

СЪЗДАВАНЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПЪРВИТЕ БЪЛГАРСКИ ДИХАПЛОИДНИ СОРТОВЕ ЗИМНА ОБИКНОВЕНА ПШЕНИЦА

**Иван Белчев, Иван Тодоров, Петър Иванов, Иванка Стоева,
Костадин Костов, Николай Ценов, Иван Панайотов,
Татяна Петрова, Илия Илиев, Ваня Иванова**
Добруджански земеделски институт, Генерал Тошево

Резюме

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.

Хаплоидията е най-бързият метод за привеждане на растенията от хетерозиготно в хомозиготно състояние и получаване на генетично стабилни (дихаплоидни) линии за научни и приложни цели. Култивирането на прашници при *in vitro* условия (антерна култура) предоставя възможност за регенерация на хаплоидни растения и превъръщането им в дихаплоидни линии в рамките на една генерация. В резултат на 20-годишна експериментална работа по антерна култура и интегриране на метода с конвенционалната селекция, в Добруджански земеделски институт са създадени три дихаплоидни сорта зимна обикновена пшеница. За индукция на калуси и ембриоиди е използвана хранителна среда Potato 2, а регенерацията на растения е осъществена върху хранителна среда 190-2. Удвояването на хромозомния брой на хаплоидните редгенеранти е проведено с разтвор на колхицин. Първият дихаплоиден сорт **“Полена”** е извлечен от 29 дихаплоидни линии, получени при култивиране на 1770 антери от кръстоската **“Кристал”** x **“Спартанка”**. Сортът е белокласа осилеста червенка и принадлежи към групата на средните по сила пшеници. В държавното сортопрепитване през 2000 и 2001 г. е показал среден добив 549.2 kg/dka, превишавайки с 4.5% стандарта за групата сорт **“Садово 1”**. Дихаплоидният сорт **“Антица”** е създаден от култивирането само на 390 антери от кръстоска на две конвенционални линии и последващ отбор от 29 дихаплоидни линии. Сортът е белокласа безосилеста червенка и е с отлични и добре балансираны хлебопекарни качества. През 2003 и 2004 г. е изпитан в девет пункта в страната, като е отчетен среден добив 538.8 kg/dka, с 6.5% над стандарта за групата на силните пшеници сорт **“Победа”**. Високопродуктивният дихаплоиден сорт **“Кристора”** е белокласа безосилеста червенка с много добра братяща способност. През 1998 г. е направена кръстоска между сортовете **“Кристал”** и **“Тодора”**. В същата година са отгледани донорни растения от кръстоската, като са култивирани 3900 антери, дали начало на 455 дихаплоидни линии. В държавното сортопрепитване през 2005 и 2006 г. е реализиран среден добив 733.8 kg/dka, надвишавайки с 10.8% стандарта за групата сорт **“Янтър”**. Сортът е получен по възможно най-краткия начин за 9-10 години, вместо за 13-14. Съчетаването на хаплоидията чрез антерна култура с конвенционалната селекция е предпоставка за съкращаване на многократния отбор и ускорено създаване на разнообразие от дихаплоидни линии с ценни стопански качества.

Ключови думи: Зимна обикновена пшеница – Антерна култура – Дихаплоидни сортове

Abstract

Belchev, I., I. Todorov, P. Ivanov, I. Stoeva, K. Kostov, N. Tsenov, I. Panayotov, T. Petrova, I. Iliev, V. Ivanova, 2009. Development and characterization of the first Bulgarian doubled haploid winter wheat varieties.

