

РАСТИТЕЛНИ БИОТЕХНОЛОГИИ И ТЯХНОТО ПРИЛОЖЕНИЕ В ДОБРУДЖАНСКИ ЗЕМЕДЕЛСКИ ИНСТИТУТ

**Миглена Друмева, Юлия Енчева, Иван Белчев,
Нина Ненова, Петър Иванов**

Добруджански земеделски институт, Генерал Тошево

Резюме

Друмева М., Ю. Енчева, И. Белчев, Н. Ненова, П. Иванов, 2006. Растителни биотехнологии и тяхното приложение в Добруджански земеделски институт.

Направен е кратък преглед на приложенията на някои биотехнологични методи в Добруджански земеделски институт. Посочени са основните направления на работа и свързаните с тях научно-приложни разработки. Обобщени са постиженията от изследователската дейност в областта на растителните биотехнологии при пшеница и слънчоглед и тяхното умело комбиниране с методите на конвенционалната селекция, в резултат на което са получени нови линии, сортове и хибриди с висока продуктивност и устойчивост на болести. Илюстрирана е ефективността от взаимодействието между биотехнология и класическа селекция, което е в съответствие със съвременните нужди на аграрния сектор, изискващ по-ефективно, по-бързо, по-адаптивно и по-евтино производство на земеделска продукция.

Ключови думи: Пшеница – Слънчоглед - Антерна култура - Гама-индуциран партеногенез – Ембриокултура – Ембриогенез - Сомаклонално вариране

Abstract

Drumeva M., J. Encheva, I. Belchev, N. Nenova, P. Ivanov, 2006. Plant biotechnologies and their application at Dobroudja Agricultural Institute.

A brief review is presented on the use of some biotechnology methods at Dobroudja Agricultural Institute. The main directions of researchwork and the the related scientific applications are given. The achievements of researchwork in the field of plant biotechnologies in wheat and sunflower are summerized as well as their skillful combining with conventional breeding methods which resulted in the release of new lines, varieties and hybrids with high productivity and disease resistance. The efficiency of the biotechnology-conventional breeding interaction is revealed to meet the modern requirements of agriculture for faster, more flexible and cheaper agricultural production.

Key words: Wheat – Sunflower - Anther culture - Gamma-induced parthenogenesis - Embryo culture – Embryogenesis - Somaclonal variation

УВОД

В нашето съвремие растителните биотехнологии разширяват все повече и повече своя обхват, като естествен резултат от развитието на науката от организмово, към

тъканно, клетъчно, субклетъчно и молекулярно ниво. Днес растителните биотехнологии обхващат елементи от конвенционалната селекция, биоинформатиката, микробиологията, молекулярната генетика, биохимията, растителната физиология и молекулярната биология, и подпомагат създаването на подобрени сортове и семена, и тяхната защита от вредители, болести и неблагоприятни фактори на средата. Съвременните приложения на растителните биотехнологии, които имат аграрно и екологично значение, включват: тъканни култури и микроразмножаване, диагностика на болести при растенията, генетично инженерство, геномика, протеомика, метаболомика, биоинформатика. (Атанасов, 2001)

За пионер на растителните биотехнологии се счита австрийският ботаник Gottlieb Haberlandt. В началото на 20-ти век той установява, че клетките на изолираните тъкани, поставени в изкуствена хранителна среда, могат да се делят и да дават начало на продължително растяща недиференцирана маса, наречена калус. Основата на растителните биотехнологии е изградена върху доказаната способност на растителните клетки да регенерират /възстановяват/ пълноценни растения при определени условия и на подходящи хранителни среди. Успешното култивиране и вторично диференциране на органи и растения от калусни тъкани откриват възможностите за въвеждане в култура *in vitro* на всяка жива тъкан независимо от растителния вид, от който тя произлиза. Способността на растителните клетки да растат при стресови условия *in vitro*, експериментално предизвикани от изследователите, и да предават и проявяват новия признак на равнището на цяло растение и на неговото потомство създава основата за разработване на така наречените методи за клетъчен мутагенез и свързаните с тях соматклонално вариране и селекция. Днес това направление от растителните биотехнологии, известно под общото понятие **тъканни култури**, намира приложение, като разширява възможностите на традиционната селекция за създаване, размножаване и поддържане на растения с ценни стопански качества, за създаване на генетично разнообразие и преодоляване бариерите на несъвместимост. Елемент на тъканните култури са и методите на антерната култура и ембриокултурата.

