



УСКОРЕНО СЪЗДАВАНЕ НА ЦМС-АНАЛОЗИ НА ПЕРСПЕКТИВНИ В-ЛИНИИ СЛЪНЧОГЛЕД ЧРЕЗ  
ИЗПОЛЗВАНЕ НА БИОТЕХНОЛОГИЧНИ МЕТОДИ  
ACCELERATED DEVELOPMENT OF CMS-ANALOGS OF NEW SUNFLOWER MAINTAINER LINES BY USING  
BIOTECHNOLOGICAL METHODS

Миглена Друмева<sup>1\*</sup>, Нина Ненова<sup>2</sup>  
Miglena Drumeva<sup>1\*</sup>, Nina Nenova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Технически университет – Варна

<sup>1</sup>Technical University \_ Varna

<sup>2</sup>Добруджански земеделски институт – Генерал Тошево

<sup>2</sup>Dobrudzha Agricultural Institute – General Toshevo

\*Email: m\_drumeva@abv.bg

### Резюме

Изследването е проведено в Добруджанския земеделски институт (ДЗИ), гр. Генерал Тошево, през 2004 и 2005 г. В проучването са включени 24 В-линии слънчоглед, селектирани в ДЗИ. За съкращаване на процеса по създаване на стерилни аналози на включените в изследването линии с нормална цитоплазма е приложена ембриокултура. Изолирани са 12-16-дневни незрели зародиша от 24 кръстоски от типа А х В, направени при полски условия през 2004 г. Залагани са по 25 зародиша от всяка кръстоска. Успоредно с това при оранжерийни условия са засявани по 20 семена от всяка В-линия за обезпечаване на беккроса.

Формираните млади растения (АВ) са прехвърлени в почва и отгледани при оранжерийни условия. В периода на цъфтеж АВ растенията от всеки вариант са опрашвани със съответната В-линия, за да се осъществи беккрос 1 (BC1). От 24-те варианта (АВ х В) са получени 630 BC1 незрели зародиша, 320 от които са култивирани *in vitro* до формиране на млади растения. Растенията са отгледани при оранжерийни условия до цъфтеж, когато е направен втори беккрос (BC2). Получени са общо 188 BC2 зародиша, като разпределението им по отделните варианти е различно. Цикълът се повтаря до осъществяване на BC3. Получени са 131 BC3 семена, които са засети при полски условия, където е направен четвърти беккрос. С този подход процесът по създаване на стерилни аналози на В-линиите се съкрати с 3 години.

### Abstract

The investigation was carried out at Dobrudzha Agricultural Institute – General Toshevo (DAI) in 2004 and 2005. The investigation included 24 fertility maintainer sunflower lines (B-lines) developed at DAI. To shorten the process of developing sterile analogs of the B-lines included in the study, embryo cultivation was used. Immature embryos 12-16 days old were isolated from 24 crosses of A x B type made under field conditions in 2004. Twenty-five embryos were plated from each cross. In parallel, 20 seeds from each B-line were sown in a greenhouse to ensure the back-cross.

The formed young plants (AB) were transferred to soil and grown under greenhouse conditions. During flowering, the AB plants from each variant were pollinated with the respective B-line to realize back-cross 1(BC1). Out of the 24 variants (AB x B), 630 BC1 immature embryos were obtained, 320 of which were cultivated *in vitro* till formation of young plantlets. The plants were grown in a greenhouse till flowering, when second back-cross was made (BC2). A total of 188 BC2 embryos were produced, with different distribution by variants. The cycle was repeated till realizing BC3. A total of 131 BC3 seeds were produced, which were planted under field conditions and a fourth back-cross was carried out. By applying this approach, the process of developing sterile analogs of B-lines was shortened by 3 years.