Haploidy is the fastest method for transference of plants from heterozygous to homozygous status and obtaining of genetically stable (doubled haploid) lines for scientific and applied purposes. Cultivation of anthers under *in vitro* conditions (anther culture) gives an opportunity for regeneration of haploid plants and their transformation into doubled haploid lines within one generation. Three doubled haploid winter wheat varieties were developed as a result from 20-year experimental work in anther culture and integration of the method to conventional breeding at Dobrudzha Agricultural Institute. Nutrient medium Potato 2 was used for induction of calli and embryoids, and regeneration of plants was realized on nutrient medium 190-2. Doubling of the chromosome number of haploid regenerants was carried out with colchicine solution. The first doubled haploid variety "Polena" was extracted from 29 doubled haploid lines obtained after cultivation of 1770 anthers from the cross "Kristal" x "Spartanka". The variety has white awned spike with red grain and belongs to the group of medium strong wheats. It gave mean yield 549.2 kg/dka, exceeding with 4.5% the standard variety "Sadovo 1" in the National Variety Testing in 2000 and 2001. The doubled haploid variety "Antitsa" was developed after cultivation of only 390 anthers from a cross of two conventional lines and subsequent selection in 29 doubled haploid lines. The variety has white awnless spike with red grain and has excellent and well balanced bread-making qualities. It was tested at nine locations in Bulgaria, giving a mean yield of 538.8 kg/dka, 6.5% above the variety "Pobeda" (standard for the group of strong wheats) in 2003 and 2004. The high yielding doubled haploid variety "Kristol" has white awnless spike with red grain and very good tillering capacity. A cross between the varieties "Kristal" and "Todora" was made in 1998. Donor plants from the cross were grown in the same year, and 3900 anthers were cultivated, from which 455 doubled haploid lines were produced. It realized a mean yield 733.8 kg/dka, exceeding with 10.8% variety "Yantar" (standard for the group) in the National Variety Testing in 2005 and 2006. The variety was developed in the shortest possible way, for 9-10 years instead of 13-14. The combination of haploidy by means of anther culture with conventional breeding is a prerequisite for shortening of repeated selection and accelerated development of a diversity of doubled haploid lines with valuable agronomic traits.

Key words: Winter wheat – Anther culture – Doubled haploid varieties

УВОД

Селекцията на растенията е продължителен и трудоемък процес, съчетаващ в единство две противоположни тенденции – акт на генериране на генетично разнообразие и дълъг период на отбор на потомства с ценни стопански признания до превръщането им в генетично стабилни линии. Сред съществуващите методи за ускорено получаване на изравнени линии, хаплоидията принципно е най-бързият начин за привеждане на растенията от хетерозиготно в хомозиготно състояние. Култивирането на прашници при *in vitro* условия (антерна култура) предоставя възможност за регенерация на хаплоидни растения и превръщането им в дихаплоидни линии в рамките на една генерация. Съдържащите се в антерите микроспори са особено чувствителни на различни въздействия, което определя изхода от антерното култивиране. Генотипът има доминираща роля върху проявленето на андрогенната реакция (Belchev et al. 2000), наред с условията на отглеждане на донорните растения (Orshinsky & Sadasivaiah 1997), съставът на хранителната среда (Stober & Hess 1997) и параметрите на култивиране (Xynias et al. 2001). Непрекъснатото оптимизиране

елементите на антерната култура за увеличаване продукцията на дихаплоидни линии прави метода достатъчно ефективен за селекционни цели. Практическо доказателство за целесъобразността на интегриране на антерната култура с конвенционалната селекция е изльчването на дихаплоидни сортове зимна обикновена пшеница в Китай (Hu 1986), Франция (De Buyser et al. 1987) и Унгария (Pauk et al. 1995). Същевременно нараства продукцията на нови дихаплоидни сортове и перспективни линии, заемащи обширни площи (Hu 1997). От зърнените култури в България единствено при ориза е получен дихаплоиден сорт в резултат на антерно култивиране (Бояджиев 1990).

