



Field Crops Studies

Volume X

No. 1

2016

***Изследвания
върху полските култури***

***Том X
Книжка 1***

2016

РЕДАКЦИОННА КОЛЕГИЯ:

Гл. РЕДАКТОР: Доц. д-р Юлия Енчева
РЕДАКТОРИ: Проф. д-р Маргарита Нанкова
Проф. д-р Валентина Енчева
Проф. д-р Емил Пенчев
Доц. д-р Татяна Петрова
Доц. д-р Генчо Милев

**ЕЗИКОВИ
РЕДАКТОРИ:** Катя Делчева
Соня Димитрова
гл. ас. д-р Даниела Вълкова

Издател: Добруджански земеделски институт
Редакция: Добруджански земеделски институт
гр. Генерал Тошево, 9520
тел.: +359 58 / 603 125; факс: +359 58 / 603 183
e-mail: fcs@dai-gt.org; <http://fcs.dai-gt.org/>
Корица: Катя Делчева, Стефан Димитров
Дизайн и предпечат: Катя Делчева, Стефан Димитров
Печат: "Нилекта Принт" ООД - гр. Добрич (+359 58 600 299)
ISSN 1312-3882

EDITORIAL BOARD:

EDITOR IN CHIEF: *Assoc. Prof. Julia Encheva*
EDITORS: *Prof. Margarita Nankova*
Prof. Valentina Encheva
Prof. Emli Penchev
Assoc. Prof. Tatyana Petrova
Assoc. Prof. Gencho Milev

**LANGUAGE
EDITORS:** Katia Delcheva
Sonia Dimitrova
Daniela Valkova

Publisher: Dobrudzha Agricultural Institute
Address: Dobrudzha Agricultural Institute
General Toshevo 9520
phone: +359 58 / 603 125; fax: +359 58 / 603 183
e-mail: fcs@dai-gt.org; <http://fcs.dai-gt.org/>
Cover design by Katia Delcheva & Stefan Dimitrov
Text design and typeset by Katia Delcheva & Stefan Dimitrov
Printed by Nilekta Print Ltd. - Dobrich (+359 58 600 299)
ISSN 1312-3882

**ХИСТОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА РЕГЕНЕРАНТИ ОТ СЛЪНЧОГЛЕД
(*H. ANNUUS L.*), ПОЛУЧЕНИ ЧРЕЗ *ИН ВИТРО* КУЛТИВИРАНЕ**

Юлия Енчева¹, Гуи Яо-лин², Лио Гонг-шъ²

1 - Добруджански земеделски институт, Генерал Тошево, България

2 - Институт по ботаника, Пекин, Китай

Резюме

Енчева, Ю., Яо-лин. Гуи, Гонг-шъ. Лио, 2016. Хистологично изследване на регенеранти от слънчоглед (*H. annuus L.*), получени чрез *ин витро* култивиране. FCS 10(1):121-126

Целта на настоящото хистологично изследване е да се установи анатомията на регенерантите, получени върху модифицираната от нас среда А1, а така също да се провери твърдението на авторите Freyssinet and Freyssinet (1988) за ембриогенния произход на получените от тях растения върху хранителни среди А0 и А2. Хистологичните изследвания са проведени в различни фази на онтогенетичното развитие на регенерантите. Клетъчното делене при култивиран незрял зародиш слънчоглед е наблюдавано след третия ден в култура. **Наблюдавано е формиране на млади адвентивни стъбла върху хранителни среди А0, А1 и А2, чийто проводящи тъкани нямат връзка с проводящите тъкани на експланта.** Този факт е доказателство за экзогенния произход на слънчогледовите стъбла. Множеството адвентивни стъбла възниква от големи, без белтък органогенни клетки с големи вакуоли и където растенията са формиранни чрез организация на стъблена меристема. Такива растения са лишени от химерна тъкан. **Развитие на израстъци (недиференцирани ембриоподобни структури) са наблюдавани с голяма честота в проведения от нас експеримент върху среди А0 и А2.** Разрязването на ембриоподобните структури показва множество ембриогенни клетки, малки по размер, богати на цитоплазма и белтък и с малки ядра, които се оцветяват лесно. Наблюдаван е единичен слънчогледов соматичен ембрион във фаза глобула, формиран върху среда А2 и с прилежащ суспенсор, което е доказателство за многоклетъчния му произход.