**Ключови думи:** слънчоглед, ембриокултура, ЦМС, линии, закрепители на фертилността.

**Key words:** sunflower, embryo culture, CMS, fertility maintainer lines.

### ВЪВЕДЕНИЕ

Слънчогледът е кръстосаноопрашващо се растение от род *Helianthus*, семейство *Asteraceae* (*Compositae*), което за първи път е внесено в България

през 1853 г. като декоративно растение. У нас видът *Helianthus annuus* L. придобива стопанско значение след Първата световна война. Много години в производството се отглеждат местни популации и културни сортове, от

които се получават сравнително добри добиви. На по-късен етап започва масово използване на хибриди слънчоглед, които превъзхождат сортовете по редица продуктивни показатели. Това практическо използване на хетерозиса при слънчогледа става възможно след откриване на стабилен източник на ЦМС (цитоплазмена мъжка стерилност) от Leclercq (1969) и гени за възстановяване на фертилността (Enns et al., 1970; Kinman, 1970; Leclercq, 1971; Vranceanu & Stoicescu, 1971). Независимо че днес са установени голям брой други източници на ЦМС, все още производството на хибриди слънчоглед се основава единствено на източника, открит от Leclercq – ЦМС РЕТ.

Днес слънчогледът (*Helianthus annuus* L.) е един от основните източници на растително масло в света, чието промишлено производство е базирано на внедряването в практиката на високопродуктивни и устойчиви на болести и неприятели хибриди. Основните етапи на хибридно производство са два: 1. Създаване на родителски линии; 2. Създаване на самия хибрид. За получаване на простолинеен хибриден сорт са необходими три линии:

1. Стерилна А-линия – майчина линия на хибрида с цитоплазмена мъжка стерилност и генотип rffr.
2. Фертилна В-линия – линия, закрепител на стерилността, която е идентична с майчината А-линия по отношение на генотипа (rffr), но за разлика от А-линията е с нормална цитоплазма. Използва се поддържане и възпроизводство на А-линията.
3. Фертилна R-линия – бащина линия на хибрида, линия, възстановител на фертилността, която е с генотип RfRf.

Процесът по създаване на тези линии е продължителен, поради което за получаване на един хибрид са необходими най-малко 10-12 години. За ускоряване на този процес се търсят алтернативни подходи от областта на растителните биотехнологии. Съществуват различни теоретически възможности и *in vitro* техники за интензификация на селекционния процес, но на практика не всички са приложими при слънчогледа поради ниската им ефективност. Един от методите, които може успешно да се използват при слънчогледа, е ембриокултура.

Под ембриокултура се разбира отглеждането на изолирани от семепъпката зародиши при *in vitro* условия. Първ Raghavan (1977) разработва тази методика и разкрива възможностите за нейното приложение при различните растения.

При слънчогледа този метод успешно се прилага за ускорено създаване на линии, възстановители на фертилността, а така също и за създаване на стерилни аналози (Plotnicov, 1983). В идеални условия методът позволява селекционният

процес да бъде съкратен значително, като се получават до 6 генерации в една календарна година, което е изключено като възможност при традиционната селекция (Alissa et al., 1986; Aspiroz et al., 1988).

Целта на настоящото изследване е да се проучат възможностите за ускоряване на процеса по създаване на ЦМС аналози на перспективни В-линии слънчоглед в условията на Добруджанския земеделски институт чрез прилагане на метода ембриокултура.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

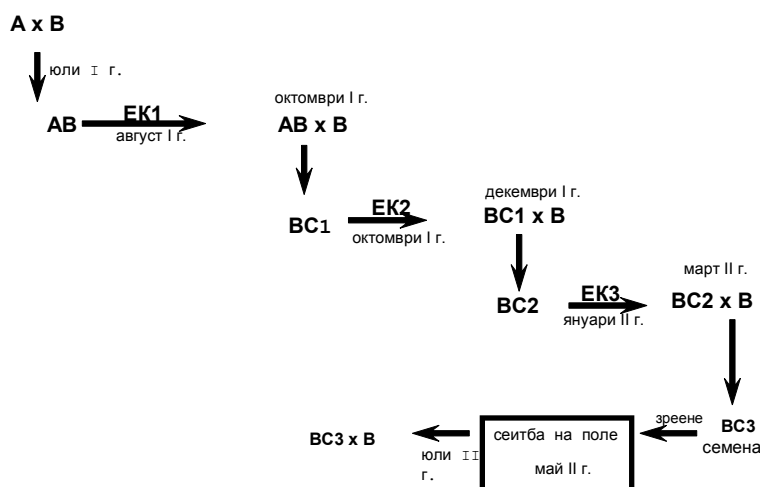
Изследването е проведено в Добруджанския земеделски институт – Генерал Тошево, в периода 2004-2005 г. В проучването са включени 24 В-линии, селектирани в Добруджанския земеделски институт, които през 2004 г. при полски условия са кръстосани с ЦМС-линия 6075 А с цел създаване на стерилни аналози на тези линии по посочената схема (фиг. 1).

