

**КОМБИНИРАНО ПРИЛАГАНЕ НА БИОТЕХНОЛОГИЧНИ  
И КЛАСИЧЕСКИ СЕЛЕКЦИОННИ ПОДХОДИ  
ЗА СЪЗДАВАНЕ НА ЛИНИИ СЛЪНЧОГЛЕД (*HELIANTHUS ANNUUS L.*),  
УСТОЙЧИВИ НА ИКОНОМИЧЕСКИ ВАЖНИ БОЛЕСТИ**

**Миглена Друмева, Пепа Шиндрова, Валентина Енчева, Михаил Христов**  
Добруджански земеделски институт, Генерал Тошево

**Резюме**

*Друмева, М., П.Шиндрова, В. Енчева, М.Христов, 2004. Комбинирано прилагане на биотехнологични и класически селекционни подходи за създаване на линии слънчоглед (*Helianthus annuus L.*), устойчиви на икономически важни болести.*

Приложен е методът на гама-индуцирания партеногенезис за създаване на линии-възстановители на фертилността, устойчиви на икономически важни болести при слънчогледа (*Helianthus annuus L.*). Като изходен материал са използвани 5 хибрида, създадени в Добруджански земеделски институт, Генерал Тошево. Хиbridите се отличават с устойчивост на мана раса 700 (*Plasmopara helianthi* Novot.), синя китка (*Orobanche cumana* Wallr.), фома (*Phoma macdonaldii* Boerema / *Phoma oleracea* var. *helianthi-tuberosi* Sacc) и фомопсис (*Phomopsis helianthi* Munt.-Cvet. et al.). За иницииране на партеногенетично развитие е приложен смесен прашец от поленови източници Rf 673, 147 R и Z-8-A. За инактивиране на прашеца е приложена доза 600 Gy.

Получени са общо 289 незрели зародиша, от които се развиват 259 млади растения, 149 от които са фертилни. От размножените растения 90 потомства показват устойчивост към посочените болести. От тях са излъчени 46 дихаплоидни линии, отличаващи се с много добра морфологична изравненост, с разклоненост на стъблото, с пълна устойчивост на мана раса 700 и/или синя китка, фома и/или фомопсис.

**Ключови думи:** Слънчоглед, Гама-индуциран партеногенезис, Ембриокултура, Дихаплоидни линии, Устойчивост на болести

**Abstract**

*Drumeva, M., P. Shindrova, V. Encheva, M. Christov, 2004. Combinet use of biotechnology and classical breeding methods for development of sunflower lines (*Helianthus annuus L.*) resistant to economically important diseases.*

The method of gamma-induced parthenogenesis was used to develop fertility restorer lines resistant to economically important diseases on sunflower (*Helianthus annuus L.*). Five hybrids developed at Dobroudga Agricultural Institute - General Toshevo

were used as initial material. The hybrids possessed resistance to downy mildew race 700 (*Plasmopara helianthi* Novot.), broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.), phoma (*Phoma macdonaldii* Boerema / *Phoma oleracea* var. *helianthi-tuberosi* Sacc.) and phomopsis (*Phomopsis helianthi* Munt. - Cvet. et al.).

Mixed pollen from pollen sources Rf 673, 147 R and Z-8-A was used to initiate parthenogenetic development. A dose of 600 Gy was applied for pollen inactivation.

A total of 289 immature embryos were obtained, 259 of which developed into young plants, 149 of them fertile. Ninety numbers of the obtained plants showed resistance to the above diseases. Out of these, 46 double haploid lines with very good morphologic uniformity, branched stems and complete resistance to downy mildew race 700 and/or broomrape, phoma and/or phomopsis were selected.

**Key words:** Sunflower, Gamma-induced parthenogenesis, Embryo culture, Double haploid lines, Disease resistance.

## **УВОД**

Сънчогледът (*Helianthus annuus* L.) е важен източник на растително масло в света и основна маслодайна култура за България.

