

**СЕЛЕКЦИЯ НА ПРОДУКТИВНИ И ТОЛЕРАНТНИ КЪМ ГЪБНИ БОЛЕСТИ
ЛИНИИ ПШЕНИЦА (*TRITICUM AESTIVUM* L.) ЧРЕЗ ПРИЛОЖЕНИЕ
НА ДИХАПЛОИДИЯТА В КРЪСТОСКА „12-Z X АГЛИКА”**

Драгомир Пламенов¹, Иван Белчев², Пенко Спецов²

1 – Технически университет – Варна, Факултет по морски науки и екология, Варна,
2 – Добруджански земеделски институт – гр. Генерал Тошево, 9520 Генерал Тошево

Резюме

*Пламенов, Д., И. Белчев, П. Спецов, 2012. Селекция на продуктивни и толерантни към гъбни болести линии пшеница (*Triticum aestivum* L.) чрез приложение на дихаплоидията в кръстоска „12-z x Аглика”. FCS 8(2):239-248*

Основна задача на съвременната селекция е производството на сортове с висока продуктивност, съчетаващи толерантност към биотични и абиотични фактори на средата. Макар че до настоящия момент основен селекционен метод е междусортовата хибридизация, през последните години се засилва и ролята на отдалечената хибридизация. Целта на настоящата разработка е чрез използване на дихаплоидията да се селектират продуктивни и фитопатологични ценни линии зимна обикновена пшеница от кръстоска, в която участват монозаместена линия на сорт „Тракия” („12-z”), устойчива на брашнеста мана в оранжерийни условия, и качествен и толерантен на гъбни болести сорт „Аглика”. В изпълнение на поставената цел следва да се решат редица задачи. Първата задача е да се използват възможностите на антерната култура за производство на зелени хаплоидни регенеранти, като за целта са получени 380 зелени растения (2.2 % от култивираните 17550 антери). На второ място е необходимо да се приложи дихаплоидията за получаване на дихаплоидни линии. В резултат на изпълнението на тази задача са продуцирани 143 дихаплоидни растения (след колхициниране) в зрялост (37.6% от произведените зелени регенеранти). Третата методична задача е изпитване на отбрани и толерантни към брашнеста мана и кафява ръжда линии пшеница за добив при полски условия заедно със стандартния сорт „Аглика”. За да се достигне до този момент обаче, получените дихаплоидни растения преминават през няколко етапа на селекция. Първоначално се отглеждат в оранжерия, репродуцират се на полски участък (в редове), изпитват се в контролен опит (в единична парцела) и накрая в конкурсен сортов опит (в 5 повторения). След проведен последователен отбор по агрономически ценни признаци, пет дихаплоидни линии показват висока продуктивност и толерантност към гъбни болести по време на двугодишно изпитване в КСО.

Ключови думи: Зимна обикновена пшеница – Антерна култура – Дихаплоидни линии – Продуктивност – Устойчивост

Abstract

Plamenov, D., I. Belchev, P. Spetsov, 2011. Breeding of productive and tolerant to fungal disease wheat lines (*Triticum aestivum* L.) by application of doubled haploidy in a cross “12-z x Aglika”. FCS 8(2):239-248

The main task of modern plant breeding is the production of varieties with high productivity, combining tolerance to biotic and abiotic environmental factors. Although to date the intervarietal hybridization is the leading method, the role of wide hybridization has been recently increased. The doubled haploidy is subjected to this study for breeding productive and phytopathological valuable winter wheat lines in a cross involving mono-substitution line of variety “Trakiya” (“12-z”), resistant to powdery mildew in greenhouse conditions, and the qualitative and tolerant to fungal diseases variety “Aglika”. Several tasks should be realized in pursuance of this objective. The first task is to exploit the potential of anther culture for the production of green haploid regenerants. It is resulted in 380 green plants (2.2% from cultivated 17550 anthers). Secondly, it is necessary to apply the doubled haploidy for production of doubled haploid lines. This activity yielded in 143 doubled haploid plants (after treatment with colchicine solution) at maturity (37.6% from the produced green regenerants) The third methodical aim is the selection of tolerant to powdery mildew and leaf rust wheat lines for high yield under field conditions along with the standard variety “Aglika”. To reach this point, however, the received doubled haploid plants pass through several stages of breeding. Initially, the plants are grown in the greenhouse, then reproduced in a field (in rows), tested in small trials (each line in a single plot) and finally grown in replicated trials (each line in 5 replications). After a careful selection by valuable agronomic traits, five doubled haploid lines have been chose with high productivity and tolerance to fungal diseases during the two years study in the replicated trials.

