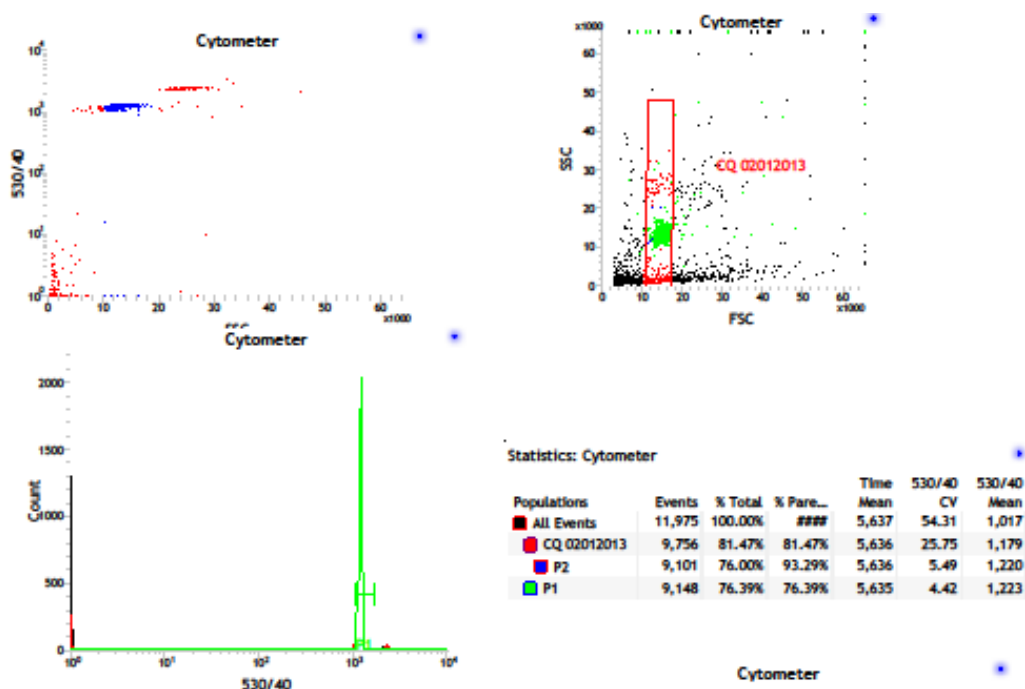
Ganību airesnes ploiditātes noteikšanai tika izmantots plūsmas citometrs Flow cytometry – BD FACSJazz cell sorter (BD Biosciences, ASV) (4. att.). Plūsmas citometrijas metode ļauj pētīt dažādas mikroskopiskas daļiņas, piemēram, šūnas un kodolus, kā arī veikt to uzskaiti. Citometrijas analīze spēj analizēt līdz vairākiem tūkstošiem daļiņu sekundē.

Pirms analīžu veikšanas sertificēts speciālists veica plūsmas citometra kalibrēšanu ar speciālu šķīdumu SpheroTM Rainbow Calibration Particles, 1 peaks, 3.0-3.4 µm (BD Biosciences, ASV) (6. att.), ko atšķaidīja ar buferšķīdumu BD FACS Flow Sheath Fluid (BD Biosciences, ASV), lai mazinātu daļiņu salipšanas iespēju. Šis buferšķīdums arī tika izmantots plūsmas citometra strūklas cirkulācijas nodrošināšanai un mazgāšanai. Pēc kalibrēšanas veica aparāta skalošanu ar buferšķīdumu – palaida automātisku plūsmu pretējā virzienā, lai nepaliktu kalibrācijas šķīduma daļiņas. Pēc tam varēja veikt sarkanā ganību airesnes mērījumus. Plūsmas citometra programmā, ko veic sertificēts speciālists, tika uzstādīti propīdija jodīda kanāla uzstādījumi – impulsa detektors 530/29 un darbības lauks 585/29.

