

ВНЕДРЯВАНЕ НА *IN VITRO*-МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕ
НА ХАПЛОИДНИ РАСТЕНИЯ ОТ КРЪМНО ЦВЕКЛО
(*BETA VULGARIS L. VAR. CRASSA*)
I. ПОЛУЧАВАНЕ НА ПРОРАСТЪЦИ ОТ ИЗОЛИРАНИ
НЕОПЛОДЕНИ СЕМЕПЪПКИ ОТ КРЪМНО ЦВЕКЛО

Йорданка Славова, Мария Касчиева
Земеделски институт, Шумен

Резюме

Славова, Й., М.Касчиева, 2004. Внедряване *in vitro* метод за получаване на хаплоидни растения от крѐмно цвекло (*Beta vulgaris L. var. Crassa*) I. Получаване на прорастъци от изолирани неоплодени семепъпки от крѐмно цвекло.

In vitro-метод за получаване на хаплоидни растения от изолирани, неоплодени семепъпки при захарното цвекло (Славова, 1988) успешно е внедрен при крѐмното (*Beta vulgaris L. var. Crassa*). В настоящата работа са докладвани резултатите от първия етап – получаване на прорастъци от култивираните семепъпки. От 20 отделни генотипа са изолирани 5060 броя семепъпки, от които за 600 (11.9 %) е установено развитие на прорастъци. Прорастване е наблюдавано за семепъпките от всички генотипове, като варирането е от 3.9 ± 1.3 % за едносеменния генотип SG_{g} , 2х до 45.4 ± 4.4 % за многосеменния диплоид SF_2 (O x S_{21}) G. Проследено е влиянието както на генотипа, така и на хранителната среда, върху този процес. За произход SF_2 (O x S_{21}) 2х, ММ е наблюдавано най-масовото прорастване (71.1 ± 6.7 %) под въздействието на 1.0 mg/l ТДЗ (тидiazурон) и 0.5 mg/l АНОК (α -нафтил оцетна киселина) в използваната хранителна среда.

Ключови думи: Крѐмно цвекло, Хаплоидни растения, *In vitro*-метод, Хранителна среда, Изолирани неоплодени семепъпки.

Abstract

Slavova, Y., M.Kaschieva, 2004. Introduction of an *in vitro* method for production of haploid fodder beet plants (*Beta vulgaris L. Var. Crassa*) I. Obtaining shoots of isolated unpollinated fodder beet ovules.

In vitro method for producing haploid plants from isolated unpollinated sugar beet ovules (Slavova, 1988) has been successfully introduced into fodder beet (*Beta vulgaris L. var. Crassa*). The results of first stage – production of shoots from cultivated ovules – are reported in the present paper. 5060 ovules were isolated from 20 different genotypes and 600 (11.9 %) out of them were observed to develop shoots. Sprouting has been observed in ovules of all genotypes, with variation ranging from

Внедряване *in vitro* метод за получаване на хаплоидни растения от кърмно цвекло (*Beta vulgaris* L. var. *Crassa*) I. Получаване на прорастъци от изолирани неоплодени семепъпки от кърмно цвекло

3.9 ± 1.3 % for the monogerm genotype SG_g, 2x to 45.4 ± 4.4 % for the polygerm diploid SF₂ (O x S₂₁) G. The effects of the genotype and the medium on this process was studied as well. The highest percentage of sprouting (71.1 ± 6.7 %) in the origin SF₂ (O x S₂₁) 2x, MM was observed under the influence of 1.0 mg/l TDZ (thidiazuron) and 0.5 mg/l NAA (α-naphthylacetic acid) in culture medium.

Key words: Fodder beet, Haploid plants, *In vitro* method, Culture medium, Isolated unpollinated ovules.

УВОД

Създаването на хибридни сортове при цвеклото се оформи като основно селекционно направление от средата на миналия век. Първите триплоидни захарно-кърмни хибриди са получени от Frandsen (1947) и Schlosser (1949), а под ръководството на Майсурян и др. (1970) е създаден известният триплоиден кърмен сорт - Жълт Екендорф. Редица изследователи (Юсубов и др., 1978; Перетяшко, 1981; Шевцов, 1983) съобщават, че максимален хетерозисен ефект при захарното цвекло се постига при хибридизация на хомозиготни инцухт-линии, притежаващи висока комбинативна способност. Независимо от многостранното изучаване на процесите на самоопрашване при захарното цвекло, получаването на инцухт-линии в голям мащаб остава открит проблем (Корниенко и др., 2001). Алтернативен метод за създаване на хомозиготни линии при захарното цвекло се яви индуцираната хаплоидия *in vitro*, успешно разработена още от началото на 80-те години (Hoseman et al., 1983; Slavova, 1988; Mezei et al., 1989).