Приложена е ембриокултура на 12-16-дневни незрели зародиши от кръстоските 6075 А x В (В1 – В24). Изолирането и култивирането на зародишите е извършено по методика на Aspiroz et al. (1988). Залагани са по 25 зародиша от всяка кръстоска. Успоредно с това са засявани по 20 семена от всяка от В-линиите, от които е събиран прашец за осъществяване на беккроса.

Формираните млади растения са прехвърлени в почва и са стабилизиращи при температура 15°C/10°C ден/нощ, относителна влажност 70%, фотопериод 14/10 h ден/нощ, при интензивност на светлината 30 000 лукса в продължение на 30 дни. В следващите 30 дни температурата е повишена до 20°C/15°C, при фотопериод 15/9 h и осветеност 45 000 лукса, след което температурата стъпаловидно се покачва до 25°C/20°C ден/нощ, като другите параметри остават непроменени. При тези условия растенията са отгледани до зрялост.

В периода на цъфтеж АВ растенията от всеки вариант са опрашени със съответната В-линия, осъществява се беккрос 1 (BC1). Отново се прилага ембриокултивиране на 12-16-дневни незрели BC1 зародиши. Успоредно с това се залагат и семена от В-линиите. Получените по този начин BC1 растения се отглеждат при оранжерийни условия и в периода на цъфтеж се опрашват отново със съответната В-линия - осъществява се беккрос 2 (BC2). Прилага се ембриокултура на получените BC2 зародиши. BC2 растенията се отглеждат при оранжерийни условия, където се осъществява BC3. Получените BC3 семена са засети при полски условия през 2005 г., където се осъществява четвъртият беккрос.

Ефективността на метода (%) е определена въз основа на броя получени растения на всеки етап от цикъла, отнесен към изходния брой варианти, с които опитът стартира x 100.



**Фиг. 1.** Схема за ускорено създаване на стерилни аналози на В-линии чрез използване на ембриокултура  
**Fig. 1.** Scheme for accelerated development of cms-analogs of new sunflower B-lines by using embryo culture technique

**Таблица 1.** Резултати от прилагане на ембриокултура на незрели зародиши от изходните кръстоски на В-линиите с ЦМС линия 6075 А

**Table 1.** Results of applying embryo culture on immature embryos, obtained from initial crosses between the B lines and the CMS line 6075 A

№	Изходна кръстоска Initial cross	Заложени АВ зародиши (брой) AB embryos plated (number)	Получени АВ растения (брой) AB plants obtained (number)
1	6075 A x B1	25	11
2	6075 A x B2	25	3
3	6075 A x B3	25	7
4	6075 A x B4	25	19
5	6075 A x B5	25	10
6	6075 A x B6	25	13
7	6075 A x B7	25	18
8	6075 A x B8	25	19
9	6075 A x B9	25	19
10	6075 A x B10	25	16
11	6075 A x B11	25	19
12	6075 A x B12	25	19
13	6075 A x B13	25	19
14	6075 A x B14	25	5
15	6075 A x B15	25	18
16	6075 A x B16	25	19
17	6075 A x B17	25	20
18	6075 A x B18	25	20
19	6075 A x B19	25	20
20	6075 A x B20	25	19
21	6075 A x B21	25	20
22	6075 A x B22	25	14
23	6075 A x B23	25	17
24	6075 A x B24	25	12
	Общо	600	376

Всички данни са обработени с помощта на програмата Statistica, Version 5.1 D, Stat Soft. Inc.