Антерната култура е метод, състоящ се от култивиране на антери /прашници/ от чийто незрели поленови зърна се формира маса от делящи се клетки /калус/. След прехвърляне на калуса върху регенерационна хранителна среда се развиват хаплоидни растения регенеранти. Постигнатата от Guha and Maheshwari (1964) регенерация при култивиране на антери *in vitro* при татул (*Datura innoxia*) дава тласък в андрогенното производство на хаплоиден калус и растения. Хаплоидията е най-бързият метод за привеждане на растенията в генетично стабилно състояние и получаване на изравнени линии в рамките само на една генерация.

Под **ембриокултура** се разбира отглеждане на изолирани от семепъквата зародиши при *in vitro* условия. Пръв Raghavan (1977) разработва тази методика и разкрива възможностите за нейното приложение при различните растения. Съставът на хранителните среди, използвани за ембриокултивиране, е различен и съобразен с изискванията на съответния растителен вид. Основно приложение методът намира в междувидовата хибридизация, и индуцирания партеногенезис, когато поради дегенериране на ендосперма или спиране развитието на зародиша в ранна фаза, растения не могат да се получат по конвенционалния начин. Методът се използва също за ускоряване на селекционния процес.

Гама-индуцираният партеногенезис се състои в инициране на партеногенетично развитие (развитие без оплождане на яйцеклетката) с помощта на облъчен прашец. За първи път методът е приложен успешно от Raquin (1985) при петуния с използване на дози от 600 Gy до 1000 Gy. Основно предимство на метода на индуцирания партеногенезис с помощта на облъчен прашец е възможността да се получават хаплоидни и дихаплоидни растения при растителни видове, при които *in vitro* андрогенезисът и гиногенезисът не са успешни (Faris et al., 1999; Pandey et al., 1990;

Zhang & Lespinasse, 1991). Използва се за ускорено създаване на хаплоидни и дихаплоидни - генетично стабилни, изравнени линии.

Понятието **сомаклонално вариране** включва измененията, породени в растенията, получени чрез тъканни култури (Larkin & Scowcroft, 1981). Известно е, че процесът на култивиране *in vitro* е до голяма степен мутагенен. Източници на изменчивост на растителните соматични клетки в култура се явяват изходната хетерогенност, нарушения в регулаторния механизъм на интактното растение, влияние на компонентите на средата и спонтанния мутационен процес (Шамина, 1987; Загорска, 1995). Сомаклоналното вариране е описано при голям брой растителни видове, родове и включва основни култури. Методът се прилага за създаване на генетично разнообразие.

Посочените биотехнологични методи са залегнали в изследователската и приложна дейност на Добруджански земеделски институт за създаване на нов изходен селекционен материал и ускоряване на селекционния процес с цел подобряване на сортовия състав на основните за страната земеделски култури - пшеница и слънчоглед, по отношение на добива, екологичната пластичност и качеството на продукцията.

Приложение на биотехнологични методи в Добруджански земеделски институт.

В лабораторията по биотехнология в Добруджански земеделски институт за създаване на дихаплоидни линии при зърнено-житните видове се прилага **антерна култура**. Методът е евтин, лесен за изпълнение и достатъчно ефективен за селекционни цели. Годишно се произвеждат 1000-2000 дихаплоидни линии, главно от обикновена пшеница и тритикале. Получаването на дихаплоидни линии за селекционни цели във всички случаи е свързано с научно-методични разработки и експерименти. Изследвано е влиянието на генетични фактори - генотипна специфика, хибридна генерация, дихаплоидни аналози и техни кръстоски; физични - третиране с ултравиолетова и лазерна светлина, магнитно поле и гама-лъчи; физиологични - различни добавки в индукционната хранителна среда. Разработена е хранителна среда с по-висока ефективност за получаване на зелени регенеранти при голям набор генотипове. Значително са намалени разходите за диплоидизиране на хаплоидните регенеранти при запазена ефективност. В резултат на това е създадена система за масова продукция на зелени регенеранти и дихаплоидни линии (Белчев, 2003). За 15 годишен период в държавно сортоизпитване като кандидат сортове са преминали пет дихаплоидни линии обикновена пшеница (*Triticum aestivum* L.). Сред тях има както продуктивни, така и качествени сортове, а така също и сортове с добра екологична пластичност.