Ограничаващ фактор за сънчогледовото производство се явяват различни болести, като мана (*Plasmopara helianthi*), синя китка (*Orobanche cumana*), фома (*Phoma macdonaldii*), фомопсис (*Phomopsis helianthi*) и др. Всяка една от тези болести може съществено да ограничи продуктивността на сънчогледа. Появата на нови, по-вирулентни раси, които преодоляват създадената вече устойчивост, изисква бързо създаване на линии, устойчиви на новите раси. Класическият селекционен подход за създаване на линии, които могат да участват като родителски компоненти на хибридните сортове, се състои в принудително самоопрашване (инцутиране) на растенията в продължение на най-малко 5-6 години. Това е продължителен период, в рамките на който вероятността да се появят нови, още по-вирулентни раси на различните патогени, е съвсем реална. За да може да се реагира адекватно срещу болестите е необходимо да се използват методи, позволяващи в съкратен срок да се получат хомозиготни линии от изходен материал, чиято генплазма носи устойчивост към новите форми на патогените.

Един от методите за ускорено създаване на самоопрашени линии сънчоглед е методът на гама-индуцирания партеногенезис (Todorova et al., 1997; Todorova & Ivanov, 1999, 2000). Чрез този метод съществено се съкраща периодът, необходим за създаване на родителски линии за хетерозисната селекция при сънчогледа. Качествата на дихаплоидните линии, получени при прилагане на метода, се определят от генетичния потенциал на изходния материал, от който са получени.

Настоящото изследване илюстрира възможностите на гама-индуцирания партеногенезис за ускорено получаване на хомозиготни линии, устойчиви на икономически важни болести при сънчогледа.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ**

Изходният материал, от който са изолирани незрелите партеногенетични зародиши, включва 5 хибрида, които са създадени в Добруджански земеделски институт (ДЗИ) - Генерал Тошево. Това са хибридите X1 - HB0107; X2 - MX-2-11543; X3 - MX-98-11542; X4 - MX-2-1159 и X5 - MX-2-11541. Те се отличават с

**Комбинирано прилагане на биотехнологични и класически селекционни подходи за създаване на линии слънчоглед (*Helianthus annuus* L.), устойчиви на икономически важни болести**

---

устойчивост на мана раса 700 (*Plasmopara helianthi* Novot.), синя китка (*Orobanche cumana* Wallr.), фома (*Phoma macdonaldii* Boerema / *Phoma oleracea* var. *helianthi-tuberosi* Sacc) и фомопсис (*Phomopsis helianthi* Munt.-Cvet. et al.). Единствено X1 не е устойчив на фомопсис. При всички хибриди носител на гените за устойчивост на мана раса 700 е майчината родителска линия, а на гените за устойчивост на синя китка - бащината родителска линия.

Като поленови източници са използвани три линии-възстановители на фертилността - Rf 673, 147 R и Z-8-A. Прашецът, събран от тези линии, е смесен в равни тегловни части и след гама-облъчване е използван за опрашване на майчините растения.

Прашецът е облъчен с доза 600 Gy, като източник на йонизиращото лъчение е използван Cs 137.

За стерилизиране на мъжкия гаметофит, изходните растения от хибридите са третирани с воден разтвор на гиберилинова киселина ( $GA_3$ ) в концентрация 45 mg/l. Разтворът е приложен директно върху формиращата се цветна пъпка /1 - 1,5 см в диаметър/ и връхния ред листа. Третирането е извършено двукратно през 2 дни. За да се избегне чуждо опрашване, непосредствено преди началото на цъфтежа, растенията са изолирани.

Опрашени са по 10 растения от хибрид, при които е установено, че химичната кастрация е резултатна и няма следи от собствения прашец на растението.

Изолирането и култивирането на получените зародиши е извършено по методиката на Azpíroz et al. (1988). Формираните млади партеногенетични растения (П1) са прехвърлени в почва и са стабилизирани при температура  $20^{\circ}\text{C}/15^{\circ}\text{C}$  ден/нощ, относителна влажност 70% и фотопериод 16/8 h ден/нощ в продължение на 30 дни, след което дневната температура е повишена до  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , а нощната - до  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . При тези условия растенията са отгледани до зрялост.