### РЕЗУЛТАТИ

От направените през 2004 г. при полски условия изходни кръстоски на отбраните В-линии с линия 6075 А, използвана като донорна линия на стерилна цитоплазма, са изолирани и въведени в култура общо 600 незрели зародиша, от които са получени 376 растения, като има вариране по отношение на общия брой получени жизнеспособни АВ растения от всеки вариант (таблица 1). Най-малък е броят на нормално развиващите се АВ растения при кръстоска № 2 и №14, а най-висок – при кръстоски № 18, № 19, № 20 и № 21. Вероятна причина за по-слабата преживяемост на АВ2 и АВ14 незрелите зародиши може да бъде стресовото въздействие на манипулациите по изолирането, стерилизирането и платирането на хибридни ембриони в изкуствената хранителна среда.

В периода на цъфтежа част от получените АВ растения от всеки вариант са опрашени със съответната В-линия. Направени са общо 150 ВС1 кръстоски, като разпределението им по варианти е посочено в таблица 2. При отделните варианти са реализирани различен брой кръстоски, който е определен от наличните АВ растения от съответния вариант и от поленовата продуктивност на В-линиите от отделните варианти в условията на оранжерийното отглеждане. Изолирани и въведени в култура са общо 320 незрели ВС1 зародиша. Не са получени жизнеспособни зародиши при варианти АВ4 х В4; АВ5 х В5; АВ10 х В10; АВ11 х В11; АВ13 х В13; АВ16 х В16; АВ19 х В19 и АВ24 х В24, при които броят реализирани кръстоски е сравнително малък. Най-голям брой зародиши – над 30 броя, са получени от вариантите АВ23 х В23; АВ15 х В15 и АВ9 х В9. При останалите кръстоски варирането е в границите от 9 до 27 броя (таблица 2).

**Таблица 2.** Резултати от прилагане на ембриокултура на незрели зародиши, получени при първия беккрос  
**Table 2.** Results of applying embryo culture on immature embryos, obtained by first back-cross

№	Вид на кръстоската (BC1) Cross type (BC1)	Осъществени ВС1 кръстоски (брой) BC1 crosses made (number)	Заложени ВС1 зародиши (брой) BC1 embryos plated (number)	Получени ВС1 растения (брой) BC1 plants obtained (number)
1	AB1 x B1	2	13	10
2	AB2 x B2	2	18	18
3	AB3 x B3	5	24	22
4	AB4 x B4	9	0	0
5	AB5 x B5	2	0	0
6	AB6 x B6	4	11	6
7	AB7 x B7	12	16	12
8	AB8 x B8	4	13	13
9	AB9 x B9	17	32	26
10	AB10 x B10	2	0	0
11	AB11 x B11	3	0	0
12	AB12 x B12	18	27	19
13	AB13 x B13	5	0	0
14	AB14 x B14	4	18	12
15	AB15 x B15	16	33	28
16	AB16 x B16	3	0	0
17	AB17 x B17	9	31	18
18	AB18 x B18	7	15	14
19	AB19 x B19	4	0	0
20	AB20 x B20	2	14	10
21	AB21 x B21	5	0	0
22	AB22 x B22	1	9	9
23	AB23 x B23	11	35	25
24	AB24 x B24	3	11	7
Общо		150	320	249



Част от получените 249 BC1 растения са подложени на следващо насищащо кръстосване със съответната В-линия и са осъществени 144 BC2 кръстоски, от които са въведени в култура *in vitro* 188 незрели зародиша (таблица 3). При варианти АВ1В1 х В1; АВ6В6 х В6; АВ7В7 х В7; АВ12В12 х В12; АВ20В20 х В20 и АВ24В24 х В24 зародишите дегенерират, поради което те отпадат от следващия етап на схемата (фиг. 1). Получени са общо 75 BC2 жизнеспособни растения от десет варианта (таблица 3).

При тези десет варианта са осъществени 55 BC3 кръстоски (таблица 4). При два от вариантите – АВ9В9В9 х В9 и АВ14В14В14 х В14, не са получени семена. От останалите варианти са получени общо 131 BC3 семена.

