



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

**ПЕРСПЕКТИВНИ ЛИНИИ СЛЪНЧОГЛЕД ПОЛУЧЕНИ
ЧРЕЗ СЪЧЕТАВАНЕ МЕТОДИТЕ НА ОТДАЛЕЧЕНАТА
ХИБРИДИЗАЦИЯ И ЕМБРИКУЛТИВИРАНЕТО**

Даниела Вълкова, Нина Ненова, Валентина Енчева
Добруджански земеделски институт, Генерал Тошево

Резюме

Вълкова Д., Н. Ненова, В. Енчева. 2016. Перспективни линии слънчоглед получени чрез съчетаване методите на отдалечената хибридизация и ембрикултивирането. FCS 10(1):89-96

Осъществена е междувидова хибридизация между линии културен слънчоглед *Helianthus annuus* и образци от едногодишния див вид *Helianthus praecox*. F₁ хибридно поколение е получено чрез прилагане на техниката на ембрикултивиране. Получени са стабилизиращи линии, възстановители на фертилността, чрез продължително самоопрашване и отбор. Направена е биохимична характеристика на показателите, определящи съдържанието на масло в семената на проучваните линии. Линиите PR-5 и PR-10 се отличават с комплексна устойчивост към причинителите на мана, сиви и черни петна по слънчогледа и към паразита синя китка. Линии PR-4 и PR-8 се характеризират с високо съдържание на масло и устойчивост на мана и синя китка. Получените линии, резултат от успешно проведената междувидова хибридизация, са разнообразен изходен материал за разширяване възможностите на хетерозисната селекция за обогатяване на генетичната плазма на културния слънчоглед.

Ключови думи: слънчоглед- *Helianthus praecox*-устойчивост-R линии- *embryo rescue*

Abstract

Valkova D., N. Nenova, V. Encheva. 2016. Perspective sunflower lines obtained by combining the methods of interspecific hybridization and embryoculture. FCS 10(1):89-96

Interspecific hybridization was carried out between cultivated sunflower lines *Helianthus annuus* and accessions from wild annual species *Helianthus praecox*. F₁ hybrid progeny was obtained applying the techniques of embryo culture. Ten uniformed lines, restorers of fertility were produced by prolonged self-pollination and selection. Biochemical characteristic of characters, determined the seed oil content of studied lines was performed. Lines PR-5 and PR-10 were distinguished with complex resistance to the agents caused downy mildew, gray and black spots on sunflower and to the parasite broomrape. Lines PR-4 and PR-8 were characterized with high seed oil content and resistance to downy mildew and broomrape. The obtained lines, result of successfully applied interspecific hybridization, were varied initial material for widening the opportunities of heterosis breeding to enrich the geneplasm of cultivated sunflower.