Ключовидуми: слънчоглед, *Helianthus annuus*, адвентивни пъпки, ембриогенезис, органогенезис

Abstract

Encheva, J., Gui Yao-lin, Liu Gong-she, 2016. *Histological investigation of sunflower regenerants, developed by in vitro cultivation.* FCS 10(1):121-126

The aim of presented histological investigation was to establish the regenerates anatomy, obtained on the modified culture medium A1 as well to check the statement of Freyssinet and Freyssinet (1988) for the embryogenic origin of the obtained by them plants on culture medium A0 and A2. The histological studies were carried out on different ontogenetic stages of regenerate's growth. The cell division of immature embryo of cultivated sunflower was observed on the third day in culture. Formation of young adventive stems was established on culture medium A0, A1 and A2. Their conductive tissues had no

connection to the conductive tissues of explant. That fact was an evidence for the exogenic origin of sunflower stems. The additive stems appeared from large, protein less cells, with large vacuoles. The plants were formed by stem meristem. Such plants distinguished by lack of himeric tissue. **Sprout growth (no differentiated embryo-like structures) were** observed very often during the experiment on culture medium A0 and A2. The embryo-like structures cutting showed multitude of embryogenic cells, small sized, rich of cytoplasm and protein with small nuclei, easily colored. A single sunflower somatic embryo was observed in phase globule, formed on culture media A2 with adjacent suspensor. That was an evidence for its multicellular origin.

Key words: sunflower, *Heliathus annuus*, adventive buds, embyogenesis, organogenesis

УВОД

Соматичният ембриогенез е *ин vitro* морфогенетичен отговор при който ембрионите са индуцирани от соматични клетки с по следваща регенерация в цели растения. (Williams & Maheswaran 1986). Като цяло процесът включва три основни етапа: индукция на ембриогенен калус, развитие и зреене на соматичните ембриони и превръщане на соматичните ембриони в растения.

Счита се, че индукционния период е най-важен за получаване на добре формирани ембриони. Избора на ауксини е много важен в индукционния процес и може да повлияе върху честотата и морфологията на соматичните ембриони. (Lazzeri *et al.* 1987, Levi and Sink 1991, Rodriguez and Wetzstein 1994, 1998).

Ранно разграничаване между процеса на органогенеза и ембриогенеза при култивирани незрели зиготни зародиши от слънчоглед отчита Jeannin *et al.*, 1993. Авторите платират експлантите върху два варианта на хранителна среда - с 3 % захароза и 12 % захароза. При хистологичните изследвания е наблюдавано клетъчно деление още на 12-я час след култивиране върху диференцирани епидермални и кортекоидни клетки. Върху хранителна среда с 12 % захароза е наблюдаван процес на ембриогенеза т.е. намаление в размера на клетките, плътна цитоплазма, големи ядра, натрупване на липиди и запасни протеини. Процеса на разграничаване между органогенеза и ембриогенеза може да се наблюдава два дни след култивиране на експлантите.

Соматичен ембриогенез *ин vitro* отчита Gui Yao-lin, 1987 при калусна култура от американски женшен. Авторите наблюдават всички основни етапи, като развитие и зреене на ембрионите и прорастването им в растения.

Соматичен ембриогенез при различни групи от банан успешно е постигнат от (Novak *et al.* 1989, Dedh'a *et al.* 1991, Côté *et al.* 1996, Escalant *et al.* 1994, Grapin *et al.* 1996), но прорастването в цели растения е незначително. Характеризирането на различните етапи на ембриогенезата може да помогне да се открият ограничаващите стъпки и да се локализира ембриогенетичните участъци на експлантите. Това от своя страна можа да помогне в определянето на стратегия за генетична манипулация на изходния материал.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Основна част от опитите са изведени в лабораторията по Биотехнология-Хъхохоута-северна Монголска провинция, Китай, а хистологичните изследвания са проведени в лабораторията на института по ботаника, Пекин, Китай.

Материал

За проучване на генотипната отзивчивост и регенерационния потенциал при *in*

in vitro - условия са отбрани осемнадесет самоопрашени линии слънчоглед *Helianthus annuus* L.: руски (Л-2128, Л-2052, К-821), Z-8-A- испанска, американски (RHA-801, RHA-275, RHA-857, HA-300), български (147 R, 158/1, 1395 R, 1028 R, 1028/1), китайски (171 R, 176 R, 101 B, 20 B, 40 B); четири китайски хибрида и сорта, съответно: 631, 635, 636, 641, 409, 415, 441, 504.

Образците са представени от ст.н.ст. II ст. д-р Фота Цветкова и проф. Лио Гонг-ше от Китай и са отгледани при полски и оранжерийни условия.