Партеногенетичното потомство (П2) е размножено при полски условия и е направена морфологична и фитопатологична оценка. Устойчивостта на получените дихаплоидни линии към мана, фома, фомопсис и паразита синя китка е проучена в лабораторията по фитопатология на слънчогледа при оранжерийни условия и на полски инфекциозен участък към Добруджански земеделски институт. Използвани са следните методи на оценка:

Заразяването на селекционните материали с мана (*Plasmopara helianthi* Novot.) е извършено в оранжерия по стандартна методика (Vear, F. & Tourvieille, D., 1987). Оценката за устойчивост е извършена по скала от 0% до 100%.

Оценката за устойчивост на фома (*Phoma macdonaldii* Boerema / *Phoma oleracea* var. *helianthi-tuberosi* Sacc) е извършена при полски условия в инфекциозен участък. Инокулацията е направена във фаза "бутонизация - начало на цъфтеж" по метода на Fayzalla & Maric (1981). Нападението на проучвания растителен материал от патогена е отчетено по четиристепенна скала от 0 до 3 (0 - устойчив; 1 - средно устойчив; 2 - средно чувствителен; 3 - чувствителен).

Оценката за устойчивост към фомопсис (*Phomopsis helianthi* Munt.-Cvet. et al.) е направена в инфекциозен участък. При заразяване на материалите е използван методът на Encheva and Kiryakov (2000). Нападението от патогена е отчетено по петстепенна скала от 0 до 4 (0 - имунен; 1 - високо устойчив; 2 - средно устойчив; 3 - средно чувствителен; 4 - чувствителен).

Оценката за устойчивост към синя китка (*Orobanche cumana* Wallr.) е извършена при оранжерийни условия, като е използвана скала от 0% до 100%.

Материалите са заразени по стандартна методика (Панченко, 1975).

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

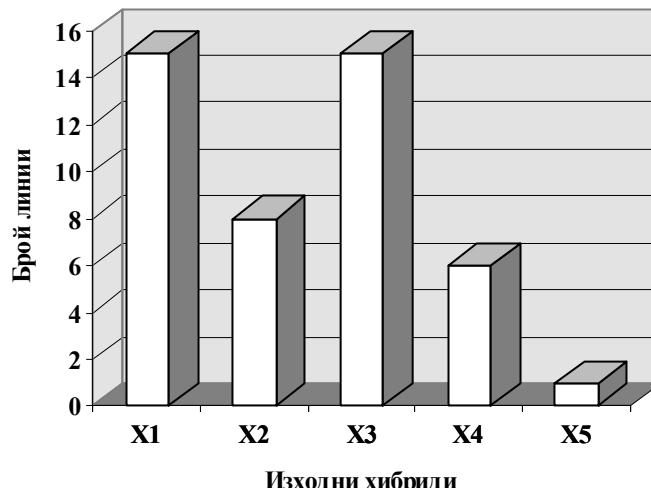
От 5-те хибрида са получени общо 289 незрели зародиши, от които се развиват 259 млади растения (П1) (таблица 1). От тях 149 са фертилни и тяхното потомство е размножено при полски условия.

**Таблица 1.** Брой получени зародиши и растения от *Helianthus annuus L.* по метода на  $\gamma$ -индукция партеногенезис.

Показатели	Изходни "майчини" хибриди					
	X1	X2	X3	X4	X5	$\Sigma$
Заложени зародиши	65	38	103	45	38	289
Млади растения	56	36	89	43	35	259
Стерилни растения	18	15	40	17	20	110
Фертилни растения	38	21	49	26	15	149

Най-добра партеногенетична реакция, изразена в брой формирани зародиши и растения, проявява хибрид X3, следван от хибрид X1. Най-ниска партеногенетична отзивчивост е отчетена при хибрид X5, където общият брой получени фертилни растения е 15 (таблица 1).

