

**ПРОУЧВАНЕ НА РЕГЕНЕРАЦИОННАТА СПОСОБНОСТ
НА СОРТОВЕ ЗИМЕН ЕЧЕМИК**

Боряна Дюлгерова
Институт по земеделие, Карнобат

Резюме

Дюлгерова, Б., Проучване на регенерационната способност на сортове зимен ечемик

Проучена е регенерационната способност на сортовете Веслец, Перун и Емон в култура от незрели зародиши върху два варианта на хранителната среда със стандартната за MS концентрация на $CuSO_4$ /0,1 μM / и с увеличена концентрация на $CuSO_4$ /5 μM /. Установено е, че и при трите сорта на средата с по-висока концентрация на Cu йони са регенерирани по-голям брой растения. По-високото съдържание Cu^{2+} в средата не води до повишаване на броя на ембриогенните калуси. По-високата регенерационна честота се дължи на по-големия брой растения, получени от един ембриогенен калус. При изпитваната система за култивиране на незрели зародиши проучваните сортове се подреждат по отношение на регенерационната си способност в следната последователност: Емон>Перун>Веслец.

Ключови думи: ечемик-*in vitro* култивиране-незрели зародиши

Abstract

Dyulgerova, B. Evaluation on the regeneration ability of winter barleyculturals.

The regeneration ability of three barley cultivars in immature embryos culture on MS medium with standard concentration of $CuSO_4$ /0,1 μM / and with increase concentration of $CuSO_4$ /5 μM / was examined. The higher concentration of Cu^{2+} in the medium improves regeneration frequency as a result of more regenerated plants from one embryogenic callus in all studied genotypes. Regard to the regeneration ability the studied cultivars arrange in the following order Emon >Veslets> Perun .

Key words: barley- *in vitro* culture-immature embryos

УВОД

Използването на различни *in vitro* техники в селекционната работа при ечемика, зависи от наличието на ефективна система за регенерация (Dahleen and Bregitzer 2002, Chang et al. 2003). Ечемикът е култура, при която набора от експлант, подходящи за *in vitro* култивиране е сравнително ограничен (Ganeshan et al. 2003). Въпреки успешната регенерация при използването на: скutelум от незрели зародиши (Kicovb et al. 2004), незрели съцветия (Thomas and Scott, 1985), апикални меристеми (Vitanova et al., 1995; Sahrawat and Chand, 2004;), сегменти от листните основи (Chugh and Khurana, 2003), зрели зародиши (Abumhadi et al. 2005; Sharma et al. 2005) и други, незрелите зародиши остават предпочитан изходен експлант при ечемика

(Dahleen and Bregitzer 2002, Chang et al. 2003).

Счита се, че генотипната зависимост е един от основните фактори влияещи, върху *in vitro* регенерацията на ечемика (Bregitzer, 1992; Jiang et al., 1998; Hussein et al. 2004; Serhantova et al. 2004). Друг важен фактор за калусната индукция и регенерация е състава на хранителната среда. Има данни, че увеличеното съдържание на *Cu* в средата повишава регенерационната честота в култура от незрели зародиши при ечемика (Dahleen, 1995).

Целта на настоящето проучване е да се установи регенерационната способност на три съвременни български сорта ечемик в култура от незрели зародиши на среда с нормално и с увеличено съдържание на *Cu* йони.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследването е проведено в биотехнологична лаборатория на Институт по земеделие гр. Карнобат. За изходен материал са използвани сортовете: Веслец (Запрянов и др., 1996), Перун (Навущанов и др., 1997) и Емон (Мерсинков, 2003). Донорните растения са отгледани при полски условия.

За индукцията на калус, поддържането му, регенерацията и вкореняването на регенерантите от трите сорта ечемик са използвани хранителни среди на основата на MS (Murashige and Skoog, 1962), които са изготвени в два варианта – със стандартната за MS концентрация на $CuSO_4 / 0,1 \mu M$ и с увеличена концентрация на $CuSO_4 / 5 \mu M$ (Dahleen, 1995).

Изолирането на незрелите зародиши (1-2 mm) се извършва приблизително 14 дни след оплождането. За калусна индукция се поставят по 20 броя експланти в едно петриево блюдо /15x100mm/, като на всеки вариант на средата и от всеки сорт се култивират по 140 незрелите зародиши. След 8 седмици култивиране се извършва отчитане на получения ембриогенен калус и той се прехвърля на среда за регенерация.