Методи

In vitro култивиране на незрели зиготни зародиши слънчоглед

За всеки вариант са изолирани и заложени по 3 повторения от 120 броя незрели зародиши. Процедурите по стерилизация са: 1/ 1 min в 95 % етанол / 2/ 15 min в разтвор от белина (2.7 % Cl) 3/ Неколкократно изплакване със стерилна дестилирана вода. Изолираните незрели зародиши са платирани върху хранителни среди за индукция на директен органогенез и соматичен ембриогенез в условията на тъмнина. Асептично изрязаните адвентивни пъпки или части от експланти с формирани върху тях соматични ембриони са преместени върху хранителна среда за доразвитие при условията на светлина. Получените растения с големина 2-5 cm са прехвърлени върху хранителна среда за вкореняване. Протоколите за индукция на адвентивни пъпки и соматични ембриони са по Freyssinet and Freyssinet, 1998 (хранителни среди A0 и A2 с 0.5 mg/l и 1 mg/l БАП, съответно, с 3900 mg/l Мио инозитол и добавени аминокиселини: 1000 mg/l L-Аланин, 800 mg/l L- Глутамин, 160 mg/l L-Триптофан и 50 mg/l L-Цистеин.

Модифицираната от нас хранителна среда A1 е с 0.5 mg/l БАП, с намалена концентрация на Мио инозитол от 3900 mg/l на 100 mg/l и отсъствие на аминокиселини.

За доразвитие на адвентивните пъпки и соматични ембриони е използвана хранителна среда SIM по Wilcox et al., 1988; а за вкореняване на растенията е приложен протокола на Wilcox et al., 1988 (хранителна среда R).

Хистологични изследвания са проведени в лабораторията по хистология към института по ботаника, Пекин, Китай по протокола на Gui Yao-lin, 1990.

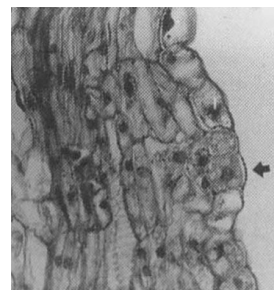
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Хистологични изследвания на адвентивни пъпки и соматични ембриони, индуцирани от незрял зародиш на слънчоглед

Целта на настоящото хистологично изследване е да се установи анатомията на регенерантите, получени върху модифицираната от нас среда A1, а така също да се провери твърдението на авторите Freyssinet and Freyssinet (1988) за ембриогенния произход на получените от тях растения върху хранителни среди A0 и A2.

а/ органогенез

Появата на органогенни структури при слънчогледа започва с диференциация на епидермалните клетки (фиг. 1). Разрязването на младите адвентивни пъпки (фиг. 2 и 3) показва, че епидермалния слой на стъблото е непрекъснат с епидермалния слой на хипокотилната част на незрелия зародиш (експлант). Хистологичните изследвания показват ясно формирана апикална меристема, листни примордия и следи от проводящи съдове.



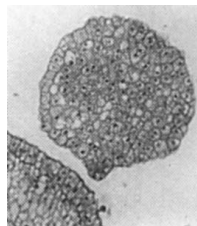
Фиг. 1. Изменени епидермални клетки с уголемени ядра.
Fig. 1. Changed epidermis calls with enlarged nucleus.

Когато е наблюдавана диференциация на проводящи тъкани в младите адвентивни стъбла е видимо, че те нямат връзка с проводящите тъкани на експланта, което е доказателство, че произхода на адвентивните стъбла е екзогенен. Подобни наблюдения има и Paterson (1984) при хистологични изследвания на адвентивни стъбла получени директно от листен експлант на млади растения слънчоглед.

Нашите изследвания показват, че органогенеза възниква от големи, без белтък органогенни клетки с големи вакуоли (фиг. 1). Този извод е потвърждение на резултатите на Vasil (1986), според който соматоналното вариране при семейство *Gramineae* възниква от органогенни клетъчни култури, които съдържат клетки с големи вакуоли и където растенията са формирани чрез организация на стъблена меристема. Такива растения според Lee (1997), са лишени от химерна тъкан.