Key words: sunflower- *Helianthus praecox*-resistance-R lines- *embryo rescue*

УВОД

Междувидовата хибридизация в род *Helianthus* предлага възможности за използване на разнообразието от богат генетичен материал и поставя предизвикателства, свързани с кръстосваемостта пред учените през последните десетилетия. Пръв Сацыперов през 1916 г. успешно кръстосва *H. annuus* с *H. argophyllus*. Стерилността на хибридите, абортирането на хибридно ембрио, получаването на семена с недоразвит ендосперм, както и продължителният период на покой на хибридните семена са бариера за успешното прилагане на междувидовата хибридизация. За нейното преодоляване важно значение има прилагането на метода ембриокултура, разработен за първи път от Chandler & Beard (1983). Espinasse *et al.* (1985) посочват, че развитието на слънчогледовите ембриони се определя от тяхната възраст, размер и форма по време на култивиране. Според Azpiroz *et al.* (1988) техниките на ембриокултивиране могат да бъдат ускорени до получаване на 4-5 поколения за година. Успешни резултати чрез прилагане на *embryo rescue* публикуват Denat *et al.* (1991), Kräuter *et al.* (1991), Sukno *et al.* (1999), Dagustu (2010). Ненова (2002) представя схема, включваща комбинирано използване на отдалечената хибридизация, ембриокултурата и класически селекционни методи и потвърждава, че методът на ембриокултурите е подходящ за получаване на хибридни растения в двете посоки на кръстосване на културния слънчоглед с дивите видове от род *Helianthus*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследването е проведено в Добруджански земеделски институт, Генерал Тошево в периода 2012-2015г. В него са включени образците от дивия вид *Helianthus praecox* Emgelm. & Gray E-147 (*H. praecox*, ssp. *praecox*), E-148 (*H. praecox*, ssp. *hirtus*), E-151 (*H. praecox*, ssp. *runyonii*) и стерилните аналози на две самоопрашени линии културен слънчоглед –705 А и 712 А, създадени в ДЗИ. Всеки образец от колекцията има свой каталожен номер, официален за регистъра на колекцията и фигуриращ в каталога на ФАО. Изборът на посочените образци е съобразен с това, че са рядко включвани в хибридизация и информация за техни хибриди се среща рядко в литературните източници. Междувидовите кръстоски по схемата културен слънчоглед x див вид са осъществени при полски условия чрез прилагане на утвърдена методика (Христов, 1990). За да се преодолеят трудностите при прилагане на методите на класическата селекция, свързани със слабо изразената кръстосваемост на културния слънчоглед и с цел да се получи максимален брой хибридни растения, бе приложен методът *embryo rescue* (Azpiroz *et al.* 1988, Ненова, 2002; Ненова и Друмева, 2012). Линии, възстановители на фертилността са създадени по метода на Христов и Петров (1988). Само фертилните F1 растения са самоопрашени под изолатори. Бекросиране, самоопрашване и индивидуален отбор са приложени за създаване на изравнени и стабилизиращи линии, характеризирани морфологично. Направена е биохимична характеристика на семената от получените линии. Съдържанието на ядката е определено чрез изчисляване съотношението на масата на ядките на проба от 50 въздушно сухи семена от всяка пита към масата на пробата, изразено в проценти. Съдържанието на масло в ядката е определено по метода на обезмасления остатък (Рушковский, 1957), като е приложен подобрения начин на изсушаване на смлените ядки при 800С за 4 часа (Стоянова и Иванов, 1968). Анализът за съдържание на протеин в ядката е извършен върху смяна и обезмаслена ядка, а съдържанието на общ азот - по метода Келдал, като е използван коефициент 6,25 за преизчисляването му в протеин. Резултатите са представени като процент белтък в обезмаслената ядка (Николова, 1987). Масата на 1000 семена

е определена на три проби по 50 семена от R линиите.

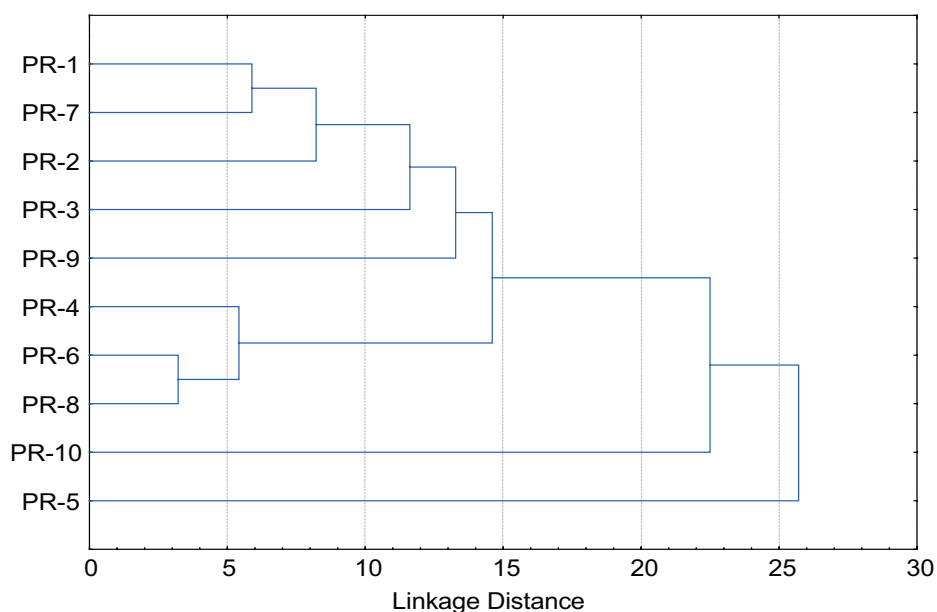
Изпитване на хибридните форми за определяне устойчивостта им към болести и паразита синя китка е осъществено като са приложени основни методи за оценка. Изпитването за устойчивост към мана (*Plasmopara halstedii* Farl. Berlese et de Toni) е извършено по стандартна методика (Vear, F., Tourvieille, D., 1987) адаптирана към условията за работа в ДЗИ – Ген. Тошево. Реакцията на изпитваните генотипи към раса 731 на патогена се изразява чрез показателя процент на устойчивост. Изпитването за устойчивост към сиви петна по слънчогледа *Phomopsis (Diaporthe) helianthi* Munt.-Cvet. et all. е извършено по метода на Encheva, V and I. Kiryakov, (2002) при полски условия, на изкуствен инфекциозен участък. Изпитването за устойчивост към черни петна по слънчогледа (*Phoma macdonaldii* Boerema / *Phoma oleracea* var. *helianthi-tuberosi* Sacc) е извършено при полски условия на изкуствен инфекциозен участък по метода на Fayralla and Maric (1981). Изпитването за устойчивост към синя китка (*Orobanchе cumana* Wallroth) е осъществено по стандартна методика / Панченко, А. Я., 1975/, видоизменена съобразно условията на работа в ДЗИ – Ген. Тошево. Оценката е направена при лабораторни условия. Реакцията на изпитваните генотипи към най-агресивната раса на патогена се изразява чрез показателя процент на устойчивост.