От размножените растения 90 номера са устойчиви към посочените болести. От тях са отбрани 46 дихаплоидни линии, отличаващи се с много добра морфологична изравненост, с разклоненост на стъблото, с пълна устойчивост на мана 700 или синя китка (100% по посочените скали), както и с устойчивост на фома (0 - 1/3) и/или фомопсис (0 - 1) (фигура 1).



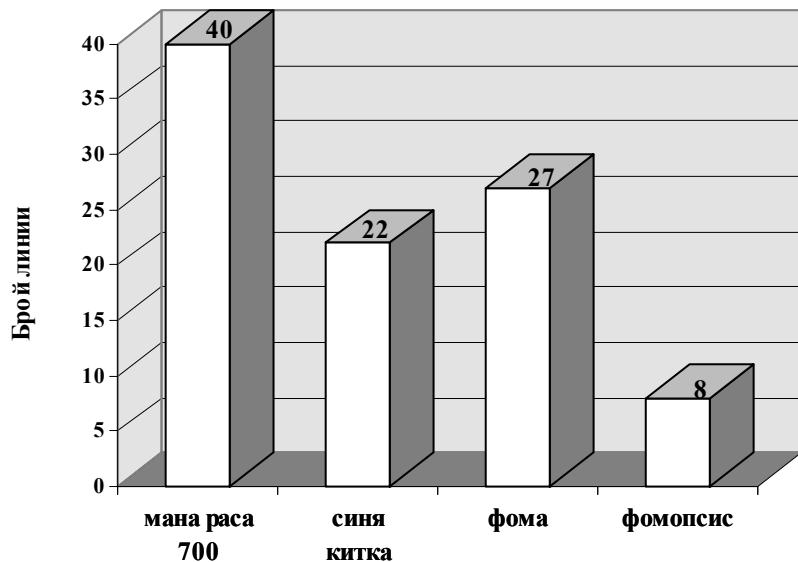
**Фиг. 1.** Хибриди и излъчените от тях дихаплоидни линии, устойчиви на икономически важни болести по слънчогледа (*Helianthus annuus L.*)

Най-голям брой устойчиви линии са излъчени от хибриди X1 и X3. Относително най-ниско е участието на X5 в общия брой излъчени линии, вероятна причина за което е по-слабата отзивчивост на този хибрид към партеногенетична индукция.

От всички отбрани линии 40 са носители на гени за устойчивост на мана раса

**Комбинирано прилагане на биотехнологични и класически селекционни подходи за създаване на линии слънчоглед (*Helianthus annuus* L.), устойчиви на икономически важни болести**

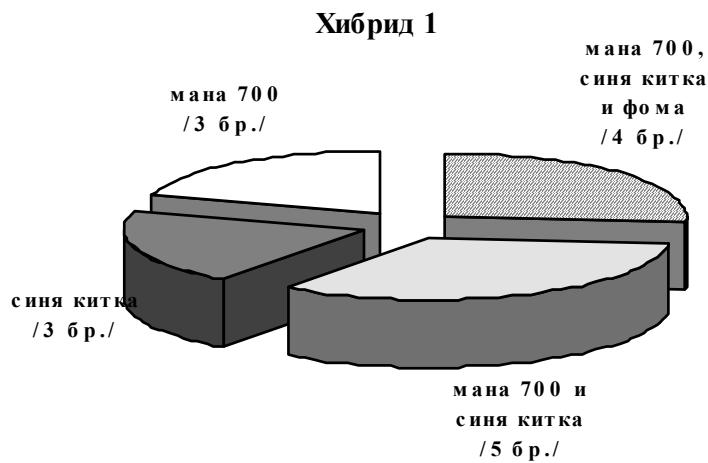
700, 22 от линиите показват устойчивост на синя китка, 27 - на фома и 8 - на фомопсис (фигура 2).



**Фиг. 2.** Устойчивост към проучваните болести при слънчогледа, проявена в изльчените партеногенетични дихаплоидни линии

Вижда се, че най-голям е броят на линиите, устойчиви на мана, което може да се обясни с доминантното унаследяване на устойчивостта към този патоген.