За успешното реализиране на схемата по ускорено създаване на стерилни аналози на В-линии слънчоглед голямо значение има преживяемостта на зародишите и развитието им в жизнеспособни растения, което силно зависи от условията, при които се осъществява ембриокултурата и отглеждането на получените растения (Plotnicov, 1983). От анализа на корелационните зависимости между трите променливи – брой направени кръстоски, заложили зародиши и получени растения, се установява доказана положителна корелация, чиято значимост се редуцира от първото (BC1 кръстоски) до последното (BC3 семена) звено от схемата. Най-силни са корелативните

зависимости между броя заложили зародиши и броя получени растения на всеки отделен етап (таблица 5).

Получените резултати доказват, че с метода ембриокултура може съществено да се съкрати времето, необходимо за създаване на стерилни аналози на В-линии с доказана селекционна стойност. В резултат на приложената схема в настоящото проучване този период се съкращава с 3 години. За скъсяване на селекционния процес при слънчогледа с 3 години чрез циклично повтарящо се прилагане на метода ембриокултура в рамките на една година докладват и Dagustu et al. (2010). В настоящото проучване успешното реализиране на схемата до получаване на BC2 растения се наблюдава при 10 от изходните 24 варианта, а до получаване на BC3 семена - при 6 от изходните 24 В-линии. При оценка на ефективността на метода в условията, в които е проведено проучването, като се отчита постепенното отпадане на част от вариантите в хода на приложената схема, резултатите са следните:

- За получаване на BC1 растения – ефективността на метода е 67%.
- За получаване на BC2 растения – ефективността на метода е 42%.
- За получаване на BC3 семена – ефективността на метода е 25%.

Условията на култивиране и отглеждане на растенията в оранжерийни условия нарушават

**Таблица 3.** Резултати от прилагане на ембриокултура на незрели зародиши, получени при втория беккрос  
**Table 3.** Results of applying embryo culture on immature embryos, obtained by second back-cross

№	Вид на кръстоската (BC2) Cross type (BC2)	Осъществени BC2 кръстоски (брой) BC2 crosses made (number)	Заложили BC2 зародиши (брой) BC2 embryos plated (number)	Получени BC2 растения (брой) BC2 plants obtained (number)
1	AB1B1 х В1	5	4	0
2	AB2B2 х В2	10	25	15
3	AB3B3 х В3	10	12	4
6	AB6B6 х В6	4	7	0
7	AB7B7 х В7	9	3	0
8	AB8B8 х В8	10	13	5
9	AB9B9 х В9	10	14	7
12	AB12B12 х В12	9	3	0
14	AB14B14 х В14	10	22	6
15	AB15B15 х В15	15	27	14
17	AB17B17 х В17	15	26	10
18	AB18B18 х В18	5	12	9
20	AB20B20 х В20	8	1	0
22	AB22B22 х В22	6	8	2
23	AB22B23 х В23	15	7	3
24	AB24B24 х В24	3	4	0
Общо		144	188	75

**Таблица 4.** Резултати от прилагане на ембриокултура на незрели зародиши, получени при третия беккрос  
**Table 4.** Results of applying embryo culture on immature embryos, obtained by third back-cross

№	Вид на кръстоската (BC3) Cross type (BC3)	Осъществени BC3 кръстоски (брой) BC3 crosses made (number)	Получени BC3 семена (брой) BC3 seeds obtained (number)
2	AB2B2B2 x B2	10	35
3	AB3B3B3 x B3	3	12
8	AB8B8B8 x B8	4	9
9	AB9B9B9 x B9	5	0
14	AB14B14B14 x B14	4	0
15	AB15B15B15 x B15	10	34
17	AB17B17B17 x B17	8	20
18	AB18B18B18 x B18	7	12
22	AB22B22B22 x B22	2	8
23	AB22B23B23 x B23	2	1
Общо		55	131

нормалния физиологичен ритъм на растението, което се отразява във всеки следващ цикъл на прилаганата ембриокултура. Средната ефективност на метода, която Dagustu et al. (2010) посочват в своите изследвания, е в границите 40-50%, което съответства на диапазона, в който се намират и нашите средни стойности.