Статистическата обработка позволява анализиране на получените резултати чрез прилагане на различни математически методи, съобразени с целите на изследването. Определени са следните величини (Генчев и съавт., 1975): средна аритметична стойност (\bar{X})-характеризираща съвкупността като цяло и даваща представа за средното значение на признака, средно квадратно отклонение (Sd)-показващо с колко всеки вариант се отклонява от (\bar{X}), вариационен коефициент (VC) - показващ относителната изравненост, или вариабилност на изучаваните признаци. За групиране на признаците на проучваните линии в зависимост от средните им стойности, вариабилността и корелационните връзки е използван кластер анализ (STATISTICA) на основата на квадратичното Евклидово разстояние и претеглените центроидни двойки. Приложен е корелационен анализ за определяне на силата на зависимостта между проучваните метрирани статистически признаци.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Първоначалните кръстоски са извършени при полски условия. От всяка кръстоска са изолирани 12-15 зародиша и са култивирани върху твърда хранителна среда (Ненова, 2002). Малкият брой на получените зародиши след опрашване показва, че хибридизацията между културния слънчоглед и диплоидния див вид *H.praecox* е с нисък процент на оплождане и слаб завръз. В нашата практика сме наблюдавали абортиране на ембрионите, което наложи прилагането на метода *embryo rescue*. Най-подходящият срок за изолиране на ембрионите е 10-12-я ден след опрашване. F1 хибридни растения от всички кръстоски са получени в лаборатория и отгледани в оранжерийни условия. Процентът на получените хибридни растения варира от 12% до 45 %. Всички получени растения са разклонени, с едногодишен жизнен цикъл. Те достигат височина 165 cm. Разклоненията се развиват по цялото стъбло. Листата са с триъгълна форма, грапави отгоре и с власинки по долната страна, слабо до силно наъбени, заострени на върха и тъмно зелени на цвят по подобие на дивия вид. Езичестите цветчета са с дължина 3-5 cm, а броят им надвишава този при дивия вид. Тръбестите цветчета са с антоцианова пигментация. При културния слънчоглед антоцианова пигментация липсва и наличието ѝ е подходящ морфологичен маркер за ранно установяване на хибридният характер на получените F1 растения. Прилистниците, подобно на дивия вид са копиевидни, почти без власинки и с остър, извит връх. Получени са 23 хибридни растения, 13 от които са мъжко фертилни. Това доказва, че образците от дивия вид носят гени за възстановяване на фертилността