Използвана е система за култивиране на незрели зародиши ечемик разработена от Bregitzer et al. (1992), според която регенерацията протича на два етапа. През първия етап калусите се култивират в продължение на две седмици на среда без хормони и с увеличено съдържание на захароза (60 g/l), а през втория етап култивирането продължава на среда без хормони и с 30 g/l захароза в продължение на две до четири седмици. Отчитат се регенериралите растения и се прехвърлят на среда за вкореняване в епруветки за още 2-3 седмици.

Температурата през целият период на култивиране се поддържа 25°C, осветлението по време на калусната фаза и първия етап от регенерацията е $25 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ и продължителност 12 h, а през втория етап на регенерация и вкореняването е $125 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ и фотопериод- 16h светло и 8h тъмно.

За оценяване на разликите в калусообразуването и регенерацията между двата варианта на хранителна среда и между сортовете са използвани анализ на варианса и *t*-критерии (SPSS 12.0 for Windows).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

От Таблица 1. се вижда, че генотипът има статистически достоверно влияние върху общото калусообразуване, образуването на ембриогенен калус и растителната регенерация. Вариантите на хранителната среда и взаимодействието между генотипа и хранителната среда имат доказано влияние само върху растителната регенерация, но не и върху общото калусообразуване и образуването на ембриогенен калус.

Началото на интензивно калусообразуване се наблюдава няколко дни след въвеждане на незрелите зародиши в *in vitro* култура. Като ембриогенен калус се

определя калусът, който се отличава с бял до светло-жълт цвят и зърнеста, плътна структура. Неембриогеният калус е прозрачен до белезникав, с рехав, водниста консистенция.

Таблица 1. Средни квадрати от анализ на варианса на честотата на калусообразуване и регенерация

Източник на вариране	Индуциран калус	Ембриогенен калус	Регенерирани растения
Генотип	16.095*	72.881***	371.214***
Хранителна среда	0.095	0.595	244.024***
Генотип x Хранителна среда	2.952	0.452	48.595***

* $p \leq 5\%$; *** $p \leq 0.1\%$;

Процентът на експлантите, образуващи калус на двата варианта на хранителната среда; процентът на експлантите образуващи ембриогенен калус и процентът на ембриогения калус от общото количество индуциран калус са показани в Таблица 2. Сортовете Веслец и Перун не се различават съществено по способността си за индуциране на калус. Сорт Емон образува с около 6% по-малко общ калус в сравнение с Веслец и 11% в сравнение с Перун. При този сорт обаче процентът на ембриогения калус от общо индуцирания калус е по-висок от колкото при останалите два сорта, в резултат на което той доказано превъзхожда другите сортове по брой ембриогенни калуси на 100 култивирани зародиша (Таблица 3.). Получените при този опит резултати не показват пряка зависимост между общото количество индуциран калус и количеството на ембриогения калус. Липсата на такава зависимост е установена и от други автори (Hanzel, 1985; Bregitzer, 1992; Божанова и Граматикова, 1995; Klcova et al. 2004).

Таблица 2. Калусообразуване при трите сорта ечемик след 8 седмици култивиране

Сорт	Индукционна среда	% експлантите образуващи калус	% експлантите образуващи ембриогенен калус	% на ембриогения калус от общото количество калус
Веслец	MS	87.14	25.00	28.95
	MS+Cu	81.43	27.86	34.71
	Средно	84.29	26.46	31.83
Перун	MS	87.86	30.71	35.64
	MS+Cu	90.71	30.00	33.77
	Средно	89.29	30.36	34.71
Емон	MS	77.86	47.14	60.94
	MS+Cu	79.29	48.57	62.81
	Средно	78.58	47.86	61.88
Средно	MS	84.29	34.29	41.84
	MS+Cu	83.81	35.48	43.76

Таблица 3. Оценяване разликата в калусообразуващата способност на сортовете чрез t - тест

Сорт	Калусоиндукция		Ембриогенен калус		Ембриогенен калус/Общ калус	
	t	Доказаност	t	Доказаност	t	Доказаност
Веслец – Перун	1.18	-	1.18	-	0.605	-
Веслец –Емон	1.14	-	7.67	+++	7.275	+++
Перун– Емон	3.09	+	6.12	+++	5.983	+++

От проучваните генотипове най-висока регенерационна способност показва сорт Емон, след него се нарежда Перун и с най-малко регенеранти на 100 експланти е сорт Веслец (Таблица 4.). И при трите сорта добавянето на *Cu* йони към хранителната среда води до статистически достоверно повишаване броя на получените регенеранти (Таблица 5.).