Key words: Common wheat – Anther culture – Doubled haploid lines – Productivity – Resistance

УВОД

Дихаплоидията (ДХ) е биотехнологичен метод, посредством който се постига хомозиготност в рамките на една генерация. Следователно, прилагайки този метод, селекционерите могат да спестят няколко цикъла на кръстоски, за да постигнат изискуемото ниво на хомозиготност. В допълнение на това, абсолютна хомозиготност по отношение на всички признаци е непостижима чрез конвенционалната селекция. Ето защо ДХ технологията дава възможност на селекционерите да редуцират времето и разходите за продуциране на нов сорт, в сравнение с класическата селекция (Dunwell 2010; Forster & Thomas 2005; Forster et al. 2007; Thomas et al. 2003).

Дихаплоидната технология е вече рутинна в много селекционни компании и лаборатории, като в резултат на използването ѝ са разработени почти 300 нови сорта от разнообразни културни растения. Най-много дихаплоидни сортове са създадени при ечемика (*Hordeum vulgare* L.), рапицата (*Brassica napus* L.) и пшеницата (*Triticum aestivum* L.) (Dunwell 2010; Thomas et al. 2003; Tuvešson et al. 2007). Според Thomas et al. (2003) най-подходящият метод за производство на дихаплоиди е различен в зависимост от вида растение, напр. докато за рапицата това е микроспоровата култура, то за пшеницата – антерната култура. В резултат от нейното прилагане при пшеницата е възможно да се съкрати периода от първоначалната хибридизация до получаването на сорт с 3-4 години (Barnabás et al. 2001). Съчетаването на традиционните и биотехнологичните техники дава възможност да се създаде и използва непознато досега растително генетично разнообразие, с цел селектиране

на нови елитни сортове с подобрени качества, удовлетворяващи потребностите на производители и консуматори (Germanà 2011).

Целта на настоящата разработка е чрез използване на дихаплоидията да се селектират продуктивни и фитопатологични ценни линии зимна обикновена пшеница от кръстоска, в която участват монозаместена линия на сорт „Тракия” („12-z”), устойчива на брашнеста мана в оранжерийни условия, и качественя и толерантен на гъбни болести сорт „Аглика”.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В основата на изследването е кръстоска „Линия 12-z x Аглика”. Линията е продукт на отдалечената хибридизация, получена чрез отбор на устойчивост към брашнеста мана в кръстоска „Тракия x *Ae. geniculata*” (популация BC₂F₂), определена е за монозаместена по генотип с участието на 6U хромозома (6U⁹/6D) (Stoilova & Spetsov 2006). Сорт „Аглика” е създаден в ДЗИ – гр. Генерал Тошево и райониран през 1997 г., от кръстоската „GP 2558-128 x Плиска”. Сортът е стандарт за продуктивност в системата на ИАСАС за група „А” – силни сортове пшеница. Линия „12-z” е кръстосвана с „Аглика” в течение на 3 години за произвеждане на F₁ семена. За кръстосване всяка година са използвани цитологично проверени растения, съдържащи чуждата хромозома 6U, осигуряваща устойчивостта на пшеничените растения към брашнеста мана.

Антерна култура и облъчване

Методът на антерна култура е приложен съгласно разработената схема в ДЗИ – гр. Генерал Тошево (Белчев 2003). Донорните (F₁) растения се отглеждат при оранжерийни условия. Преди культивиране на антерите, част от хибридни класове се третират с 5 Gy гама-лъчи (вариант АО). След това част от калусите се облъчват със същата доза (вариант КО) и част от калусите на облъчените антери също (комбиниран вариант АК). Така получените хаплоидни и дихаплоидни растения се характеризират с произход от 4 варианта (групи): Група К – контролен вариант, антерна култура без облъчване; АО – третирани антери с гама лъчи; КО – облъчени ембриогенни структури (калуси); АК – третирани антери и калуси. Облъчването при вариантите АО и АК (за антерите) е преди культивирането на антерите, а при КО и АК – преди прехвърляне на калусите върху регенерационна хранителна среда. Индукционната хранителна среда е Potato 2, а регенерационната – 190-2. Опитът е изведен на три части (повторения) за получаване на по-голям обем от хаплоидни растения. Трите повторения се извършват за период от 5 години (2004-2008), тъй като технологията на едно повторение надхвърля продължителността на календарна година. Реакцията към антерна култура се характеризира със следните параметри:

- Калусна индукция – брой и процент на индуцираните ембриогенни структури на 100 культивирани антери;
- Растителна регенерация – брой и процент на зелени и албиносни растения, регенерирали от калуси, прехвърлени в регенерационната среда;
- Албиносни и зелени растения – продуцираните албиносни и зелени растения на 100 культивирани антери;
- Дихаплоиди – продуцирани на 100 культивирани антери след третиране на хаплоиди с колхицинов разтвор.