на ЦМС-Pet 1. Изолирани и самоопрашени са растенията, които отделят прашец. Получените от тях 41 броя семена са сиво черни. От тях са получени 18 F2 растения. Те се отличават помежду си по височината на главното стъбло, дължината на разклоненията и листните дръжки. Наблюдава се в различна степен изразена антоцианова пигментация. След опрашване на стерилни съцветия от линия 712 А с прашец от F1 растенията са получени 28 семена, като завръзът на семена е 12,5-17,2%. В морфологично отношение по-разнообразни са растенията, получени след самоопрашване и сестринско опрашване на хибридните растения от първа генерация в сравнение с ВС1 поколението. В резултат на продължителен отбор и самоопрашване са получени 10 изравнени линии, възстановители на фертилността, отличаващи се помежду си в морфологично отношение. Това е установено чрез направения кластерен анализ. Линиите са групирани по признаците височина на растенията, дължина и ширина на езичестите цветове, дължина и ширина на листа, дължина на листна дръжка, вегетационен период. На фиг. 1 е представена дендрограма на проучваните линии, които са групирани в 2 кластера чрез прилагане на Tree Diagram и определяне на Евклидовите разстояния. В първия кластер попадат линиите Pr-1, Pr-7, Pr-2, Pr-3 и Pr-9, като между първите две дистанциите са най-къси, а степента на подобие – висока. Във втория кластер попадат линиите Pr-4, Pr-6 и Pr-8. Линии Pr-10 и Pr-5 се препокриват отчасти с тях, което говори за общия им произход, но съществуващите дистанции показват настъпилите изменения, като резултат от продължителния отбор и самоопрашване.



Фиг. 1 Дендрограма на R линии, отличаващи се по морфологични признаци.
Fig. 1 Dendrogram of R lines, distinguished on their morphological characters.

Направена е биохимична характеристика на получените линии, възстановители на фертилността като са определени масата на 1000 семена, съдържанието на ядка и шлюпка, съдържанието на масло в ядката и семето, съдържанието на протеин. Коэффициентите на вариране са определени при статистическа достоверност $p=0,05$ на алтернативната хипотеза и се базират на междувидовия произход на линиите.

Таблица 1. Вариране на биохимични показатели на R линии.
Table 1. Variation coefficients of biochemical characters of R lines.

Показатели Characters	Ср. Стойност Mean	Min	Max	VC Вариационен коэффициент	Std. Dev.
Маса на 1000 семена,g 1000 seed weight,g	51,33	30	60	86,06	9,28
Ядка,% Kernel, %	76,62	73,3	84,6	11,3	3,36
Шлюпка,% Hull, %	23,38	15,4	26,7	11,3	3,36
Съдържание на масло в ядката,% Kernel oil content, %	62,65	55,9	69,7	15,17	3,9
Съдържание на масло в семето,% Seed oil content, %	48,07	44,4	52,3	5,66	2,38
Съдържание на протеин в обезмаслена ядка, % Protein content in unfatted kernel, %	58,98	54,2	64,7	10,61	3,26
Съдържание на протеин в ядката, % Protein content in kernel, %	22,23	17,6	30,4	10,63	3,26

Таблица 2. Корелационни коефициенти на биохимични показатели на R линии.
Table 2. Correlation coefficients of biochemical characters of R lines.

Показатели Characters	Маса на 1000 семена,g 1000 seed weight,g	Ядка,% Kernel, %	Шлюпка,% Hull, %	Съдържание на масло в ядката,% kernel oil content, %	Съдържание на масло в семето,% seed oil content, %	Съдържание на протеин в обезмасл ядка, % Protein content in unfatted kernel, %	Съдържание на протеин в ядката, % Protein content in kernel, %
Маса на 1000 семена,g 1000 seed weight,g	1,00						
Ядка,% Kernel, %	0,18	1,00					
Шлюпка,% Hull, %	-0,18	-0,98	1,00				
Съдържание на масло в ядката,% kernel oil content, %	0,31	-0,48	0,48	1,00			
Съдържание на масло в семето,% seed oil content, %	0,63*	-0,05	0,05	0,74*	1,00		
Съдържание на протеин в обезмаслена ядка, % Protein content in unfatted kernel, %	-0,53	-0,22	0,22	-0,22	-0,56	1,00	
Съдържание на протеин в ядката, % Protein content in kernel, %	-0,46	0,31	-0,31	-0,86**	-0,87**	0,41	1,00

Най-висок вариационен коефициент е определен за показателя маса на 1000 семена. Най-слабо вариране е отчетено по отношение на показателя съдържание на масло в семето. Това се дължи на постоянният отбор на високо маслени форми в процеса на самоопрашване. Наличието на корелационни зависимости между проучените показатели е представено чрез приложения корелационен анализ, а данните са изложени в таблица 2. Те доказват важноста на изследваните показатели и променливите величини при статистическа достоверност на ниво $p=0,001$. Силна и отрицателна е корелационната зависимост между съдържанието на шлюпка и ядка ($r=-0,98$); съдържанието на протеин и масло в ядката ($r=-0,86$); съдържанието на протеин в ядката и масло в семето ($r=-0,87$).