Целта на настоящото изследване е да се опише създаването и направи характеристика на първите български дихаплоидни сортове зимна обикновена пшеница, резултат от съчетаване на биотехнологията с конвенционалната селекция.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Сортове и конвенционални линии зимна обикновена пшеница (*Triticum aestivum* L.) са включени в кръстоски, от които впоследствие са създадени дихаплоидните сортове “**Полена**” (“**Кристал**” x “**Спартанка**”), “**Антица**” (“**627/86-9-14**” x “**F302-K₄-221**”) и “**Кристора**” (“**Кристал**” x “**Тодора**”). От отгледаните при полски/оранжерийни условия F₁ донорни растения са взети класове, от тях при стерилни условия са изолирани антери и поставени върху хранителна среда Potato 2 (Chuang et al. 1978). След 30-дневно култивиране при 28°C индуцираните от микроспорите в антерите калуси и ембриоиди са прехвърлени върху регенерационната хранителна среда 190-2 (Zhuang & Jia 1983). Добре развитите зелени регенеранти са яровизирани в епруветките с хранителната среда при 4°C за 45 дни, след това са разсадени в почва и отгледани при 10-15°C. Във фаза братене корените на хаплоидните регенеранти са третирани с 0.1% разтвор на колхицин за 6 h за удвояване на хромозомния брой. Регенерантите отново са разсадени в почва и отгледани до зрелост при температура 15-22°C. През есента семената на дихаплоидните линии са засети на полето, като през следващата година са направени наблюдения и оценка. Дихаплоидните линии с добри стопански показатели са отбрани и включени в контролен питомник (КП), междуенно в предварителен сортов опит (ПСО) и три години в конкурсен сортов опит (КСО) при потвърждаване на резултатите. След този етап изявлените дихаплоидни линии са предложени за изпитване в пунктовете на Изпълнителната агенция по сортозпитване, апробация и семеконтрол (ИАСАС) за 2-3 години. Наблюденията, отчитанията и анализът на реакцията в антерна култура, ефективността на диплоидизацията, биологичните показатели, продуктивността, устойчивостта на болести и ниска температура, както и химико-технологичните свойства са проведени според възприетите стандартни методики.

РЕЗУЛТАТИ

Етапите на създаване на дихаплоидните сортове “**Полена**”, “**Антица**” и “**Кристора**” са представени в Таблица 1. През 1991 г. е направена кръстоска между сортовете “**Кристал**” и “**Спартанка**”. На следващата година от отгледаните при полски условия F₁ растения са взети класове и са култивирани 1770 антери. Индуцирани са 330 калуси и ембриоиди, от които са регенериирани 47 зелени и 5 албиносни растения. През 1993 г. хаплоидните зелени регенеранти са обработени с разтвор на колхицин, като са получени 29 дихаплоидни линии. Линиите с повече от 10 зърна са засети директно на полето, а слабо озърнените са размножени в оранжерия през 1993/94 г. На следващата година размножените в оранжерия линии са отгледани на полето и от тях е отбрана дихаплоидна линия “**308/14-28-2**”. Тя е изпитана в КП през 1996 г. и в КСО през следващите три години. Високите резултати в КСО дадоха основание линията да бъде предложена за изпитване като кандидат-сорт в мрежата на ИАСАС.

**Създаване и характеристика
на първите български дихаплоидни сортове зимна обикновена пшеница.**

През 2000 и 2001 г. кандидат-сорт “**Полена**” демонстрира добри продуктивни възможности и по-късно е признат за сорт. Целият период на създаване на дихаплоидния сорт “**Полена**” включва 11 години.

Таблица 1. Хронология на създаване на дихаплоидните сортове

“**Полена**”, “**Антица**” и “**Кристора**”

Table 1. Chronology of development of doubled haploid varieties
“**Polena**”, “**Antitsa**” and “**Kristora**”

Етап Stage	Година /Year		
	Дихаплоидни сортове Doubled haploid varieties		
	Полена Polena	Антица Antitsa	Кристора Kristora
Кръстоска / Cross	1991	1995	1998
Антерна култура / Anther culture	1992	1996	1998
Диплоидизация / Diploidization	1993	1996	1999
Селекционен питомник Breeding nursery	1994-1995	1997- 1999	2000
Контролен питомник Control nursery	1996	2000	2001
Конкурсен сортов опит Competitive variety trial	1997-1999	2001- 2002	2002- 2004
Държавно сортозпитване (ИАСАС) National Variety Testing (EAVTFISC)	2000-2001	2003- 2004	2005- 2006
Общ брой години за създаване Total number of years for development	11	10	9