Проследена е и реакцията към антерно култивиране на диви видове от род *Helianthus* и F1 междувидови хибриди на видовете от този род с културния вид *Helianthus annuus* L. Изследвани са видове с различна плоидност и цикъл на развитие. Регенерация е получена само от три вида *Helianthus salicifolius*, образец M-045, *Helianthus smithii*, образец M-008 и от два образца на вида *Helianthus mollis* - образци M-020 и M-034 и от 11 междувидови комбинации. Установено е, че хибридните комбинации са по-отзивчива към антерно култивиране в сравнение с видовете от род *Helianthus*. Плоидното ниво, цикълът на развитие, посоката на кръстосване не оказват влияние върху процеса на регенерация от антери. (Ненова, 2002).

При културния слънчоглед (*Helianthus annuus* L.) приложението на антерната култура, все още е далеч от нивото, което позволява заместване на класическия подход за създаване на генетически стабилни линии. Това налага търсенето на алтернативни възможности в тази насока. В лабораторията по биотехнология се разработва принципно нова схема за ускорено получаване на хомозиготни линии слънчоглед (*Helianthus annuus* L.), която се основава на **гама-индуциран партеногенезис** и съчетава класически генетично-селекционни техники с *in vitro* метод (Todorova et al., 1997). Значимостта на тази разработка се определя от факта, че при слънчогледа липсва практически

приложим метод за съкращаване на времето, необходима за създаване на хомозиготни линии, както и от констатацията, че това е първото изследване в света върху приложимостта на гама-индуциран партеногенезис при слънчогледа.

Чрез морфологични, цитологични и молекулярни проучвания е доказан партеногенетичния произход на растенията, получени при приложение на гама радиационни дози, по-високи от 300 Gy. Проведените анализи показват, че по-голямата част от получените диплоидни растения са продукт на партеногенетична дихаплоидия и методът може да бъде прилаган за директно получаване на генетически стабилни, хомозиготни линии слънчоглед.

Проучена е ефективността на метода в зависимост от генотипа на поленовия източник (Todorova & Ivanov, 1999), силата на радиационното въздействие (Todorova & Ivanov, 2000), генотипа на изходните форми за партеногенетична индукция (Todorova et al., 2004), както и взаимодействието помежду им (Тодорова, 2002).

Изследвана е партеногенетичната индукционна реакция на десет линии слънчоглед (*Helianthus annuus* L.) възстановители на фертилността, използвани като поленови източници и е предложена алтернатива за преодоляване на тясната генотипна реакция на отделния поленов източник чрез въвеждане на смесения прашец. Излъчени са поленови източници, инициращи партеногенетично развитие с относително висока ефективност. Установено е, че смесеният прашец се отличава с висок партеногенетичен индукционен потенциал, надхвърлящ в много от случаите възможностите на отделния поленов източник.

Установени са оптималните радиационни дози, които подтискат оплодителната способност на прашеца, но запазват стимулиращото му въздействие върху ембриосака на слънчогледа.

В резултат на проучване на партеногенетичната реакция на линии и хибриди от *Helianthus annuus* L., използвани като изходен "майчин" материал за партеногенетична индукция, е установено, че средната партеногенетична отзивчивост на хибридите е значително по-висока от тази на линиите.

В резултат на направените проучвания е разработена оригинална схема за получаване на дихаплоидни линии при слънчогледа, основаваща се на гама-индуциран партеногенезис. Успоредно с това са създадени и дихаплоидни линии възстановители на фертилността с потенциално стопанско значение, част от които са включени в хибридизационни програми (Тодорова, 2002).

Основно предимство на метода на индуцирания партеногенезис, при който се съчетават традиционни селекционни подходи с *in vitro* манипулации, е възможността да се получат и отберат линии със стопанско значение в рамките на 2 години. Качествата на дихаплоидните линии се определят от генетичния потенциал на изходния материал, от който са получени.

Методът се прилага вече рутинно в ДЗИ за ускорено създаване на дихаплоидни линии възстановители на фертилността, устойчиви на икономически важни болести при слънчогледа, като мана (*Plasmopara helianthi* Novot.) раса 700, синя китка (*Orobanche cumana* Wallr. - раси АЧЕ) и фомопсис (*Phomopsis helianthi* Munt.-Cvet. et al.).