Продължителното самоопрашване и периодичен отбор е съпроводено с изпитване за наличие на устойчивост към основните патогени *Plasmopara halstedii* Farl. Berlese et de Toni, *Phomopsis (Diaporthe) helianthi* Munt.-Cvet. et all., *Phoma macdonaldii* Boerema / *Phoma oleracea* var. *helianthi-tuberosi* Sacc и към паразита синя китка (*Orobanche cumana* Wallroth). Резултатите от направената фитопатологична оценка са представени в таблици 3 и 4.

Таблица 3. Фитопатологична оценка на R линии за устойчивост към *Pl. helianthi*, *Or. cumana*

Table 3. Phytopathological evaluation of R lines for resistance to *Pl. helianthi*, *Or. cumana*

Устойчивост, % Resistance, %	Линия Line	Произход Pedigree
Устойчивост 100 % към <i>Pl. helianthi</i> Novot. и паразита <i>Orobanche cumana</i> Wallr. Resistance 100 % to <i>Pl. helianthi</i> Novot. and the parasite broomrape <i>Orobanche cumana</i> Wallr.	PR-5 PR-10	705 A x E-147 712 A x E-147
Устойчивост 100 % към <i>Pl. helianthi</i> Novot. и 76-99% към паразита <i>Orobanche cumana</i> Wallr. Resistance 100 % to <i>Pl. helianthi</i> Novot. and 76-99% to the parasite <i>Orobanche cumana</i> Wallr.	PR-4 PR-6 PR-8	705 A x E-148 712 A x E-147 712 A x E-151
Устойчивост 76-99% към <i>Pl. helianthi</i> Novot. и паразита <i>Orobanche cumana</i> Wallr. Resistance 76-99% to <i>Pl. helianthi</i> Novot. and to the parasite <i>Orobanche cumana</i> Wallr.	PR-1 PR-2 PR-3 PR-7 PR-9	705 A x E-147 705 A x E-151 712 A x E-151 712 A x E-147 712 A x E-148

Таблица 4. Фитопатологична оценка на R линии за устойчивост към *Ph. helianthi*, *Ph. macdonaldii*

Table 4. Phytopathological evaluation of R lines for resistance to *Ph. helianthi*, *Ph. macdonaldii*

Тип на реакция Type of reaction	Линия Line	Произход Pedigree
Устойчиви към <i>Phomopsis helianthi</i> и <i>Phoma macdonaldii</i> / Resistant to <i>Phomopsis helianthi</i> and <i>Phoma macdonaldii</i>	PR-5 PR-10 PR-6	705 A x E-147 712 A x E-147 712 A x E-147
Средно устойчиви към <i>Phomopsis helianthi</i> и <i>Phoma macdonaldii</i> / Medium resistant to <i>Phomopsis helianthi</i> and <i>Phoma macdonaldii</i>	PR-4 PR-8 PR-3	705 A x E-148 712 A x E-151 712 A x E-151
Средно чувствителен към <i>Phomopsis helianthi</i> и <i>Phoma macdonaldii</i> / Medium susceptible to <i>Phomopsis helianthi</i> and <i>Phoma macdonaldii</i>	PR-1 PR-2 PR-7 PR-9	705 A x E-147 705 A x E-151 712 A x E-147 712 A x E-148

ИЗВОДИ

Линии PR-5 и PR-10 не само се отличават морфологично от останалите проучвани линии, но се характеризират с устойчивост към причинителите на мана, сиви и черни петна по слънчогледа и към паразита синя китка. Тези линии ще бъдат включени в селекционните програми за създаване на устойчиви хибриди с висок продуктивен потенциал. Линии PR-4, PR-6 и PR-8 се характеризират с устойчивост към икономически важни болести и паразита синя китка по слънчогледа, повишено съдържание на масло и могат да бъдат използвани като изходен материал в селекцията на слънчогледа.