През 1995 г. е оствърсвена кръстоска между конвенционалните линии “**627/86-9-14**” и “**F302-K₄-221**”, след което при оранжерийни условия са отгледани донорни растения за антерна култура. В началото на 1996 г. от кръстоската са култивирани само 390 антери, дали начало на 232 калуси и ембриоиди. От индуцираните ембриогенни структури са регенериирани 33 зелени и 55 албиносни растения. Впоследствие хаплоидните зелени регенеранти са обработени с разтвор на колхицин и получените 29 дихаплоидни линии са размножени в оранжерия през 1997 г. Следващата година е неуспешна за отбор поради нередовно поникване. През 1998/99 г. дихаплоидните линии отново са отгледани на полето и е отбрана линия “**12-8-10-1**”. Дихаплоидната линия е оценена в КП през 2000 г. и в КСО през следващите две години. Отличните резултати по отношение на добив и особено на химико-технологичните качества мотивираха предаването на дихаплоидната линия за изпитване в пунктовете на ИАСАС, където през 2003 и 2004 г. тя, като кандидат-сорт “**Антица**”, потвърди достойнствата си. Времето за създаване на дихаплоидния сорт “**Антица**” е 10 години.

Възможно най-бързо е изльчен дихаплоидният сорт “**Кристора**”. През пролетта на 1998 г. са кръстосани сортовете “**Кристал**” и “**Тодора**” и още същата година при оранжерийни условия са отгледани F₁ растения, от които са заложени 3900 антери. Индуцирани са 2719 калуси и ембриоиди, а в началото на 1999 г. са регенериирани 917 зелени и 467 албиносни растения. Извършена е обработка с разтвор на колхицин на хаплоидните зелени регенеранти, като в крайна сметка са получени 455 дихаплоидни линии. През есента са засети на полето и на следващата година е отбрана линия “**KT17/99-1**”. Дихаплоидната линия е изпитана в КП през 2001 г., а следващите три години в КСО. Високият добив на зърно бе предпоставка за включване на линията като кандидат-сорт в държавното сортозпитване през 2005 и 2006 г. Кандидат-сорт “**Кристора**” реализира значителен и стабилен добив в отделните пунктове и впоследствие е признат за сорт. Дихаплоидният сорт “**Кристора**” е

създаден само за 9 години.

Таблица 2. Биологични и стопански качества на дихаплоидните сортове
“Полена”, “Антица” и “Кристора”

Table 2. Biological and agronomic traits of doubled haploid varieties
“Polena”, “Antitsa” and “Kristolora”

Биологични и стопански качества Biological and agronomic traits	Дихаплоидни сортове Doubled haploid varieties		
	Полена Polena	Антица Antitsa	Кристора Kristolora
Ботаническа разновидност Varietas		<i>erythrospermum</i>	<i>lutescens</i>
Височина на растенията (cm) Plant height (cm)	82	96	98
Гъстота на посева (класове/m ²) Density of sowing (spikes/m ²)	617	536	705
Устойчивост на полягане (степен) Logging resistance (degree)	7-9	7-9	7-9
Вегетационен период (дни) Vegetation period (days)	219	234	240
Студоустойчивост (степен) Winter hardiness (degree)	висока high	средна medium	средна medium
Устойчивост на брашнеста мана, листна и стъблена ръжда (степен) Resistance to powdery mildew, leaf and stem rusts (degree)	средно medium	средно medium	средно medium
Добив на зърно (kg/dka) Grain yield (kg/dka)	549.2	538.8	733.8

В Таблица 2 са отразени някои биологични и стопански качества, характеризиращи новосъздадените сортове.