Могат да бъдат очертани следните етапи на селекция до получаване на най-добрите дихаплоидни линии, обект на настоящото изследване:

- отглеждане на ДХР в оранжерия (оценка на устойчивост към брашнеста мана и бракуване на чувствителните растения);
- репродукция на ДХЛ на полски участък (отглеждане на линиите в редове, оценка за нападение от брашнеста мана и кафява ръжда);

- изпитване на ДХЛ в контролен опит (единична парцела от 8.75 м², оценка за полягане, оценка за нападение от гъбни болести, добив);
- изпитване на ДХЛ в КСО (парцела от 10 м² в 5 повторения, добив, оценка за полягане, оценка за нападение от брашнеста мана и кафява ръжда).

Реакция към брашнеста мана и кафява ръжда

Оценката на реакцията на генотиповете към двата патогена е съгласно скала от 0 до 9, където с 0 се обозначава имунна реакция (няма видими симптоми), а с 9 – висока чувствителност (обилна спорулация, всички листа са инфектирани) (Leath & Neun 1990). **Наблюденията обхващат периода от поява на флаговия лист до настъпване на зрелостта.**

Статистически анализ

Двуфакторният дисперсионен анализ е приложен, за да се установи доколко влиянието на два фактора върху способността за андрогенеза е статистически значимо или не. На статистически анализ е подложена и реакцията на изследваните генотипове към антерна култура, данните за продуктивност и оценките за устойчивост към болести. Съобразно получените резултати, вариантите са групирани и е изчислена най-малката доказана разлика между тях (LSD). **За нуждите на статистиката са използвани програмни продукти ASSISTAT, version 7.6 beta и STATISTICA, version 7.0.**

РЕЗУЛТАТИ

Данните от двуфакторния дисперсионен анализ показват, че е налице статистическа достоверност на взаимодействието между факторите „варианти” (генотипове) и „параметри” (отчитащи реакцията към антерна култура) по отношение на изследваната андрогенна способност (табл. 1). Освен комбинираното е доказано и индивидуалното влияние на двата източника на вариране върху проучвания признак. Установено е, че статистически по-силно е въздействието върху андрогенезата на параметрите (калусна индукция, растителна регенерация, получени зелени растения), отколкото на генотиповете (родителски форми, К, АО, КО, АК).

Таблица 1. Двуфакторен дисперсионен анализ по признака андрогенна способност при хибриди от кръстоската „12-z x Аглика” и отделните родителски форми
Table 1. Two way ANOVA for the androgenic ability of the cross „12-z x Аглика” and its parents

Източник на вариране Source of variation	D.F.	MS	F
Варианти / Variants	5	375.7	28.2 **
Параметри / Parameters	3	5866.1	440.6 **
Взаимодействие / Interaction	15	107.9	8.1 **
Общо / Total	23	917.2	68.9 **
Грешка / Error	24	13.3	

** , статистическа достоверност при P=0.01 / significant differences at P=0.01

В таблица 2 е представена реакцията към антерна култура на изследваните генотипове. Прави впечатление, че линия „12-z”, която участва като майчин компонент в кръстоската, има ниска отзивчивост към антерна култура, като продуцира най-малко растителни регенеранти (9 бр., 20%) и зелени растения (2 бр., 0.3%) от всички проучвани групи. В противовес е реакцията на опрашителя (сорт „Аглика”), който показва най-високи стойности при всички параметри, отчитащи реакцията към антерна култура. Статистическият анализ диференцира родителските форми в най-разграничимите групи спрямо реакцията им към антерна култура (средните

стойности от четирите параметъра при линия „12-z” и сорт „Аглика” са съответно 7.4% и 27.9%). Получените F₁ хибридни растения се разделят на четири варианта според прилаганото облъчване. От трите групи, спрямо които е приложено облъчване (АО, КО и АК), относително най-добро е представянето на група КО (средно 18.1%). Въпреки това не може да се коментира за положително влияние на прилаганата ниска доза на облъчване (5 Gy) върху андрогенната способност при група КО, тъй като съпоставяйки със средната стойност при контролната група (16.4%) се вижда, че те са много сходни и между тях няма статистически доказана разлика. В този случай може да се дискутира за неутрална реакция, поради което двете групи (КО и К) статистически са обособени като заемащи второ място по реакция към антерна култура. Въздействието на ниската доза гама-лъчи върху останалите два варианта е негативно, тъй като облъчването на антерите (АО) и комбинираното третиране на антери и калуси (АК) понижава индукцията на ембриогенни структури, растителната регенерация и продуцирането на зелени растения. За отбелязване е факта, че е налице известен положителен ефект единствено по отношение на по-малко получени албиносни растения, особено при група АО.