Таблица 4. Растителна регенерация при сортовете Веслец, Перун и Емон

Сорт	Среда	Брой регенерати на 100 заложени експланти	Брой регенеранти /брой ембриогенни калуси
Веслец	MS	34.29	1.27
	MS+Cu	47.14	1.57
	Средно	40.72	1.42
Перун	MS	40.71	1.40
	MS+Cu	55.00	1.87
	Средно	47.86	1.64
Емон	MS	65.00	1.40
	MS+Cu	109.29	2.28
	Средно	87.15	1.84
Средно	MS	46.67	1.35
	MS+Cu	70.48	1.91

При Веслец това повишаване е с 37,5%, при Перун с 35,1% и при Емон с 59,5%. По-високата регенерационна способност на среда с по-висока концентрация на Cu^{2+} е в резултат на по-големия брой регенеранти, получени от един ембриогенен калус. По-висока регенерационна честота на среда с по-високо съдържание на Cu^{2+} отчитат Dahleen (1995), Bregitzer et al. (1998), Dahleen and Bregitzer (2002).

Таблица 5. Оценка на разликите в регенерационната способност върху двата варианта на средата при изпитваните сортове чрез t - тест

Сорт	Брой регенерати / брой заложени експланти		Брой регенеранти / брой ембриогенни калуси	
	t	Доказаност	t	Доказаност
Веслец MS – Веслец MS+Cu	5.05	+++	6.29	+++
Перун MS – Перун MS+Cu	4.45	++	5.54	+++
Емон MS – Емон MS+Cu	4.85	+++	2.79	+

Редица автори (Bregitzer et al., 1998; Ганушева, 2000; Dahleen and Bregitzer, 2002) докладват за регенерация на албино растения в култура от незрели зародиши. В нашето проучване сред регенерантите не са наблюдавани албино растения. Установени са различни фактори, които влияят върху регенерацията на албино растения, като стадия на развитие на експланта (Chang et al. 2003; Serhantova et al. 2004), генотипа (Bregitzer and Campbell, 2001; Wang et al., 2002), състава на хранителната среда (Bregitzer et al., 1998; Dahleen and Bregitzer, 2002).

Повечето изследователи считат, че генотипът е един от критичните фактори при *in vitro* регенерацията на ечемика (Hussein et al. 2004; Лъерhantovб et al. 2004; Abumhadi et al. 2005). Налице са изследвания, показващи че регенерационната способност в култура от незрели зародиши се контролира от редица гени, което определя и голямото вариране в *in vitro* отговора на различните сортове (Komasuda et al., 1989; Bregidzer, 1998; Mano et al., 1996). Наблюдаваните генотипни различия в регенерационната способност между сортове Веслец, Перун и Емон са в съответствие с резултатите от проучванията на горепосочените автори.

ИЗВОДИ

Според регенерационната си способност при изпитваната система за култивиране на незрели зародиши ечемик, проучваните сортове се подреждат в следната последователност: Емон>Перун>Веслец.

На средата с по-висока концентрация на *Cu* йони са регенерирани повече растения и при трите изследвани сорта. По-високото съдържание на *Cu*²⁺ в средата не повишава процентът на индуцираните ембриогенни калуси. По-добрата регенерационна способност се дължи на по-големия брой растения, които се получават от един ембриогенен калус.