Създадени са хибриди с участието на дихаплоидни линии възстановители на фертилността, които показват добри стопански качества при тригодишно изпитване в Добруджанския земеделски институт. При конкурсно сортово изпитване в ДЗИ през 2004 г. е излъчен хибрид "2607 А x 99 389/1 Phs" превишаващ средния стандарт по добив семе и добив масло във всички участъци.

Хибриди "Доброцвет" и "Биоцвет", създадени с участието на дихаплоидни линии, получени по метода на гама-индуцирания партеногенезис, са признати от ИАСАС през 2005 година. Устойчиви са на мана (*Plasmopara helianthi* Novot.) раса 700, а хибрид Доброцвет е устойчив и на синя китка (*Orobanche cumana* Wallr. - раси АЧЕ).

Освен за ускоряване на селекционния процес в Добруджански земеделски институт

методът на **ембриокulturата** е използван в комбинация с индуцирания мутагенез / гама облъчване и ултра звук (Encheva et al., 2003, 2004). Целта на това комбинирано използване е разширяване на формообразователния процес. При съчетаното използване на метода ембриокultura с гама облъчване или ултра звук при незрели слънчогледови зиготни зародиши от поликросни популации с известен генетичен състав са получени голям брой нови линии възстановители на фертилността, притежаващи ценни стопански качества, както и устойчивост към болестите - синя китка и мана раса 700. При комбинираното използване на тези два метода са получени и голям брой нови (В) линии с нормална цитоплазма. Част от новополучените линии са включени в хетерозисната селекция (Енчева и др., 2004, Encheva et al., 2004).

Хибрид **“Яна”** е създаден с участие на линия, получена чрез метод ембриокultura в комбинация с ултра звук при незрели слънчогледови зиготни зародиши от поликросни популации. При едногодишното изпитване на хибрида в ИАСАС е установен добив семе спрямо средния стандарт за страната 107.2 %. Хибрид Яна е устойчив на мана раса 700, фома, фомопсис и 100 % на паразита синя китка (Encheva et al., 2003.)

Хибрид **“Рада”** е създаден с участие на линия, получена чрез метод ембриокultura в комбинация с гама облъчване /8 Gy/ при незрели слънчогледови зиготни зародиши от поликросни популации. При тригодишно изпитване на хибрида в ИАСАС е установен добив семе спрямо средния стандарт за страната 104.0 %. Хибрид **“Рада”** е устойчив на мана раса 700 и 100 % на паразита синя китка. През 2005 г. хибрид **“Рада”** е признат и включен в сортовата листа на България от Експертната комисия по сортове маслодайни култури (Encheva et al., 2003).

През 2000 година хибрид **“Рада”** е изпитан на територията на Южна Франция от фирмата Rustica Prograin Genetique и е показал добив семе 103.0 % спрямо средния стандарт за страната.

Други пет хибрида са изследвани на територията на Южна Франция от фирмата Rustica Prograin Genetique през 1998 и 2000 - та година и са показали добив семе спрямо среден стандарт за страната в рамките от 100.0 % до 106.0 %.

В Добруджански земеделски институт е проведено и детайлно изследване върху **сомаклоналното вариране** при слънчогледа. С помощта на метода на индиректен органогенез и соматичен ембриогенез са получени линии възстановители на фертилността с ценни стопански качества, които показват много добра комбинативна способност при двугодишното тестиране (Encheva, 2004).

Проучванията върху линии, получени чрез методите на директен органогенез и соматичен ембриогенез от незрял зиготен зародиш слънчоглед показват, че те могат да бъдат успешно използвани за индуциране на генетично разнообразие. Получените линии са с променена архитектурата и форма на семената, както и ценни стопански качества като по-висок процент масленост, по-голяма маса на 1000 семена, по-голям процент ядка, което позволява да бъдат включени директно в селекционнно-подобрителната програма при слънчогледа.

Проведените цитологични изследвания в Института по Ботаника - гр. Пекин, Китай потвърждават, органогенетичния път на формиране на получените регенеранти, което определя и едноклетъчния им произход.