Таблица 2. Реакция към антерна култура на родителски форми и F₁ хибридни растения („12-z x Аглика”), разграничени в четири групи след прилагане на ниска доза от 5 Gy гама-лъчи

Table 2. Anther culture response of parents and F₁ hybrid plants (“12-z x Aglika”), divided in four groups after applying low doze 5 Gy of gamma-irradiation

Variant Вариант	Култивирани антери Cultured anthers	Калусна индукция Callus induction		Растителна регенерация Plant regeneration		Зелени растения Green plants		Албиносни растения Albino plants		Средно Mean
		No	%	No	%	No	%	No	%	
Аглика Aglika	510	126	24.7	93	74.0	58	11.4	30	5.9	27.9 a
12-z 12-z	720	45	6.3	9	20.0	2	0.3	7	1.0	7.4 d
К /С	4260	499	11.7	239	47.9	130	3.1	109	2.6	16.4 b
АО /AI	4440	227	5.1	98	43.2	65	1.5	33	0.7	12.6 c
КО /CI	4470	509	11.4	272	53.4	136	3.0	136	3.0	18.1 b
АК /ACI	4380	235	5.4	123	52.3	49	1.1	74	1.7	14.9 bc
Средно Mean			10.3b		49.0a		3.0 c		2.7 c	

К – контролен вариант, антерна култура без облъчване / С – control, anthers cultured, 0 Gy
 АО – антери облъчени с 5 Gy / AI – anthers irradiated with 5 Gy
 КО – калуси облъчени с 5 Gy / CI – calli irradiated with 5 Gy
 АК – антери и калуси облъчени последователно с 5 + 5 Gy гама-лъчи (група с комбинирано третиране) / ACI – anthers and calli irradiated consecutively with 5 + 5 Gy (combined treatment group)

Еднаквите букви показват недостоверно различни стойности при p=0.05
 Means followed by the same letter are not significantly different at p=0.05

За целия период са получени общо 380 зелени растения (2.2 % от култивираните 17550 антери) (табл. 3). След прилагане на метода на дихаплоидията са продуцирани 143 дихаплоидни растения, преминали през колхициниране и достигнали до зрелост (37.6% от произведените зелени регенеранти). Най-много дихаплоидни растения са получени от вариантите КО и К, 58 (42.7%) и 49 (37.7%) съответно. Не е установена обаче доказана разлика между двете групи по този признак. Най-малко дихаплоидни растения са продуцирани от варианта АК, 10 растения. Причината е вероятно в

намаления брой калуси (5.4% спрямо 11.4% и 11.7% за КО и К съответно). Получените дихаплоидни растения се изпитват последователно като линии на полски участък в редове (125 бр.), в контролно изпитване (81 бр.) и в конкурсен сортов опит (22 бр.). При всеки от изброените етапи на селекция се прави отбор по агрономически ценни признаци, включващи оценка на устойчивост към гъбни болести (главно брашнеста мана и кафява ръжда), оценка за полягане, ронливост и продуктивност. С това се обяснява и редуцирането на изпитваните линии при всяко следващо селекционно звено. Най-много дихаплоидни линии в КСО са отбрани при варианта КО (12 бр.), но относително най-силно е представянето при група АК (60% от получените дихаплоидни растения са изпитани в КСО). Най-малко линии изпитани в КСО е отчетено при групите К (3 бр.) и АО (1 бр.). От тях не е излъчена дихаплоидна линия, която да бъде класифицирана в групата на най-добрите генотипове, получени в настоящото изследване. За сметка на това, 4 линии, продуцирани от варианта с облъчване на калусите и 1 от комбинираното третиране на антери и калуси демонстрират високи стопански качества по време на двугодишното изпитване в КСО, поради което ги квалифицираме като най-добри от изследваните дихаплоидни линии. Крайният резултат след прилагане на метода на дихаплоидията е получаването общо на 5 високопродуктивни и толерантни на гъбни болести линии зимна обикновена пшеница, което представлява 3.5% от всички произведени дихаплоидни растения.

