РАСТЕНИЕВЪДНИ НАУКИ, ГОД. LII, No. 4
PLANT SCIENCE, VOL. LII, No. 4
София. 2015. Sofia

ПРОУЧВАНЕ НА ХИБРИДЕН МАТЕРИАЛ, ПОЛУЧЕН С УЧАСТИЕТО НА ОБРАЗЦИ ОТ ВИДА *H. debilis* T. & G.

ДАНИЕЛА ВЪЛКОВА*, НИНА НЕНОВА, ЮЛИЯ ЕНЧЕВА, ГАЛИН ГЕОРГИЕВ, ВАЛЕНТИНА ЕНЧЕВА, ЕМИЛ ПЕНЧЕВ, НУРЕТТИН ТАХСИН
Добруджански земеделски институт, Генерал Тошево
*E-mail: valkova_d@abv.bg

Study of Hybrid Material Obtained with the Participation of *H. debilis* T. & G. Accessions

D. Valkova*, N. Nenova, J. Encheva G. Georgiev, V. Encheva, E. Penchev, N. Tahsin
Dobroudja Agricultural Institute, General Toshevo, Bulgaria

Abstract

Hybrid material with resistant type of reaction to leaves pathogens, obtained with participation of wild annual *H. debilis* accessions was obtained. Hybrid combinations, bearers of Rf genes, were established. The obtained hybrid forms were distinguished with seed oil content up to 47% as well as higher seed protein content. The interspecific hybrid forms, obtained with participation of four sterile analogues of cultivated sunflower lines, were distinguished with various morphological and phenological characteristics. Hybrid combinations with varied genetic potential, suitable to be included as initial material in the breeding programs were selected.

Key words: hybridization, *Helianthus debilis*, seed oil and protein content

Изучаването на генетичния потенциал на дивите видове от род *Helianthus* е обект на редица проучвания, насочени към създаване на устойчиви към биотичен и абиотичен стрес хибридни форми, отличаващи се с разнообразен мастнокиселинен състав. Характеризирането на дивите видове от род *Helianthus* от биоморфологична и фитопатологична гледна точка спомага за обогатяване информацията за дивите родственици на слънчогледа и улеснява избора на подходящ изходен материал за селекцията на тази култура. Видът *Helianthus debilis* включва пет подвида (Schilling and Heiser, 1981). Той е проучван от много изследователи. Те съобщават за получени хибриди с негово участие, характеризиращи се с устойчивост към фомопсис (Skoric, 1985) и паразита синя китка (Christov et al., 1997), толерантност към склеротиния (Christov, 1996a), засушаване и засоляване на почвата (Serieys, 1980), и др., Цветкова и Шопов (1976) използват образци от вида като източници на Rf гени, а Christov (1996b) получава нов източник на ЦМС чрез прилагане на междувидова хибридизация.

Целта на настоящото проучване беше получаване на хибридни форми чрез прилагане на класически методи на междувидова хибридизация и тяхното характеризиране от морфологична, фенологична и биохимична гледна точка.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследването е проведено в Добруджански земеделски институт, Генерал Тошево. В него са включени стерилните аналози на четири самоопрашени линии културен слънчоглед – 217 А, 807 А, 1017 А, 3607 А и образците Е-012, Е-137 (*H. debilis*, ssp. *cucumerifolius*), Е-138 и Е-139 (*H. debilis*, ssp. *silvestris*). Семената от образците от вида *H. debilis* се отглеждат в оранжерийни условия и се разсаждат на полето във фаза втора-трета двойка същински листа. Междувидовите кръстоски по схемата *културен слънчоглед* × *див вид* са осъщест-

вени при полски условия и семена от F_1 хибридни растения, получени чрез прилагане на класически селекционни методи (Христов, 1990). Подбраните образци от дивия вид са с устойчив тип на реакция към листни патогени (Енчева и Вълкова, 2012; Encheva et al., 2012).