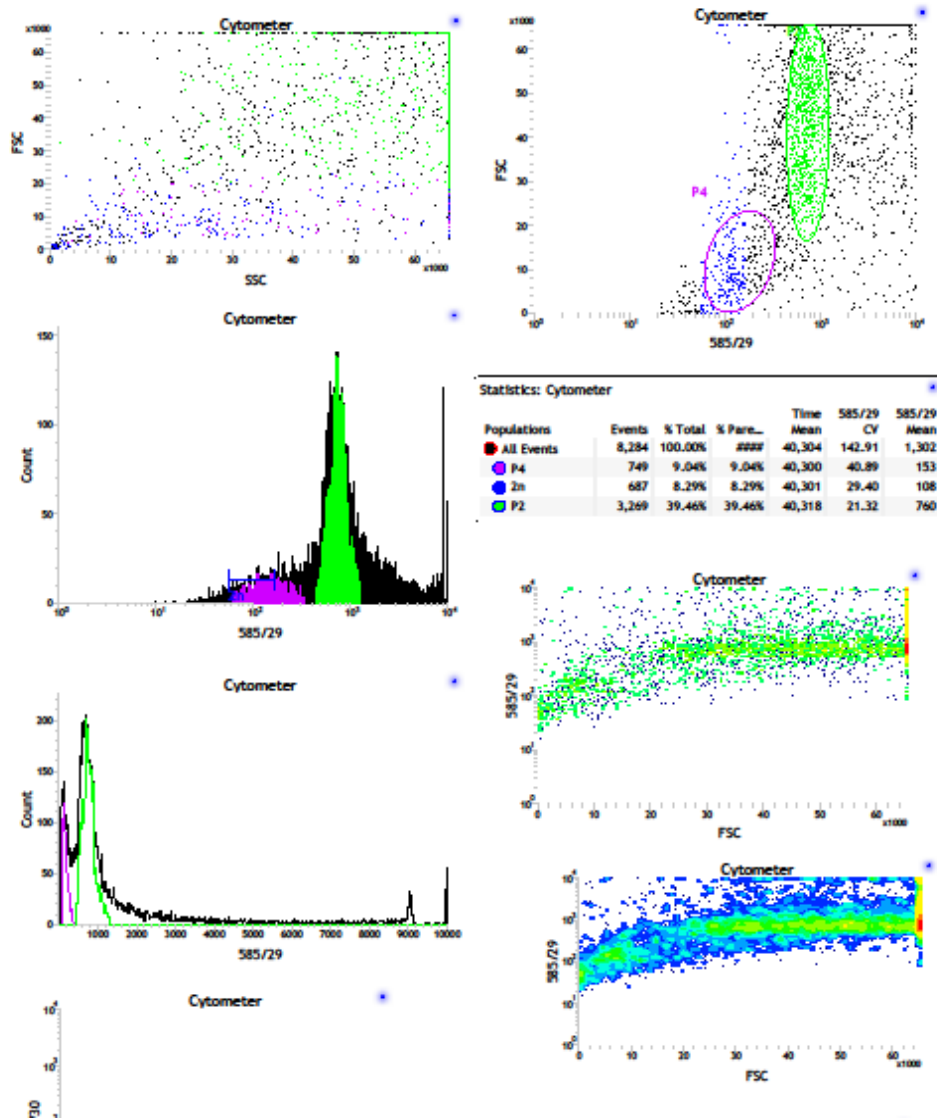


4. att. Plūsmas citometrs BD FACSJazz cell sorter (BD Biosciences, ASV)

Analizējamais paraugu, atšķaida ar buferšķīdumu, lai mazinātu daļiņu salipšanas iespēju. Stobriņu ievieto plūsmas citometrā tam paredzētajā vietā un paraugs ar noteiktu ātrumu tika sūknēts cauri ļoti tievam kapilāram (diametrs 100 μm). Plūsma tiek virzīta uz aparāta augšpusi, kur atrodas zilais (488 nm) un sarkanais (640 nm) lāzeris, un plūsma nonāk lāzeru darbības laukā (5.att.).



5.att. Plūsmas citometra kalibrācija.



6. att. Ploiditātes noteikšanas ganību airenei (piemērs). Attēlā ganību aireses teraoloīda aua analīze.

Ar zilo lāzeru (488) lāzeru palīdzību un plūsmas citometra programmu (DB FACS™ Software 1.0.0.650) katra daļiņa tika uzskaitīta, noteikts tās izmērs un fluorescence. Analizējamo paraugu fluorescence noteikšanai tika lietota logaritmiskā skala. Viens paraugs tika analizēts 5-10 min, kura laikā tika uzskaitīti līdz 10000 kodolu (6. att.), veikta to iezīmēšana un noteikta procentuālā attiecība pret visu kodolu skaitu. Pēc katra analizējamā parauga noņemšanas veic 5 min citometra skalošanu, lai nepaliktu iepriekšējā parauga daļiņas.

Projekta publicitāte

Ņemta dalība divās projekta darba grupas sanāksmēs, kur prezentētas veiktās aktivitātes, izdiskutētas problēmas un iespējamie risinājumi, izskatītas plānotās publikācijas, veikta ideju apmaiņa un apkopošana projekta nākamās fāzes (2018.-2020. gads) aktivitātēm.

2017.gadā Eiropas selekcionāru biedrības EUCARPIA rīkotajā konferencē Viļņā prezentācija un publikācija par projekta aktivitātēm “Utilization of genebank accessions to improve northern adaptation of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.).

Galvenie secinājumi

1. Dalība šādā starptautiskā projektā ir ļoti vērtīga, jo vienlaicīgi tiek veikts ļoti apjomīgs darbs dažādos līmeņos. Neskatoties uz to, ka projekta partneriem ir ļoti atšķirīgs tehniskais nodrošinājums, katram ir iespēja ieguldīt savu artavu atbilstoši iespējām un būt līdzvērtīgam partnerim, pretendēt uz visiem projekta laikā iegūtajiem rezultātiem, datiem, selekcijas izejmateriālu utt.
2. Labs paraugs, kā produktīvi sadarboties privātajām un valsts institūcijām, jo projekta rezultātiem ir gan teorētiska, gan praktiska nozīme.
3. Līdzšinējā pieredze ir pierādījusi, ka pārbaudot un atlasot selekcijas izejmateriālu iespējami atšķirīgās klimatiskajās zonās, iespējams ievērojami uzlabot šķirnes plastiskumu, spēju adaptēties dažādos apstākļos.
4. Pirmie ievāktie dati liecina, ka izmēģinājumos iekļautais selekcijas izejmateriāls ir ļoti daudzveidīgs, no tā iespējams atlasīt un izveidot vairākas perspektīvas ganību airesnes populācijas izmantošanai dažādiem mērķiem. Bet galvenā problēma ir ziemcietība un ilgstoša saglabāšanās zemenī, tāpēc šobrīd tālejošus secinājumus ir pārāgri veikt.