Таблица 3. Брой на дихаплоидните растения (ДХР) получени от единична кръстоска и ДХ линии (ДХЛ) изпитани при полски условия

Table 3. Number of doubled haploid plants (DHP) produced from a single cross and DH lines (DHL) tested in field conditions

Варианти Variants	Зелени растения, бр. Green plants, no	Получени ДХР ¹ DHP produced ¹		Изпитани ДХЛ в редове DHL tested in rows		Изпитани ДХЛ в КИ DHL tested in small trials		Изпитани ДХЛ в КСО DHL tested in replicated trials		Най-добри ДХЛ, бр. (%) ² Best DHL, no (%) ²
		No	%	No	%	No	%	No	%	
К / С	130	49	37.7	48	98	31	63.3	3	6.1	0
АО / АИ	65	26	40	17	65.4	9	34.6	1	3.9	0
КО / СИ	136	58	42.7	51	88	33	57	12	20.7	4 (6.9)
АК / АСИ	49	10	20.4	9	90	8	80	6	60	1 (10.0)
Общо / Total	380	143	37.6	125	87.4	81	56.6	22	15.4	5 (3.5)

¹, Т-тестът при степен на вероятност 5% е приложен и показва, че средните аритметични стойности не се различават статистически помежду си

¹, The t-test at a level of 5% of probability was applied and showed the averages are being not statistically different

², Стойностите в скоби са пресметнати към получените ДХР

², Figures in parentheses are calculated according to DHP produced

В продължение на три години (от 2008 до 2010 г.) най-добрите дихаплоидни линии са изпитвани по продуктивност и реакция към двете икономически важни болести за нашата страна (брашнеста мана и кафява ръжда) (табл. 4). През 2008 г. са отгледани само две от линиите, като по продуктивност те се представят над нивото на стандартния сорт „Аглика”. Статистически анализ не е приложен, тъй като не е налице пълният сортимент от проучваните дихаплоидни линии. През следващата година са изпитани всички пет линии, като с изключение на една от тях (КО-1-2), при останалите е отчетен по-висок добив от стандарта. Установена е доказана разлика ($LSD_{0.05}=0.69$) между продуктивността на ДХЛ КО-3-2 (10.58 t/ha) и „Аглика” (9.78 t/

ha). Представянето на дихаплоидните линии е още по-убедително през 2010 г., когато при три от тях (ДХЛ КО-4-2, АК-6-1, КО-35-2) е отчетен статистически достоверно ($LSD_{0.05}=0.36$) по-висок добив (8.67, 8.33, 8.22 t/ha съответно), отколкото стандарта в опита (7.83 t/ha). Единствено ДХЛ КО-3-2 е по-ниско продуктивна от „Аглика”. Обобщавайки резултатите от проведения експеримент в КСО, може да се отчете, че ДХЛ КО-4-2 превъзхожда по продуктивност сорт „Аглика”, средно с 0.72 t/ha, което е и статистически доказано ($LSD_{0.05}=0.41$). Останалите четири ДХЛ демонстрират също висока продуктивност със средна стойност над „Аглика”, без да е налице обаче достоверност на разликата.

Таблица 4. Продуктивност, реакция към брашнеста мана и кафява ръжда на най-добрите получени ДХЛ, изпитани през периода 2008-2010

Table 4. Yield, powdery mildew and leaf rust reaction of best DHL produced and tested in 2008-2010 period

ДХ линии DH lines	Продуктивност (t/ha) Productivity (t/ha)				Брашнеста мана ¹ Powdery mildew ¹		Кафява ръжда ¹ Leaf rust ¹	
	2008	2009	2010	Mean	Scores	Mean	Scores	Mean
КО-1-2 CI-1-2	-	9.53 c	8.17 bc	8.85 b	1, 1	1	1, 1	1 b
КО-3-2 CI-3-2	-	10.58 a	7.08 d	8.83 b	1, 1	1	1, 1	1 b
КО-4-2 CI-4-2	-	10.39 ab	8.67 a	9.53 a	1, 1	1	2, 1	1.5 ab
КО-35-2 CI-35-2	9.44	10.15 abc	8.22 b	9.19 ab	3, 3, 1	2.3	2, 2, 1	1.7 ab
АК-6-1 АCI-6-1	9.82	9.91 abc	8.33 ab	9.12 b	1, 2, 1	1.3	2, 2, 1	1.7 ab
Аглика Aglika	9.23	9.78 bc	7.83 c	8.81 b	1, 2, 1	1.3	2, 2, 4	2.7 a
$LSD_{0.05}$		0.69	0.36	0.41		1.51		1.60