Изучените морфологични и фенологични показатели на хибридните растения са съобразени с методиките на FAO и IBPGR. Съдържанието на ядка и шлюпка (%) е определено чрез изчисляване отношението 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 подобреният начин на изсушаване на смелените ядки при 80 ºС за 4 часа (Стоянова и Иванов, 1968). Анализът за съдържание на протеин в ядката е извършен върху смляна и обезмаслена ядка, а съдържанието на общ азот – по метода Келдал, като е използван коефициент 6,25 за преизчисляването му в протеин (Николова, 1987). Резултатите са представени като процент белтък в обезмасления ядка. Масата на 1000 семена е определена на три проби по 25 или 50 семена от хибридните растения. Изпитването за устойчивост към мана (*Plasmopara halstedii* Farl. Berlese et de Toni) е осъществено по стандартна методика (Vear, Tourvieille, 1987) адаптирана към условията за работа в ДЗИ – Генерал Тошево. Реакция-та 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 al. е извършено по метода на Encheva and Kiryakov (2002) при полски условия на изкуствен инфекциозен участък. Изпитването за устойчивост към синя китка (*Orobanche cumana* Wallroth) е осъществено по стандартна методика (Панченко, 1975), която е видоизменена (не по същество) съобразно условията на работа в ДЗИ – Генерал Тошево. Оценката е направена при лабораторни условия. Реакцията на изпитваните генотипи към раса G на патогена е изразена чрез показателя процент на устойчивост.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Кръстоски от типа *културен слънчоглед* × *див вид* са получени с участието на образци от вида *Helianthus debilis.* Данните за кръстосваемостта между образците от дивия вид и културния слънчоглед са представени в табл. 1. Резултатите от хибридизацията показват, че степента на кръстосваемост варира от 36,4% за кръстоските *H. annuus* × Е-138, до 100% за комбинациите с участието на образците Е-137 и Е-139. Завръзът на семена от една пита (процентът на осеменяване) е няколко пъти по-нисък и варира от 4,3% за кръстоската 1017 А × Е-138, до 8,4% за кръстоската 217 А × Е-137. Установени са различия в жизнеността на хибридните семена. Процентът на получените хибридни растения варира от 21,4% за хибридната комбинация 3607 А × Е-138 до 47,1% за комбинацията 807 А × Е-139.

Направена е морфологична и фенологична характеристика на растения от проучените хибридни комбинации. Те имат изправено и разклонено стъбло, със слабо до силно изразен антоцианов оттенък. При културния слънчоглед липсват признаци като разклоненост и наличие на антоцианова пигментация, а са типични за дивия вид. Наличието им е подходящ морфологичен маркер за ранно установяване хибридния характер на F_1 растенията.

На табл. 2 е представено варирането по основните фенологични фази на родителските форми и F_1 хибриди. Варирането в стойностите на вариационния коефициент при бащиния родител – дивият вид не са високи. Вегетационният период на хибридите е по-къс от този на образците от дивия вид *Helianthus debilis* и варира от 110 – 125 дни за по-ранните до 140 – 150 дни за по-късните потомства. Вариране по този показател се наблюдава и между растенията от една и съща хибридна кръстоска.

Образците не се отличават съществено по фенологични фази помежду си за разлика от получените F_1 хибридни форми, които се характеризират с различна продължителност на фазите начало на бутонизация, продължителност на цъфтеж и вегетационен период.

Направена е оценка на варирането и сходствата на някои показатели, свързани със съдържанието на масло и протеин в семената при хибридните кръстоски с участието на образците от вида *Helianthus debilis.*

Проучени са показателите маса на 1000 семена, процентно съдържание на ядка и шлюпка, съдържание на протеин и съдържание на масло в ядката и семената (табл. 3). Кое-

Таблица 1. Кръстосваемост на дивия вид *H. debilis* с линии културен слънчоглед (*H. annuus*)
Table 1. Crossability of wild *H. debilis* species with cultivated sunflower lines (*H. annuus*)