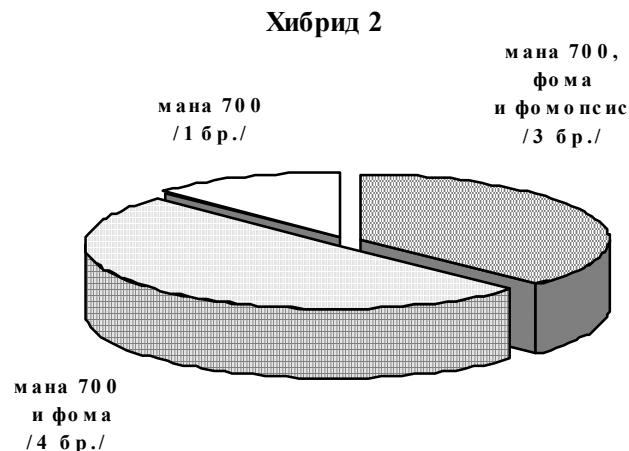
Особено ценни са линиите, които проявяват комплексна устойчивост към посочените болести. Във фигури 3 - 6 е посочен броят на отбраните линии, устойчиви на една или повече от проучваните болести, и техния произход.



**Фиг. 3.** Групиране на дихаплоидните линии, изльчени от хибрид 1 според устойчивостта им към проучваните болести

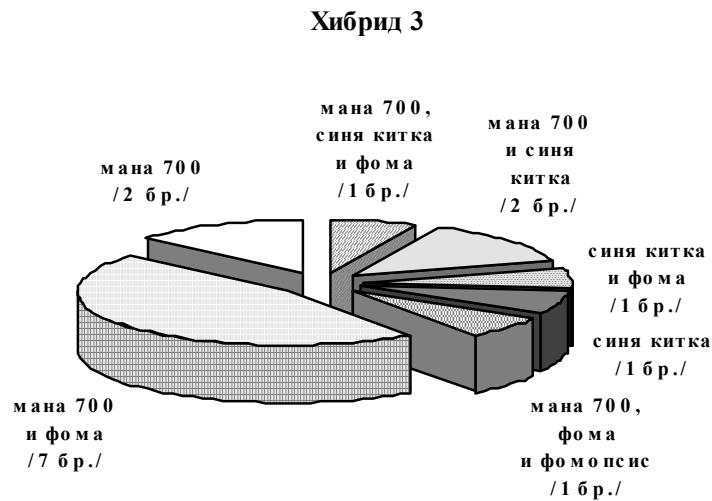
От хибрид 1 са получени линии, устойчиви на мана раса 700; линии, устойчиви на синя китка; линии с комбинирана устойчивост на мана 700 и синя китка, както и линии, проявляващи устойчивост към мана 700, синя китка и фома (фигура 3). Най-голям е броят на линиите, показали комбинирана устойчивост към мана 700 и синя китка.

Тъй като хибрид 1 не е устойчив на фомопсис, линиите, получени от него по метода на гама-индуцирания партеногенезис, проявяват устойчивост само към останалите три проучвани болести.



**Фиг. 4.** Групиране на дихаплоидните линии, изльчени от хибрид 2 според устойчивостта им към проучваните болести

От хибрид 2 са получени линии с комплексна устойчивост към мана 700, фома и фомопсис; линии с гени за устойчивост към мана 700 и фома, и линия, устойчива на мана 700 (фигура 4). Най-висок е броят на линиите с комплексна устойчивост към трите болести.

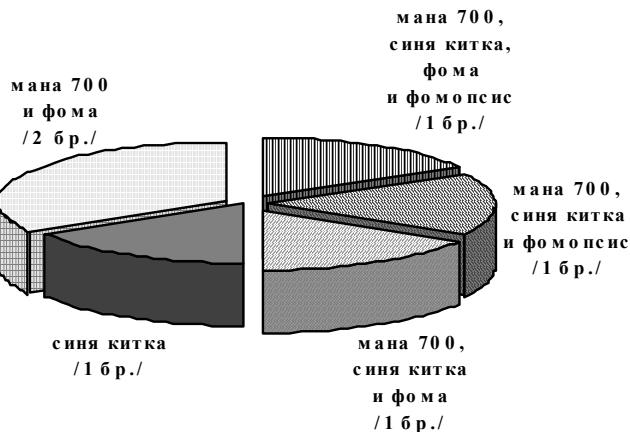


**Фиг. 5.** Групиране на дихаплоидните линии, изльчени от хибрид 3 според устойчивостта им към проучваните болести

## **Комбинирано прилагане на биотехнологични и класически селекционни подходи за създаване на линии слънчоглед (*Helianthus annuus* L.), устойчиви на икономически важни болести**