¹ Оценка на реакцията към брашнеста мана и кафява ръжда съгласно инфекциозна скала от 1 до 9: 1=устойчивост, 9=най-висока чувствителност

¹, Powdery mildew and leaf rust infection scale of 1-9: 1=resistance, 9=highest susceptibility

Еднаквите букви показват недостоверно различни стойности при $p=0.05$

Means followed by the same letter are not significantly different at $p=0.05$

По отношение на реакцията на изследваните генотипове към брашнеста мана е отчетено високо ниво на устойчивост при три от ДХЛ (КО-1-2, КО-3-2, КО-4-2), устойчива реакция на нивото на „Аглика” (ДХЛ АК-6-1) и нападение в ниска степен при ДХЛ КО-35-2. Разликите в оценките на реакцията между вариантите са незначителни и са статистически недоказани. Що се отнася до устойчивостта на генотиповете към кафява ръжда прави впечатление високата устойчивост на две от ДХЛ (КО-1-2, КО-3-2). При тях е отчетена по-здрава листна система от тази на „Аглика”, като анализа на оценките за реакцията към патогена сочи доказано по-висока устойчивост от тази на стандарта. Другите три ДХЛ също демонстрират устойчива реакция към кафява ръжда, представяйки се малко по-добре от „Аглика”, поради което формират междинна група по този признак. Фитопатологичните данни сочат най-високо ниво на устойчивост при две ДХЛ (КО-1-2, КО-3-2), а при останалите три ДХЛ (КО-4-2, КО-35-2, АК-6-1) реакцията към изследваните болести е на нивото на стандарта.

ОБСЪЖДАНЕ

Андрогенната способност при пшеницата се определя от три независимо наследявани компоненти (калусна индукция, растителна регенерация и продуцирани зелени растения), които се контролират от повече от един ген (Lazar et al. 1984; Ljevnaić-Mašić et al. 2010; Szakacs et al. 1988). В нашето изследване също е установено, че изброените параметри въздействат в най-силна степен върху андрогенезата. В настоящата разработка намират потвърждение и данните от редица публикации (Belchev et al. 2000; Khiabani et al. 2008; Moieni & Sarafi 1998; Tersi et al. 2006), сочещи че генотипът е важен фактор за проявлението на андрогенната реакция. Андрогенезата може да бъде повлияна от разнообразни мутагенни стресови въздействия. Пример за това е прилагане на ниска доза гама-лъчи върху F_1 хибридни класове, които да бъдат използвани за продуциране на дихаплоиди посредством антерна култура (Khan et al. 2001). Нашите данни не потвърждават стимулиращия ефект на ниската доза на облъчване върху продуцирането на ембриониди и честотата на растителна регенерация, установено от Ling et al. (1991) и Belchev & Kostov (2003) и са в унисон с данните на Khiabani et al. (2008).

Един от основните проблеми в използването на антерната култура за селекционни цели при житните култури (в частност при пшеницата) се явява получаването на голям брой албиносни растения измежду продуцираните регенеранти (Careda et al. 2000; Ferrie & Caswell 2011; Khiabani et al. 2008; Torp & Andersen 2009; Wehr & Zeller 1990). Този извод намира потвърждение и в настоящото проучване, където при част от генотиповете са констатирани по-голям брой албиносни, отколкото зелени растения, а при други – близки по брой. Установено е, че липсата на хлорофил е признак, който е генотипно контролиран (Muñoz-Amatriaín et al. 2008).

Доброто познаване на родителските компоненти и тяхната комбинативна способност е определящо за ефективността на антерната култура (Белчев и др., 2009). Необходимо е и най-малко една от родителските форми да е високо отзивчива (Tuvevsson et al. 2000; Zhou & Konzak 1992). Известно е, че сорт „Свилена” има изключително висока отзивчивост към антерна култура, а сорт „Аглика” – средна, превишаваща други сортове като „Енола” и „Добротица” (Belchev et al. 2000). Данните от настоящото изследване потвърждават възможността за използване на сорт „Аглика” като компонент в кръстоски, с цел изследване на андрогенната реакция на получените хибриди.