Дихаплоидният сорт “Полена” е белокласа осилеста червенка (var. *erythrospermum*) с височина на растенията около 82 см, със средна гъстота на посева при изklасяване и относително по-кратък вегетационен период. Другите два дихаплоидни сорта са от var. *lutescens* (белокласа безосилеста червенка), със сравнително близки стойности на височината на растенията и вегетационния период. И трите дихаплоидни сорта са устойчиви на полягане и средно устойчиви на нападение от причинителя на брашнестата мана (*Blumeria graminis* (DC) Speer f. sp. *tritici*), листната (*Puccinia recondita* Rob. & Desm. f. sp. *tritici*) и стъблена (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*) ръжда. Забележителна особеност на сорт “Полена” е по-високата студоустойчивост, а на “Кристора” – по-плътния стъблостой. През годините на държавното сортозпитване “Полена” показва среден добив на зърно 549.2 kg/dka, превишавайки с 4.5% сорт “Садово 1” – стандартата на групата на средните по сила пшеници. При сорт “Антица” е отчетен среден добив 538.8 kg/dka, с 6.5% над стандартата за групата на силните пшеници сорт “Победа”. Сорт “Кристора” реализира най-висок среден добив 733.8 kg/dka, като превишава с 10.8% стандарта за групата сорт “Янтър” (Бюлетин на ИАСАС 2000-2006). Разликите спрямо стандартите са достоверни.

От направените химико-технологични изследвания на хлебните дихаплоидни сортове (Таблица 3) се установява, че при “Полена” има съществено понижаване на масата на 1000 зърна и седиментационното число в сравнение със стандарта сорт “Садово 1”.

Същевременно значителните разлики по отношение размекване на тестото и обемен добив на хляба не са доказани. Силният сорт “Антица” впечатлява с

**Създаване и характеристика
на първите български дихаплоидни сортове зимна обикновена пшеница.**

достоверно увеличеното съдържание на сиров протеин и добива на мокър глутен. Химико-технологичните показатели са добре балансирани и се доближават до тези на стандарта сорт „Победа“. Продуктивният дихаплоиден сорт „Кристора“ е със скромни хлебопекарни качества и ниско съдържание на протеин, което го прави подходящ за производство на биоетанол.

**Таблица 3. Химико-технологична характеристика на сортовете стандарти за групите по качество „Sadovo 1“ и „Победа“
и дихаплоидните сортове „Полена“ и „Антица“**

**Table 3. Technological characterization of standard varieties
for the groups of quality „Sadovo 1“ and „Pobeda“
and doubled haploid varieties „Polena“ and „Antitsa“**

Показател Character	Средни по сила пшеници Medium strong wheats			Силни пшеници Strong wheats		
	Сад. 1 Sad. 1	Полена Polena	±	Поб. Pob.	Антица Antitsa	±
Маса на 1000 зърна (g) Thousand kernel weight (g)	44.5	39.8	4.7 **	42.6	45.3	2.7
Хектолитрова маса (kg) Test weight (kg)	81.2	80.2	1.0	78.3	78.8	0.5
Обща стъкловидност (%) Total vitreousness (%)	88	83	5	61	54	7
Съдържание на сиров протеин (% с.в.) Crude protein content (% d.m.)	11.6	11.7	0.1	13.9	15.0	1.1 *
Седиментационно число (cm^3) Sedimentation value (cm^3)	48	29	19 **	60	69	9
Добив на мокър глутен от зърното (%) Wet gluten yield in grain (%)	24.0	23.8	0.2	27.3	30.4	3.1 **
Образуване и устойчивост на тестото (min) Dough form and resistance (min)	4.0	3.4	0.6	5.3	5.4	0.1
Размекване на тестото (в. ед.) Dough softening (val. un.)	122	140	18	113	93	20
Валориметр. с-ст (усл. ед.) Valorimetric value (rel. un.)	49	44	5	55	59	4
Обемен добив на хляба ($\text{cm}^3/100\text{g}$) Loaf volume yield ($\text{cm}^3/100\text{g}$)	409	440	31	496	470	26
Формоустойчивост (h/d) Loaf ratio (h/d)	0.39	0.44	0.05	0.41	0.37	0.04
Обща органолептична оценка Total organoleptic evaluation	6.1	6.0	0.1	6.7	7.1	0.4

* , ** - доказаност на разликите съответно при $P=5$ и 1%

- significant differences at $P=5$ and 1% , respectively

ОБСЪЖДАНЕ

В резултат на 20-годишна експериментална работа по антерна култура и интегриране на метода с ковенционалната селекция, в Добруджански земеделски институт са създадени три сорта зимна обикновена пшеница с разнообразно съчетание на признаците. При сорт „Кристора“ напълно е реализирано голямото предимство на хаплоидията за съкращаване на времето за получаване на генетично стабилни линии. Чрез конвенционалния подход периодът за излъчване на сорт е 13-

14 години, а комбинирането му с антерна култура редуцира процеса до 9-10 години. При по-рано създадените дихаплоидни сортове "Полена" и "Антица" има известно забавяне поради технологични причини (малък брой семена, нередовно поникване).