б/ ембриогенез

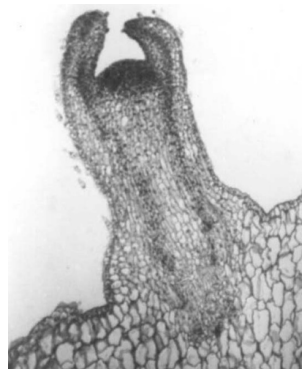
Разрязването на ембриоподобните структури показва множество ембриогенни клетки, малки по размер, богати на цитоплазма и белтък и с малки ядра, които се оцветяват лесно (фиг. 4 и 5). Клетъчното делене при култивиран незрял зародиш слънчоглед е наблюдавано след третия ден в култура. Наблюдавана е диференциация на епидермалния слой. Група от диференцирани съседни клетки се развиват в клетъчна маса, която в едни случаи се развива в ембриогенна меристема, в нашия случай глобуларен стадий на ембриона (фиг. 5), а в други в ембриоподобни структури без апикална и коренова меристема (6, 7). Развитие на израстъци (недиференцирани ембриоподобни структури) са наблюдавани с голяма честота в проведения от нас експеримент върху среди А0 и А2 (фиг.6 и 7). Подобно явление е наблюдавано при култивирани ризомни експлант от банан (Lee et al., 1997). Авторите наблюдават ембриоподобни структури без апикална меристема, които не прорастат до цяло растение.



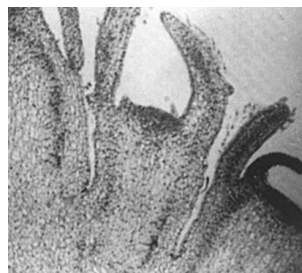
Фиг. 5. Ембрионид в стадий глобула с прилежащ суспенсор.

Fig. 5. Embryos at globular stage with adjoining suspensor.

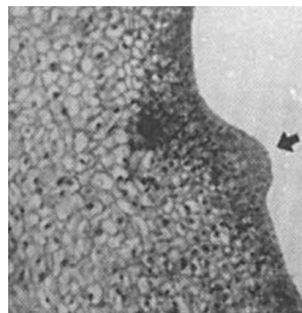
Един често дискутиран въпрос е дали формираните ембриони имат едноклетъчен или многоклетъчен произход. Според Williams and Maheswaran (1986) многоклетъчния произход на ембрионите е най-вероятен, когато те са снабдени с орган подобен на суспенсор. В потвърждение на гореспоменатите автори, проведеното от нас хистологично изследване, показва многоклетъчния произход на



Фиг. 2. Формиране на адвентивна пъпка.
Fig. 2. Formation of adventitious buds.

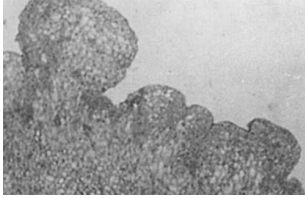


Фиг.3. Формиране на множество адвентивни стъбла.
Fig. 3. Formation of great number of adventitious buds.

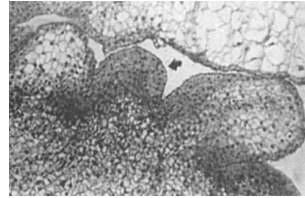


Фиг. 4. Меристемни клетки произлизащи от епидермалния слой на експланта.
Figure 4. Meristem cells derived from epidermis layer of the explant.

слънчогледовия соматичен ембрион във фаза глобула с прилежащ суспенсор (фиг. 5).



Фиг. 6. Формиране на неорганизиран еμβριоподобни структури.
Fig. 6. Forming of unorganized embryo like structure.



Фиг. 7. Множество еμβριоподобни структури.
Fig. 7. Great number of embryo like structure.

Формиране на соматични ембриони от калус на хипокотил при слънчогледа отчитат Paterson and Everett (1985). При разрез на двуседмичен калус са наблюдавани меристемни центрове, които наподобяват глобуларни и сърцевидни ембриони. Авторите представят случай на формиран ембрионид във фаза глобула с прилежащ суспенсор, което вероятно е доказателство за многоклетъчния му произход.

Директен соматичен ембриогенез при незрял зародиш слънчоглед отчита Finer (1987). Хистологичните изследвания разкриват класическите етапи на ембриогенеза. Соматичните ембриони в глобуларен стадий са продължение на епидермиса на изходните котиледони. Авторите показват слънчогледов соматичен ембрион във фаза торпедо. Същият притежава епидермален слой, котиледонни примордия, следи от проводящи съдове, както коренова и стъблена меристема. Finer (1987) не пояснява дали получените ембриони имат едноклетъчен или многоклетъчен произход.

По принцип, многоклетъчният произход води до формиране на химерни растения, за разхимерването на които е необходим дълъг процес на самоопрашване преди да се селектират желаните признаци.

Freyssinet and Freyssinet (1988) споменават за получаване на ембрио подобни структури след култивиране на незрели зародиши слънчоглед върху среди A0 и A2, но в същото време не са провели хистологични изследвания, които да потвърждават това. Следвайки протокола на гореспоменатите автори ние сме наблюдавали формиране на ембрио подобни структури без апикална и коренова меристема (които спират своето развитие), адвентивно пъпко образуване и само един случай на нормално развито ембрио във фаза глобула (фиг. 5).