Целта на това изследване беше да се установи доколко добре разработеният метод за хаплоидна индукция *in vitro* при захарното цвекло (Славова, 1988) е подходящ за масово използване и при кърмното.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експерименталната работа е извършена в лабораторията по тъканни култури на Земеделски институт - гр. Шумен през 2002-2003 г. Изходните растения, от които са вземани неоплодени семепъпки за предизвикване на *in vitro* хаплоидна индукция от кърмно цвекло, ни бяха предоставени от селекционерите, отгледани в саксии до фаза "цъфтеж". Използвани бяха 20 отделни генотипа от следните произходи: многосеменни диплоиди (801; CO; SF₂ (O x SR); SF₂ (O x S₂₁); SF₂ (O x S₂₁) G; SF₃ (4H x Sg); сорт Бета роза), едносеменни диплоиди (S-201; 801R; 802R; SGg; SRg), многосеменни тетраплоиди (F₁ 46 RC; 985R) и две растения-регенеранти от калус на изолирана неоплодена семепъпка от произход S-201 (2x; mm) – (5-35 P₁₃ и 5-35 P₁₈). Първото растение-регенерант е получено в 3-ти пасаж, а второто - в 6-ти. Подборът на изходния материал, неговата стерилизация, изолиране и култивиране, са осъществени по методики, разработени за захарното цвекло (Славова, 1988).

За прорастване на изолираните неоплодени семепъпки са използвани хранителни среди, разработени за захарното цвекло – II и III (Славова и Рафаилова, 1991). Допълнително са проучвани нови хранителни среди с участие на различни комбинации и количества от веществата ТДЗ (тидiazурон), АНОК (α-нафтил оцетна киселина) и БИ (бензимидазол), отразени в таблица 2, заедно

с резултатите.

Математическата обработка на получените резултати е направена по Ойвин (1960).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

На таблица 1 са представени данните от прорастването на изолираните неоплодени семеџпки от всички използвани генотипове кръмно цвекло (*Beta vulgaris* L. var. *Crassa*).

Таблица 1. Резултати от *in vitro*-индукцията на прорастъци от изолирани неоплодени семеџпки от кръмно цвекло (*Beta vulgaris* L. var. *Crassa*)

№	Генотип	Изолирани неоплодени семеџпки, брой	Получени прорастъци от култивирани неоплодени семеџпки		
			брой	%	$\pm m$
1	801, 2x, ММ	460	31	6.7	1.2
2	801, 2x, ММ	225	60	26.7	2.9
3	Сорт Бета роза, 2x, ММ	330	23	7.0	1.4
4	Сорт Бета роза, 2x, ММ	415	49	11.8	1.6
5	СО, 2x, ММ	230	12	6.1	1.6
6	SF ₂ (О x S ₂₁), 2x, ММ, червено	185	8	4.3	1.5
7	SF ₃ (4Н x Sg), 2x, ММ, червено	415	17	4.1	1.0
8	SF ₂ (О x SR), 2x, ММ, червено	305	60	19.7	2.3
9	SF ₂ (О x SR), 2x, ММ, червено	130	12	9.2	2.5
10	SF ₂ (О x S ₂₁), 2x, ММ, бяло	370	56	15.1	1.9
11	SF ₂ (О x S ₂₁)G, 2x, ММ	130	59	45.4	4.4
12	S-201, 2x, mm	245	46	18.8	2.5
13	802R, 2x, mm, червено	75	16	21.3	4.7
14	802R, 2x, mm, жълто	100	12	12.0	3.2
15	SGg, 2x, mm	230	9	3.9	1.3
16	SRg, 2x, mm, червено	60	3	5.0	2.8
17	5-35 P ₁₃	215	13	6.1	1.6
18	5-35 P ₁₈	300	57	19.0	2.3
19	F ₁ 46RC, 4x, ММ	500	42	8.9	1.3
20	985R, 4x, ММ	140	15	10.7	2.6
Общ брой		5060	600		
Среден %				11.9	0.5

Развитие е установено за 600 (11.9%) от общо 5060 броя изолирани семеџпки. Прорастване е наблюдавано за семеџпките от всички генотипове, но варирането е много голямо – от $3.9 \pm 1.3\%$ за едносеменния диплоиден производ SGg до $45.4 \pm 4.4\%$ за многосеменния диплоид SF₂ (О x S₂₁) G. От таблица 2 може да се проследи влиянието както на генотипа, така и на хранителната среда върху този процес. От представените резултати за прорастване на семеџпките от 7^{-те} проучвани произхода се вижда, че ролята на генотипа е особено голяма. За 6^{-ти} производ (SF₂ (О x S₂₁), 2x ММ), на 1^{-ва} хранителна среда е наблюдавано най-масовото прорастване ($71.1 \pm 6.7\%$). Този висок процент е благоприятен и от комбинацията на растежните регулатори

Внедряване *in vitro* метод за получаване на хаплоидни растения от кръмно цвекло (*Beta vulgaris* L. var. *Crassa*) I. Получаване на прорастъци от изолирани неоплодени семепъпки от кръмно цвекло

и захарозата в хранителната среда. Увеличаването на захарозата с още 3% във 2-ра хранителна среда, подтиска напълно прорастването (0.0%), а участието на 1.0 mg/l БИ в 3-та, вместо 0.5mg/l АНОК, повлиява само $2.5 \pm 1.6\%$ прорастване от този произход. Това е доказателство за различните изисквания на отделните генотипове към хранителната среда. Произход S-201, 2х, mm (7^{mm}) е следващият генотип с доста висок процент прорастване. За него еднакво влияние оказаха 1-ва и 3-та хранителни среди (30.0% прорастване). Завишеното количество на захарозата във 2-ра (8%) намали на 20.0% прорастването на неговите семепъпки.