При линиите, изльчени от хибрид 3, се установява най-голямо разнообразие по отношение на комплексната устойчивост (фигура 5). Получени са 5 комбинации на устойчивост към проучваните болести. Най-голям брой линии са показали устойчивост към мана раса 700 и фома.

### **Хибрид 4**



**Фиг. 6.** Групиране на дихаплоидните линии, изльчени от хибрид 4 според устойчивостта им към проучваните болести

От хибрид 4 е изльчена линия, която е показвала комплексна устойчивост към всички проучвани болести - мана 700, синя китка, фома и фомописис (фигура 6).

От хибрид 5 е изльчена една линия, устойчива на мана 700, фома и фомописис.

Като обобщение на получените резултати може да се посочи, че за 2 години са получени 46 дихаплоидни линии, възстановители на фертилността, устойчиви на икономически важни болести по слънчогледа. Най-голям брой линии са изльчени от хибриди X3 и X1, като при линиите, изльчени от X3, се наблюдава и най-голямо разнообразие по отношение на комбинираната устойчивост. Получена е линия от X4, която проявява устойчивост към всички проучвани болести: мана раса 700, синя китка, фома и фомописис.

Факторът, който ограничава универсалността на метода на гама-индуцирания партеногенезис, е партеногенетичната отзивчивост на изходните хибриди. В настоящото изследване ниската отзивчивост при хибрид X5 води до съществено занижаване на броя получени зародиши и растения. Предимство на метода е възможността за сравнително кратък период да се създаде изходен материал с необходимите стопански качества за хетерозисната селекция на слънчогледа.

### **ИЗВОДИ**

1. Методът на гама-индуцирания партеногенезис дава възможност да се получат линии слънчоглед, съчетаващи устойчивостта на родителските линии на изходните хибриди, в рамките на 2 години.
2. Ограничаващ фактор по отношение на броя получени линии се явява партеногенетичната отзивчивост на изходния хибриден материал.

## **ЛИТЕРАТУРА**

- Панченко, А.Я., 1975.** Вестник сельскохозяйственной науки №2.
- Azpiroz, H.S., Vincourt, P., Serieys, H. and Gallais, A.,1988.** 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.
- Encheva, V. and Kiryakov, I., 2000.** A method for evaluation of sunflower resistance to *Diaporthe/Phomopsis helianthi* Munt. - Cvet et al. BJAS, 8, 219 - 222.
- Fayzalla, E.S. and Maric, A., 1981.** Prilog proucavanju biologije I epodemijologije *Phoma macdonaldii* Boerema pouzrocovaca crne pegavosti suncokreta. - Zastita bilja, Vol. 32 (1), 155, 13-27.
- Todorova, M. and P. Ivanov, 1999.** Induced parthenogenesis in sunflower: Effect of pollen donor. Helia, 22, Nr.31, 49-56.
- Todorova, M. and Ivanov, P., 2000.** Induced parthenogenesis in sunflower: Effect of gamma irradiation doses. 15<sup>th</sup> Int. Sunfl. Conf., Toulouse, France, June, 2000, L46-L51.
- Todorova, M., Ivanov P., Shindrova P., Christov M. and I. Ivanova, 1997.** Dihaploid plant production of sunflower (*Helianthus annuus* L.) through irradiated pollen-induced parthenogenesis. Euphytica 97, 249-254.
- Vear, F. and Tourvieille, D., 1987.** Test de resistance au *Mildiou chez le tournesol*. CETIOM. Information techniques, 98, 19-20.