Върху култивирани незрели зародиши слънчоглед на модифицираната среда A1 (без аминокиселини и намалена концентрация на Мио инозитол от 3.9 g/l до 0.1 g/l) е наблюдавано единствено формиране на адвентивни пъпки.

Проведените хистологични наблюдения, потвърждават органогенетичния път на формиране на получените от нас регенеранти върху среди A0, A1 и A2. Тези резултати, оборват твърдението на Freyssinet and Freyssinet (1988) за ембриогенен път на развитие на растенията получени върху среди A0 и A2.

От друга страна формирането на растения чрез организация на стъблена меристема, определя едноклетъчния им произход и отхвърля възможността за поява на химерни растения. Така мутантните растения могат да бъдат открити сред потомствата на самоопрашените регенеранти в по-ранен етап от тяхното развитие и да бъдат включени в селекционната програма на слънчогледа.

ЛИТЕРАТУРА

- Cote, F.X., Domergue, R., Monmarson, S., Schwendiman, J., Teisson, C. and Escalant, J.V. 1996. Embryogenic cell suspension from the male flower of *Musa* AAA cv. Grand Nain. *Physiologia Plantarum* 97: 285-290.
- Dedn'A, D., Dumortier, F., Panis, B., Vuylsteke, D. & De Langue, E. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. Bluggoe (*Musa* spp. ABB group). *Fruits* 46: 125-135.
- Escalant, J.V., Teisson, C. and Cote, F.X. 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 30: 181-186
- Finer Jhon J., 1987. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrids sunflower (*H. annuus*.L.) on high sucrose containing medium. *Plant Cell Reports*. 6: 372-374.
- Freyssinet, M. and G. Freyssinet, 1988. Fertile plant regeneration from sunflower (*H. annuus*.L.) immature embryos. *Plant Science*. 56: 177-181.
- Henderson, JHM, Durel M,E. and Bonner, J., 1952. The culture of normal sunflower stem callus. *Am. J. Bot.*39: 467-473.
- Grapin, A., Schwendiman, J. and Teisson, C. 1996. Somatic embryogenesis in plantain bananas. *In vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 32:66-71.
- Gui Yao-lin, Guo Zhong-shen, Xu Ting-yu and Gu Shu-rong, 1987. Embryogenesis of American Ginseng in vitro. *Acta botanica Scinica*, 29(2): 223-224.
- Jeannin, G., R. Brunner and G. Hahne, 1993. Early cytological discrimination between organogenesis and somatic embryogenesis induced on immature zygotic embryos on sunflower (*H. annuus* L.). *Biotechnology and biotechnological equipment*. 7: 96-99.
- Lazzeri, P.A., Hildebrandt, D.F. and Collins, G.B. 1987. Soybean somatic embryogenesis: effects of hormones and culture manipulations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*10: 197-208.
- Lee, K.S., F.J. Zapata-Arias, H. Brunner and R. Afza, 1997. Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. *Plant cell Tissue and Organ Culture*. 51: 1-8.
- Levi, A. and Sink, K.C., 1991. Histology and morphology of asparagus somatic embryos. *Hort Science* 26:1322-1324.
- Novak, F.J., Afza, R., Van Duren, M., PereaDallos, M., Conger, B.V. and Xiolang, T., 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA, AAA) and cooking (AAB) bananas. *Bio/Technology* 46: 125-135.
- Paterson, K. E., 1984. Shoot tip culture of *Helianthus annuus*. Flowering and development of adventitious and multiple shoots. *Amer. J. Bot.*, 71: 925-931.
- Rodriguez, A.P.M.A and Wetzstein, H.Y., 1994. The effect of auxin type and concentration on pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryo morphology and subsequent conversion into plants. *Plant Cell Reports* 13:607-611.
- Rodriguez, A.P.M.A and Wetzstein, H.Y., 1998. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Protoplasma* 204: 71-83.
- Vasil, I.K., 1986. Relative stability of embriogenic cultures of the Graminae and uniformity of regenerated plants. In; Semal, J. (ed). *Somaclonal variations and crop improvement*. Martinus Nijhoff. Dordrecht. pp 108-116.
- Williams, E.G. and G. Maheswaran,1986. Somatic embryogenesis factors influencing coordinated behaviour of cell as an embryogenic group. *Ann. Bot.*, 57: 443-462.
- Wilcox, A. McCann. Cooley G. and J. Van Dreser, 1988. A system for routine plantlet regeneration of sunflower (*Helianthus annuus* L.) from immature embryo derived callus. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 14: 103-110.