Извличането на линии с ценни стопански качества от дихаплоидите е улеснено предвид по-малката необходима извадка. Убедителен пример са първите в света дихаплоидни сортове зимна обикновена пшеница "Jinghua №1" (Hu 1986), "Florin" (De Buyser et al. 1987) и "GK Delibab" (Pauk et al. 1995), които са селекционирани съответно от 28, 64 и 49 дихаплоидни линии. В настоящото изследване се потвърждава горната закономерност, като известно изключение е сорт "Кристора", отбран от 455 дихаплоидни линии. Следователно доброто познаване на родителските компоненти и тяхната комбинативна способност е определящо за ефективността на антерната култура. Получените чрез антерно култивиране линии не се отличават съществено от конвенционалните (Ma et al. 1999) и притежават сходен спектър на вариране на агрономичните показатели (Lokos Toth & Hasan 1999). В тази връзка съчетаването на хаплоидията чрез антерна култура с конвенционалната селекция е предпоставка за съкращаване на многократния отбор и ускорено създаване на дихаплоидни линии с ценни стопански качества.

ЛИТЕРАТУРА

- Бояджиев, П., 1990.** Мариана, нов сорт ориз, получен по метода на антерните култури. Растениевъдни науки 27: 111-113.
- Бюлетин на ИАСАС, 2000-2006.**
- 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.
- Chuang, C.C., Ouyang, T.W., Chia, H., Chou, S.M. and Ching, C.K., 1978.** A set of potato media for wheat anther culture. Proceedings of the Symposium on Plant Tissue Cultures, Science Press, Beijing, pp. 51-56.
- De Buyser, J., Y. Henry, P. Lonnet, R. Hertzog, and A. Hespel, 1987.** "Florin": A doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method. Plant Breeding 98: 53-56.
- Hu, D., 1986.** Jinghua №1, a winter wheat variety derived from pollen sporophyte. In: H. Hu and H. Yang (eds). Haploids of higher plants *in vitro*, pp. 137-148. China Academic Publishers, Beijing/Springer-Verlag, Berlin etc.
- Hu, H., 1997.** *In vitro* induced haploids in wheat. In: S.M. Jain et al. (eds). *In vitro* haploid production in higher plants, vol. 4, pp. 73-97. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Lokos Toth, K., and S. Hasan, 1999.** Determination of the variability of conventional and doubled haploid wheat species in three plant densities. Cereal Research Communications 27: 49-54.
- Ma, H., R.H. Busch, O. Riera-Lizarazu, H.W. Rines, and R. Dill-Macky, 1999.** Agronomic performance of lines derived from anther culture, maize pollination and single-seed descent in a spring wheat cross. Theoretical and Applied Genetics 99: 432-436.
- Orshinsky, B.R., and R.S. Sadasivaiah, 1997.** Effect of plant growth conditions, plant density, and genotype on the anther culture response of soft white spring wheat hybrids. Plant Cell Reports 16: 758-762.
- Pauk, J., Z. Kertesz, B. Beke, L. Bona, M. Csosz, and J. Matuz, 1995.** New winter wheat variety: "GK Delibab" developed via combining conventional breeding and *in vitro* antherogenesis. Cereal Research Communications 23: 251-256.
- Stober, A., and D. Hess, 1997.** Spike pretreatment, anther culture conditions, and anther culture response of 17 German varieties of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Breeding 116: 443-447.

- Xynias, I.N., I.A. Zamani, E. Gouli-Vavdinoudi, and D.G. Roupakias, 2001.** Effect of cold pretreatment and incubation temperatute on bread wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. Cereal Research Communications 29: 331-338.
- Zhuang, J.J., and X. Jia, 1983.** Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. In: H. Hu and M.R. Vega (eds). Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement, p. 431. Science Press, Beijing.