В световната научна литература са налице множество факти, доказващи агрономическата ценност на получени дихаплоидни линии. Те демонстрират по-висока продуктивност от съответните стандарти по този признак (Ismail 2007; Mustafa 2008; Pauk & Kertesz 1997) и дори съчетават високодобивния си потенциал с устойчивост към кафява ръжда (Salomon et al. 2003) и брашнеста мана (Pauk et al. 1988). Антерната култура може успешно да бъде използвана за усъвършенстване на устойчивостта към болести при пшеницата. В резултат са създадени дихаплоидните сортове „Jinghua №1” (устойчив към жълта ръжда и брашнеста мана), „Florin” (устойчив към ръжди и брашнеста мана) (Plaha et al. 2002). У нас, в резултат от съчетаване на метода на антерна култура с конвенционалната селекция са създадени три сорта зимна обикновена пшеница с разнообразно съчетание на признаците (Белчев и др. 2009). Резултатите от настоящото изследване напълно корелират с цитираните литературни източници, тъй като са излъчени пет дихаплоидни линии, които притежават завидно съчетание на продуктивност и устойчива реакция на икономически важни болести.

ИЗВОДИ

1. Налице е статистически доказано взаимодействие между факторите, отчитащи влиянието на генотиповете и параметрите на антерната култура върху способността за андрогенеза.

2. Ниската доза на облъчване има негативен ефект върху отзивчивостта към антерна култура при вариантите АО (облъчени антери) и АК (комбинирано третиране на антери и калуси) и неутрална реакция при групата КО (облъчени калуси).

3. Най-голям брой дихаплоидни растения (58 бр.) са продуцирани от група КО, от които дванадесет са изпитани като линии в КСО. От общо пет най-добри ДХЛ в опита, четири са излъчени от тази група, а една произхожда от варианта АК.

4. Пет ДХЛ се представят по продуктивност над нивото на сорт „Аглика”, а ДХЛ КО-4-2 статистически доказано го превъзхожда.

5. Изследваните ДХЛ имат толерантна реакция към брашнеста мана и кафява ръжда, подобно на „Аглика”, а генотиповете ДХЛ КО-1-2 и КО-3-2 показват по-висока устойчивост.

ЛИТЕРАТУРА

- Белчев, И., 2003.** Изследвания върху антерна култура от зимна обикновена пшеница (*Triticum aestivum* L.) и приложение на дихаплоидните линии в селекцията. Автореферат, Добрич, 2003.
- Белчев, И., И. Тодоров, П. Иванов, И. Стоева, К. Костов, Н. Ценов, И. Панайотов, Т. Петрова, И. Илиев, В. Иванова, 2009.** Създаване и характеристика на първите български дихаплоидни сортове зимна обикновена пшеница. *Field Crops Studies*, Vol. V-2: 245-252.
- Barnabás, B, É. Szakács, I Karsai, and Z. Bedő, 2001.** *In vitro* androgenesis of wheat: from fundamentals to practical application. *Euphytica* 119: 211-216.
- Belchev, I., K. Kostov, R. Schlegel, P. Ivanov, N. Tsenov, and N. Stavreva, 2000.** Anther culture response of wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties from Eastern Europe. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 6: 499-506.
- Belchev, I, and K. Kostov, 2003.** Changes in androgenic response of wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties after spike treatment with gamma-rays. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 9: 29-32.
- Caredda, S., C. Doncoeur, P. Devaux, R.S. Sangwan, and C. Clément, 2000.** Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Sexual Plant Reproduction* 13: 95-104.
- Dunwell, J.M., 2010.** Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal* 8: 377-424.
- Ferrie, A.M.R., and K.L. Caswell, 2011.** Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 104: 301-309.
- Forster, B.P., and W.T.B. Thomas, 2005.** Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breed Rev* 25: 57-88.
- Forster, B.P., E. Heberle-Bors, K.J. Kasha, and A. Touraev, 2007.** The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science* 12: 368-375.
- Germanà, M.A., 2011.** Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Reports* 30: 839-857.
- Khan, A.J., S. Hassan, M. Tariq, and T. Khan, 2001.** Haploidy breeding and mutagenesis for drought tolerance in wheat. *Euphytica* 120: 409-414.
- Khiabani, B.N., C. Vedadi, E. Rahmani, and M.A.M. Shalmani, 2008.** Response of some Iranian wheat genotypes to anther culture system. *Indian Journal of Biotechnology* 7: 531-535.
- Ismail, M.I., 2007.** Assessment of genetic improvement in doubled haploid lines of bread wheat under heat-stressed environment. Thesis (Ph.D. in Crop Science (Plant breeding)), 160 p.