Хибрид **“Юлия”** създаден с участие на линия, получена чрез метода на директен органогенез и соматичен ембриогенез е показал добив семе 118.3 % и добив масло 116.9 % в сравнение със среден стандарт (хибриди **“Албена”** и **“Супер Старт”**). При едногодишното изпитване на хибрида в ИАСАС е установен добив семе 100.2 % спрямо средния стандарт за страната. Хибрида е устойчив на мана раса 700 и е сухоустойчив (Encheva et al., 2003).

В лабораторията по биотехнология към Добруджански земеделски институт е приложено и комбинирано използване на директен органогенез с индуциран мутагенез при незрял зародиш слънчоглед. При сравнение генетичните изменения, получени чрез

сомаклонално вариране и чрез *in vitro* индуциран мутагенез е констатирано, че варирането при някои генотипи възниква с по-голяма честота при соматклоновете, но качествено и двата подхода показват подобен спектър на морфологични и биохимични варианти (Encheva et al., 2002).

За първи път е приложен метода на директния органогенез при незрели хибридни зародиши от междувидовите кръстоски *H. annuus* x *H. tuberosus*, *H. annuus* x *H. salicifolius* и междуродовата кръстоска *H. annuus* x *Verbisina helianthoides*. Ценността на метода на директен органогенез се потвърждава и от това, че той дава възможност за получаване на голям брой растения от един хибриден зародиш /в нашия случай до осем/, което е изключено при масово използваната техника на "embryo rescue" или конвенционалния метод, при който се получава само едно хибридно растение (Encheva et al., 2005).

Получени са голям брой нови линии възстановители на фертилността с ценни стопански качества и устойчивост на болести от следните кръстоски: *H. annuus* x *H. tuberosus*, *H. annuus* x *H. salicifolius* и *H. annuus* x *Verbisina helianthoides*.

Перспективи

С помощта на посочените биотехнологични методи се получава двоен ефект за селекционния процес. От една страна се създава генетично разнообразен изходен материал, а от друга методите позволяват съществено съкращаване на процеса.

Създаването на генетична вариабилност чрез тъканни култури и в бъдеще ще намира приложение в селекционните програми, защото реализацията на геномни и хромозомни изменения в цели растения, а така също наследяемостта им в следващите генерации са добра изходна база за създаване на нови линии, сортове и хибриди. Нормалният селекционен процес обикновено включва огромен брой цели растения, пространство и труд. Силата на "in vitro" техниката е, че тя осигурява един нормален процес на формиране на мутации и селекция за кратко време и в малко пространство. Селекцията в тъканни култури предлага бързо и икономично изолиране на специфични мутанти с възможна стопанска полза. Милиони потенциални растения могат да бъдат отгледани в единична колба, в която се явяват мутантни фенотипи.

Един от проблемите на съвременното земеделие са различните болести по икономически важни за страната култури. Те могат да доведат до намаляване и дори унищожаване на реколтата от пшеница и слънчоглед. Появата на нови по-вирулентни форми, които преодоляват създадената вече устойчивост при материалите, използвани в търговските сортове и хибриди изисква бързо създаване на линии, устойчиви на новите раси. За адекватна реакция срещу болестите, приложение ще намират биотехнологичните методи, позволяващи в съкратен срок да се получат хомозиготни линии от изходен материал, чиято генплазма носи устойчивост към новите форми на патогените.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комбинирането на традиционните селекционни методи със съвременните биотехнологични постижения, е залог за интензификация и разширяване на възможностите на селекцията при основни за страната земеделски култури. Илюстрация на този процес са постиженията в Добруджански земеделски институт при пшеницата и слънчогледа.

ЛИТЕРАТУРА

Атанасов, А., 2001. Биотехнологиите на XXI век. Периодичен бюлетин. Diagnosis press, София, България, 8 pp.