Методът ембриокултура е подходящ за получаване на добри резултати при междувидовата хибридизация когато се цели преодоляване на некръстосваемостта на културния слънчоглед и дивия вид *Helianthus praecox* Emgelm. & Gray. Чрез прилагане на метода *embryo rescue* са получени хибридни растения от кръстоски с участието на образци от дивия вид *Helianthus praecox* Emgelm. & Gray.

Получените линии, резултат от проведената междувидова хибридизация, са разнообразен изходен материал за разширяване възможностите на хетерозисната селекция за обогатяване на генетичната плазма на културния слънчоглед.

ЛИТЕРАТУРА

- Генчев, Г., Е. Маринков, В. Йовчева, А. Огнянова, 1975. Биометрични методи в растениевъдството, генетиката и селекцията. Земиздат, София, 320 с.
- Ненова, Н., 2002. Съчетаване методите на междувидовата хибридизация с *in vitro* техники за обогатяване генома на културния слънчоглед (*H. annuus* L.) .- Дисертация за присъждане на образователната и научна степен "Доктор", София, 2002, 179 стр.
- Ненова, Н., М. Друмева, 2012. Комбинирано прилагане на различни методи за създаване на устойчиви на икономически важни болести и паразити линии, възстановители на фертилността при слънчогледа. Трети международен научен конгрес „50 години Технически Университет Варна“, стр. 140-142.
- Николова, В., 1987. Проучване върху възможността за селекция на слънчогледа с различен мастнокиселинен състав на маслото. Дисертация за присъждане на научната степен "Кандидат на селскостопанските науки", София, 1987.
- Панченко, А. Я., 1975. Вестник сельскохозяйственной науки, № 2.
- Русшковский, С. В., 1957. Методы исследования при селекции масличных растений на содержание масла и его качество.-М., Пищепромиздат. Стоянова, Й., П. Иванов, 1968. Проучвания върху подготовката на семената от слънчогледа за лабораторно определяне на маслеността им.-Растениевъдни науки, год. 5, № 4: 49-57.
- Христов, М., 1990. Проучване на диви видове от род *Helianthus* с оглед използването им в селекцията на слънчогледа.-Дисертация за присъждане на научната степен "Кандидат на селскостопанските науки", София, 1990. 200 стр.
- Христов, М., П. Петров, 1988. Нови източници на Rf гени за ЦМС на основата на *Helianthus petiolaris*. Генетика и селекция, 21 (5): 44-49.
- Azpiroz, H.S., P. Vincourt, H. Serieys, 1988. Utilisation of "in vitro" test as an early screening technics for drought stress evaluation in sunflower. In: Proc.12th Sunflower conf. Int., Novi Sad Yugoslavia, 1988 : 207-13.
- Chandler, J.M., B.H. Beard, 1983. Embryo culture of *Helianthus* hybrids. Crop Sci. 23: 1004-1007.
- Encheva, V., I. Kiryakov, 2002. Method for evaluation of sunflower resistance for *Diaporthe (Phomopsis) helianthi* Munt. Cnet. et al. Bulgarian Journal of Agricultural

Science 8:219-222.

Espinasse, A., C. Lay, C.D. Dybing, 1985. Factors controlling in vitro development of sunflower embryos. *Agronomie* 5:825-832.

Dagustu N., M. Sincik, G. Bayram, M. Bayraktaroglu, 2010. Regeneration of fertile plants from sunflower (*Helianthus annuus* L.) - immature embryo. *Helia*, 33 (52), p.p. 95-102.

Denat, J. F., M. Coumans, H. Serieys, R. Jonard, 1991. Définition d'un milieu de culture permettant le développement d'embryons immatures de tournesol de 3 jours. Application à l'obtention d'hybrides interspécifiques. *C. R. Acad. Sci. Paris* 313(III), p. 145–151.

Kräuter, R., A. Steinmetz, W. Friedt, 1991. Efficient interspecific hybridization in the genus *Helianthus* via "embryo-rescue" and characterization of the hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 82: 521-525.

Sukno, S., J. Ruso, C.C. Jan, J.M. Melero-Vara, J.M. Fernandez-Martinez, 1999. Interspecific hybridization between sunflower and wild perennial *Helianthus* species via embryo rescue. *Euphytica* 106: 69-78.

Vear, F., D. Tourvieille, 1987. Test de resistance au Mildiou chez le tournesol.- CETIOM. *Information techniques*, vol.98, p.p.19-20.