- Lazar, M.D., P.S. Baenziger, and G.W. Schaeffer, 1984.** Combining abilities and heritability of callus formation and plantlet regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther cultures. *Theoretical and Applied Genetics* 68: 131-134.
- Leath, S., and M. Heun, 1990.** Identification of powdery mildew resistance genes in cultivars of soft red winter wheat. *Plant Disease* 74: 747-752.
- Ling, D.X., D.J. Lockett, and N.L. Darvey, 1991.** Low dose gamma irradiation promotes wheat anther culture response. *Australian Journal of Botany* 39: 467-474.
- Ljevnaić-Mašić, B., A. Kondić-Špica, L. Brbaklić, D. Trkulja, and N. Hristov, 2010.** Genetic analysis of anther culture response in wheat genotypes. *Contemporary agriculture / Savremena poljoprivreda* 59: 49-55.
- Moieni, A., A. Sarafi, 1998.** Haploid regeneration by anther culture and its relationship to agronomic traits in the parent and progeny pure lines of a composite cross of hexaploid wheat. *Cereal Research Communications* 26: 127-135.
- Muñoz-Amatriain, M., A.M. Castillo, X.W. Chen, L. Cistué, and M.P. Vallés, 2008.** Identification and validation of QTLs for green plant percentage in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Molecular Breeding* 22: 119-129.
- Mustafa, N.S., 2008.** Evaluation of doubled haploid wheat (*Triticum aestivum* L.) lines developed from the cultivar “Sasaraib”. Thesis (M.Sc. in Plant biotechnology), 58 p.
- Pauk, J., Z. Kertesz, and Z. Barabas, 1988.** Production of wheat lines from anther culture and their achievements in performance tests. *Novenytermeles* 37: 197-203.
- Pauk, J., and Z. Kertesz, 1997.** Production and evaluation of doubled haploid wheat lines. *Journal of Applied Genetics* 38: 425-435.
- Plaha, P., K.D. Sharma, and R. Rathour, 2002.** Biotechnological approaches for the management of crop diseases. In: V.K. Gupta, and Y.S. Paul (eds), pp. 413-448. *Diseases of field crops*. Indus publishing company, New Delhi.
- Salomon, M.V., C.E.O. Camargo, A. Petinelli Jr., and J.A.A. Filho, 2003.** Performance of dihaploid wheat lines obtained via anther culture. *Scientia Agricola* 60: 43-50.
- Stoilova, T, and P. Spetsov, 2006.** Chromosome 6U from *Aegilops geniculata* Roth carrying powdery mildew resistance in bread wheat. *Breeding Science* 56: 351-357.
- Szakacs, E, G. Kovacs, J. Pauk, and B. Barnabás, 1988.** Substitution analysis of callus induction and plant regeneration from anther culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports* 7: 127-129.
- Tersi, M., I.N. Xynias, E. Gouli-Vavdinoudi, and D.G. Roupakias, 2006.** Anther culture response of F₁ durum x bread wheat hybrids after colchicine application. *Plant breeding* 125: 457-460.
- Thomas, W.T.B., B.P. Forster, and B. Gertsson, 2003.** Doubled haploids in plant breeding. In: Maluszynski, M, and I. Szarejko (eds). *Haploid production in crop plants: a manual*, pp. 337-349. Kluwer, Dordrecht.
- Torp, A.M., and S.B. Andersen, 2009.** Albinism in microspore culture. In: Touraev, A., B.P. Forster, and S.M. Jain (eds). *Advances in haploid production in higher plants*, pp. 155-160. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Turesson, S., A. Ljungberg, N. Johansson, K.-E. Kalsson, L.W. Suijs, and J.-P. Josset, 2000.** Large-scale production of wheat and triticale double haploids through the use of a single-anther culture method. *Plant Breeding* 119: 455-459.
- Turesson, S., C. Dayteg, P. Hagberg, O. Manninen, P. Tanhuanpaa, T. Tenhola-Roininen, E. Kiviharju, J. Weyen, J. Forster, J. Schondelmaier, J. Lafferty, M. Marn, and A. Fleck, 2007.** Molecular markers and doubled haploids in European plant breeding. *Euphytica* 158: 305-312.
- Wehr, B.F., and F.J. Zeller, 1990.** *In vitro* microspore reaction of different German wheat cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 79: 77-80.
- Zhou, H, and C.F. Konzak, 1992.** Genetic control of green plant regeneration from anther culture of wheat. *Genome* 35: 957-961.