При тези резултати е препоръчително прилагането на схемата в условията на Добруджанския земеделски институт да се реализира до получаване на BC2 семена, което би довело до съкращаване на процеса по създаване на стерилните аналози с 2 години.

**Таблица 5.** Стойности на корелационните коефициенти между брой направени кръстоски, заложи зародиши и получени растения (семена)

**Table 5.** Values of correlation coefficients between the number of crosses made, embryos plated and plants (seeds) obtained

	BC1 зародиши BC1 embryos	BC1 растения BC1 plants	BC2 кръстоски BC2 crosses	BC2 зародиши BC2 embryos	BC2 растения BC2 plants	BC3 кръстоски BC3 crosses	BC3 семена BC3 seeds
BC1 кръстоски BC1 crosses	,668**	,635**	,519**	,270	,285	,288	,143
BC1 зародиши BC1 embryos	1	,972**	,944**	,697**	,611**	,616**	,457*
BC1 растения BC1 plants		1	,927**	,721**	,683**	,683**	,548**
BC2 кръстоски BC2 crosses			1	,775**	,667**	,674**	,555**
BC2 зародиши BC2 embryos				1	,929**	,931**	,807**
BC2 растения BC2 plants					1	,996**	,899**
BC3 кръстоски BC3 crosses						1	,896**

\* Доказаност на корелацията при 0.05 - Correlation is significant at the 0.05 level

\*\* Доказаност на корелацията при 0.01 - Correlation is significant at the 0.01 level

**ИЗВОДИ**

1. Методът ембриокултура може успешно да се прилага за съкращаване на процеса по създаване на ЦМС аналози на перспективни В-линии слънчоглед.
2. За успешното реализиране на схемата по ускорено създаване на стерилни аналози на В-линии слънчоглед определящо значение имат условията, при които се осъществява ембриокултивирането и отглеждането на получените растения.
3. За постигане на добра ефективност на метода ембриокултура в условията на Добруджанския земеделски институт е препоръчително схемата да се прилага до получаване на BC2 семена.

**LITERATURA**

- Alissa, A., R. Jonard, H. Serieys, P. Vincourt*, 1986. La culture d'embryons isoles *in vitro* dans un programme d'amelioration du tournesol. – CR Acad. Sci., Paris, t. 303, serie III, 5, 161-164.
- Azpiroz, H.S., P. Vincourt, H. Serieys, A. Gallais*, 1987. La culture *in vitro* des embryons immatures dans l'acceleration du cycle de selection des lignees de tournesol et ses effets morphovegetatifs. – *Helia*, 10, 35-38.
- Dagustu, N., M. Sincik, G. Bayram, M. Bayraktaroglu*, 2010. Regeneration of fertili plants from sunflower (*Helianthus annuus* L.) – immature embryo. – *HELIA*, 33, 52, 95-102.
- Enns, H., D.G. Dornell, W.O. Chubb*, 1970. Sunflower research- a progress report. – In: Proc. of the 4<sup>th</sup> Int. Sunfl. Conf., Memphis, 162-167.
- Kinman, M.L.*, 1970. New development in the USDA and state experiment station sunflower breeding programs. – In: Proc. of the 4<sup>th</sup> Int. Sunfl. Conf., Memphis, 181-184.
- Leclercq, P.*, 1971, La sterile male cytoplasmatique chez le tournesol, *Ann. Amelior Plantes*, 21, 45-54.
- Plotnikov, V. A.*, 1983. Use of method of culturing young embryos for accelerated development of sunflower cytoplasmic male sterility analogues. – *Tsitologiya i Genetica*, 17 (6), 40-43
- Raghavan, V.*, 1977. Applied aspects in embryo culture. – In: Reinert R. & Y.P.S. Bajaj: Applied and fundamental aspects of plant cell and organ culture, 357-397.
- Vranceany, A.V., F. Stoenesco*, 1971. Pollen fertility restorer gene from cultivated sunflower (*H. annuus* L.). – *Euphytica*, 20, 4, 536-541.

Статията е приета на 17.09.2012 г.

Рецензент – доц. д-р Ваня Делибалтова

E-mail: vdelibaltova@abv.bg