ЛИТЕРАТУРА

- Божанова В., М. Граматикова (1995)** Калусогенез и регенерация на растения в култура от незрели зародиши при ечемик (*Hordeum vulgare* L.). Висш селскостопански институт - Пловдив, Юбилейна научна сесия, Сборник на докладите и резюметата, октомври 1995 г., том IV, кн.2, 319-324.
- Ганушева Н., Янчева С., Горастев Хр. (2000)**. Скрининг на регенерационната способност на незряло ембрио на зимен двуреден ечемик. Растениевъдни науки, 37, 847-849.
- Запрянов, С. и др. (1996)**. Биологични и стопански особености на зимния многореден ечемик сорт Веслец. Научни трудове, Том VII, Селскостопанска академия, София, 69-71.
- Мерсинков Н. (2003)** Зимен двуреден пивоварен ечемик сорт Емон. Растениевъдни науки, 40, 184-186.
- Навуцанов, Ст., Д. Вълчева, Др. Вълчев (1997)** Биологични и стопански особености на зимния двуреден ечемик сорт Перун, Растениевъдни науки, бр 1, 38-39.
- Abumhadi, N.; Kamenarova, K.; Todorovska, E.; Dimov, G.; Atanasov, A. (2005)** Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos (*Hordeum vulgare* L.) Biotechnology-and-Biotechnological-Equipment (2005). v. 19(3), 32-38.
- Bregitzer P., Dahleen L.S., Campbell R.D. (1998)** Enhancement of plant regeneration from embryonic callus of commercial barley cultivars. Plant Cell Rep., 17, 941-946.
- Bregitzer, Ph. (1992)** Plant regeneration and callus type in barley: Effect of genotype and culture medium. Crop Sci. 32, 1108-1112.
- Chang Y., Zitzewitz J., Hayes P.M., Chen T.H.H. (2003)** High frequency plant regeneration from immature embryos of an elite barley cultivars (*Hordeum vulgare* L. cv. Morex). Plant Cell Rep., 21, 733-738.
- Dahleen, L.S. (1995)** Improved Plant Regeneration from Barley Callus Cultures by Increased Copper Levels. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 43, 267-269.
- Dahleen, L.S. (1999)** Donor-Plant Environment Effects on Regeneration from Barley Embryo-Derived Callus. Crop Sci. 39, 682-985.
- Dahleen L.S., Bregitzer P. (2002)** An improved media system for high regeneration rates from barley immature embryo-derived callus cultures of commercial cultivars. Crop Sci., 42: 934-938.
- Ganeshan S., Bega M., Harwey B.L., Rosnagel B.G., Scoles G.J., Chibbar R.N. (2003)** Production of multiple shoots from thiadiazuron-treated mature embryos and leaf-base/apical meristems of barley (*Hordeum vulgare*). Plant Cell Tiss. Org. Cult., 73: 57-64.
- Hanzel, J. J., Miller, J. P., Brinkman, M. A. & Fendos, E. (1985)** Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. Crop Sci. 25, 27-31.
- Hussein, E.H.A. , Madkour M. A., Assem S.K., Radwan A.M.A. (2004)** Embryogenic callus formation and plant regeneration from immature embryos of some barley genotypes

(*Hordeum vulgare* L.). Arab J. Biotech., Vol. 7, 111-122.

- Jiang, W., Cho, M.-J., Lemaux, P.G. (1998)** Improved callus quality, prolonged regenerability in model, recalcitrant barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes. Plant Biotechnology, 15, 63-69.
- Klcova L., Havrlentova M. & J. Farago (2004)** Cultivar and environmental conditions affect the morphogenic ability of barley (*Hordeum vulgare*) scutellum-derived calli. Biologia, Bratislava, 59/4, 501-504.
- Komasuda, T., Enomoto, S., Nakajima, K. (1989)** Genetics of callus proliferation and shoot differentiation in barley. J. Hered. 80, 345-350.
- Mano, Y. and Komasuda T. (2002)** Identification of QTLs controlling tissue culture traits in barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor. Appl. Genet. 105, 708-715.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum, 15, 473-497.
- Sahrawat, A. K., Suresh Chand 2004** High frequency plant regeneration from coleoptile tissue of barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Science, Vol. 167, 27-34.
- Šerhantova V., Ehrenbergerova J., Ohnoutkova L. (2004)** Callus induction and regeneration efficiency of spring barley cultivars registered in the Czech Republic. Plant soil environ. 50, 56-462.
- Thomas M.R., Scott K.J. (1985)** Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus initiated from immature embryos and immature inflorescences of *Hordeum vulgare* L. J. Plant Physiol. 121, 159-169.
- Vitanova Z., Vitanov V., Trifonova A., Savova D. and A. Atanassov (1995)** Effect of 2,4-D precultivation on regeneration capacity of cultivated barley. Plant Cell Reports 14, 437-441.