- Белчев, И., 2003.** Изследвания върху антерна култура от зимна обикновена пшеница (*Triticum aestivum* L.) и приложение на дихаплоидни линии в селекцията. Дисертация за присъждане на образователната и научна степен “Доктор”, 193 стр.
- Енчева, Ю., М. Христов и П. Иванов, 2004.** Нови линии слънчоглед, създадени чрез комбинирано използване на метод поликрос, индуциран мутагенез и метод Ембриокултура. Научна конференция, Аграрни науки-Растениевъдство, 3-5 юни, Стара Загора, България, Том II, 254-259.
- Загорска, Н. А., 1995.** Индуциран андрогенез и соматонално вариране при икономически ценни растителни видове. Дисертация. София. 280 стр.
- Ненова, Н., 2002.** Съчетаване методите на междувидовата хибридизация с *in vitro* техники за обогатяване генома на културния слънчоглед (*Helianthus annuus* L.). Дисертация за присъждане на образователната и научна степен “Доктор”, 179 стр.
- Тодорова, М., 2002.** Проучване и приложение на гама-индуцирания партеногенезис като метод за ускоряване на селекционния процес при слънчогледа (*Helianthus annuus* L.). Дисертация за присъждане на образователната и научна степен “Доктор”, 139 стр.
- Шамина, Е. Б., 1987.** Особенности генетической изменчивости соматических клеток растений. Биотехнология 3: 361-365.
- Encheva, J., and M. Christov, 2005.** Intergeneric hybrids between cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) and *Verbesina helianthoides* (genus *Verbesina*)- Morphological and Biochemical aspects. Helia, 28, No. 42, 27-36.
- Encheva, J., M. Christov, N. Nenov, F.Tsvetkova, P.Ivanov, P.Shindrova, and V.Encheva, 2003.** Developing genetic variability in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by combined use of hybridization with gamma radiation or ultrasound. Helia 26, No. 38, 99-108.
- Encheva, J., M.Christov, N.Nenov, P.Ivanov, and V.Encheva, 2003.** Genetic variability of sunflower (*Helianthus annuus* L.) created by combination of polycross hybridization and ultrasonic or gamma irradiation. BJAS 9(3): 321-327.
- Encheva, J., M.Christov, and P. Ivanov, 2004.** Developing of B lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by combined use of polycross method with ultra sound and embryo culture method, BJAS 10(3): 281-290.
- Encheva, J., M.Christov, M.Todorova, P.Shindrova, and V.Encheva, 2004.** New sunflower restorer lines, developed by direct organogenesis method from intergeneric cross *Helianthus annuus* (cv. Albena) x *Verbesina helianthoides* (genus *Verbesina*)-disease resistance, combining ability. BJAS 10(4): 417-422.
- Encheva, J., N.Nenov, M.Christov, F.Tsvetkova, P.Shindrova, V.Encheva, and , P.Ivanov, 2004.** Two new fertility restorers of sunflower (*Helianthus annuus* L.) created by combined use of interlinear hybridization, gamma irradiation and embryo culture method. Растениевъдни науки 41(2): 112-118.
- Encheva, J., F.Tsvetkova, and P.Ivanov, 2002.** Creating genetic variability in sunflower through the direct organogenesis method, independently and in combination with gamma irradiation, Helia 25(37): 85-92.
- Faris, N.M., V. Nikolova, and K.Niemirowicz-Szczytt, 1999.** The effect of gamma irradiation dose on cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo production. Acta Physiologiae Plantarum 21(4): 301-396.
- Guha, S. and S.C.Maheshwari, 1964:** *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature 204: 497.
- Larkin, P.J. and W.R.Scowcroft,, 1981.** Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60: 197-214.
- Pandey, K.K., L. Przywara, and P.M.Sanders, 1990.** Induced parthenogenesis in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) through the use of lethally irradiated pollen. Euphytica 51: 1-9.

- 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.
- Raquin, C., 1985.** Induction of haploid plants by in vitro culture of *Petunia ovaries* pollinated with irradiated pollen. Z. Pflanzenzucht 94: 166-169.
- Todorova, M. and P. Ivanov, 1999.** Induced parthenogenesis in sunflower: Effect of pollen donor. Helia, 22(31) 49-56.
- Todorova, M. and P.Ivanov, 2000.** Induced parthenogenesis in sunflower: Effect of gamma irradiation doses. 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, June, 2000, L46-L51.
- Todorova, M., P.Ivanov, N.Nenova, and J.Encheva, 2004.** Effect of mother genotype on the efficiency of g-induced parthenogenesis in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Helia 27(41): 67-74.
- Todorova, M., P.Ivanov, P.Shindrova, M.Christov and I. Ivanova, 1997.** Dihaploid plant production of sunflower (*Helianthus annuus* L.) through irradiated pollen-induced parthenogenesis. Euphytica 97: 249-254.
- Zhang, J.X. and J.Lespinase, 1991.** Pollination with gamma - irradiated pollen and development of fruits, seeds and parthenogenetic plants in apple. Euphytica 54: 101-109.