Тя се оказва благоприятна за 2-ри, 3-ти и 5-ти генотипове, които имат най-високи стойности на прорастване на нея (съответно $13.0 \pm 3.4\%$; $24.6 \pm 5.3\%$ и $12.0 \pm 3.3\%$) срещу $8.2 \pm 2.6\%$; $12.5 \pm 3.7\%$ и $10.0 \pm 3.0\%$ за 1-ва и 0.0%; $8.9 \pm 4.2\%$ и $8.0 \pm 5.4\%$ за 3-та хранителна среда.

Резултатите от таблица 2 показват още необходимостта от разработването и използването на повече хранителни среди за хаплоидна индукция от изолирани неоплодени семепъпки на кръмно цвекло. Този подход безспорно увеличава броя на генотиповете, от които може да се предизвика това явление.

Таблица 2. Ефект от ролята на генотипа и хранителната среда върху прорастването на изолирани, неоплодени семепъпки от кръмно цвекло

Генотип	Получени прорастъци от изолирани семепъпки на хранителни среди, различаващи се по количествата захароза и растежните регулатори					
	1-ва хр. среда – 1.0mg/l ТДЗ + 0.5 mg/l АНОК +5% захароза		2-ра хр. среда – 1.0mg/l ТДЗ +0.5 mg/l АНОК +8% захароза		3-та хр. среда – 1.0mg/l ТДЗ +1.0 mg/l БИ +5% захароза	
	Прорастнали семепъпки, %	$\pm m$	Прорастнали семепъпки, %	$\pm m$	Прорастнали семепъпки, %	$\pm m$
801, 2х, ММ	9.2	2.6	9.2	2.6	6.7	2.4
Сорт Бета роза, 2х, ММ	8.2	2.6	13.0	3.4	0.0	0.0
Сорт Бета роза, 2х, ММ	12.5	3.7	24.6	5.3	8.9	4.2
CO, 2х, ММ	3.6	2.3	1.8	1.8	10.0	6.7
F ₁ 46RC, 4х, ММ	10.0	3.0	12.0	3.3	8.0	5.4
SF ₂ (O x S ₂₁), 2х, ММ	71.1	6.7	0.0	0.0	2.5	1.6
S-201, 2х, mm	30.0	7.2	20.0	6.8	30.0	8.4

ИЗВОДИ

1. Добре разработеният *in vitro*-метод за индукция на хаплоидни растения от изолирани неоплодени семепъпки от захарно цвекло със същия успех може да се прилага и при кръмното цвекло.

2. Този успех се определя както от ролята на генотипа, така и от факторите на използваната хранителна среда.

3. На хранителна среда, съдържаща 1.0 mg/l ТДЗ и 0.5 mg/l АНОК е постигнато $71.1 \pm 6.7\%$ прорастване на изолирани неоплодени семепъпки от произход SF₂ (O x S₂₁), 2х ММ.

ЛИТЕРАТУРА

- Корниенко, А. В., В. В. Знаменская, 2001.** Новые методы создания исходного материала сахарной свеклы, Рамонь, с. 3-10.
- Майсуриян, Н. А., И. П. Фирсов, 1970.** Гетерозис и полиплоидия в селекции свеклы кормового направления, М.: Наука, с. 150-166.
- Перетяцько, В. Г., 1981.** Селекционно-генетические основы создания гетерозисных гибридов сахарной свеклы, Автореф.дис.д.с-х.н., Киев, 61 с.
- Шевцов, И. А., 1983.** Использовании инбридинга у растений, Киев, Наукова Думка, 227 с.
- Юсубов, А.М., Попов, И., С., Сухопрутский, А.А., 1978.** Степень сомофертильности различных форм сахарной свеклы "Сахарная свекла, (6) с.33-34.
- Hoseman, D., D. Bossoutrot, 1983.** Induction of haploid plants from in vitro culture of unpollinated beet (*Beta vulgaris* L.), II. Pflanzenzucht, 91, 1-p.74-77.
- Mezei, S. and L. Kovacev, 1989.** Haploid plants development from unpollinated ovules of the sugar beet (*Beta vulgaris* L.), XII Eucarpia Congress 9-2, Vortrage fur Pflanzenzucht, 15.
- Oivin, I. A., 1960.** Statistical treatment of experimental results. Pathological Physiology and Experimental Therapy, (4): pp 76-85.
- Slavova, Y., 1988.** Developing of the vegetative propagation methods and obtaining of the haploid sugar beet plants in vitro. Ph.D. Thessis, Agric.Acad., Sofia (Bg).
- Slavova, Y. and E. Rafailova, 1991.** The obtaining of haploid plants from in vitro culture of unfertilized Sugar beet ovules (*Beta vulgaris* L.) M. Science, Biology of cultured cells and biotechnology of plants, pp. 157-162 (Ru).