Hybrid combination	Polinated inflorescences			Obtained seeds			Obtained hybrid plants	
	total number	with seeds		average per head	total number	seed set, %	total number	toward seeds, %
		number	%					
217 A x E-012	3	2		16	32	6.4	12	37.5
807 A x E-012	2	2		14	28	5.2	10	35.7
1017 A x E-012	3	1		13	13	5.1	4	30.8
3607 A x E-012	3	2		15	30	5.6	10	33.3
H. annuus x E-012	**11**	**7**	**63.6**	**14.5**	**103**	**5.8**	**36**	**34.3**
217 A x E-137	3	3		35	105	8.4	48	45.7
807 A x E-137	2	2		28	56	6.4	22	39.3
1017 A x E-137	3	3		21	63	7.6	28	44.4
3607 A x E-137	3	3		24	72	7.5	30	41.7
H. annuus x E-137	**11**	**11**	**100**	**27**	**296**	**7.5**	**128**	**43.1**
217 A x E-138	3	1		20	20	5.4	5	25.1
807 A x E-138	2	1		22	22	4.7	6	27.3
1017 A x E-138	3	1		14	19	4.3	7	36.8
3607 A x E-138	3	1		19	14	4.8	3	21.4
H. annuus x E-138	**11**	**4**	**36.4**	**18.7**	**75**	**4.8**	**21**	**27.6**
217 A x E-139	3	3		40	120	8.3	55	45.8
807 A x E-139	2	2		34	68	7.1	32	47.1
1017 A x E-139	3	3		30	90	6.7	40	44.4
3607 A x E-139	3	3		32	96	7.4	40	41.7
H. annuus x E-139	**11**	**11**	**100**	**34**	**374**	**7.4**	**167**	**44.7**

Таблица 2. Вариране на основните фенологични фази при проучваните F_1 хибриди
Table 2. Variation of the main phonological stages in the studied F_1 hybrids

Characters	**P1**			**P2**			**F_1**		
	cultivated sunflower (*H. annuus* L.)			*H. debilis*			***H. annuus* × *H. debilis***		
	$\bar{x}$	SD	VC	$\bar{x}$	SD	VC	$\bar{x}$	SD	VC
Emergence, days	9.71	0.37	3.31	13.08	1.93	14.75	12.31	1.11	9.59
Beginning of button formation, days from emergence	41.95	1.46	3.29	55.5	2.35	4.24	47.22	9.22	19.63
Beginning of flowering, days from emergence	52.91	4.07	7.31	79.08	3.89	4.93	61.12	11.55	15.77

Следва продължение/To be continued

Flowering, days	5.33	0.81	13.61	84.03	5.07	6.04	55.15	10.19	18.58
Beginning of maturity of the main head, days from emergence	94.95	5.72	6.44	89.83	4.91	5.47	91.19	10.58	11.79
Vegetation period, days	111.9	5.71	5.33	171.75	5.17	3.01	147.33	26.27	17.79

Таблица 3. Вариране на показатели, свързани със съдържанието на масло и протеин в семената при хибридни кръстоски с участието на образци от вида *H. debilis*
Table 3. Variation of characters, connected to seed oil and protein content in hybrid crosses with accessions of *H. debilis* species

Characters	Min	Max	$\bar{x}$	SD	VC
1000 seeds weight, g	27.2	78.5	73.3	22.1	27.3
Kernel content,%	56.7	74.8	65.5	3.9	6.9
Hull content,%	26.6	44.6	34.5	3.8	11.8
Kernel oil content, %	44.9	63.7	55.6	5.2	9.2
Seed oil content,%	30.2	43.6	36.8	3.6	9.7
Protein in defatted kernel, %	56.6	76.9	66.9	5.5	7.7
Protein content in the kernel,%	23.9	40.9	31.5	4.3	13.6

Таблица 4. Корелационни коефициенти между показатели, свързани със съдържанието на масло и протеин в семената при хибридни кръстоски с участието на образци от вида *H. debilis*
Table 4. Correlation coefficients between characters, connected to seed oil and protein content for hybrid crosses with accessions from *H. debilis* species

Characters	1000 seed weight, g	Kernel content, %	Hull content, %	Kernel oil content, %	Seeds oil content, %	Protein content in the defatted kernel, %
Kernel content,%	-0.37	1				
Hull content,%	0.37	-1***	1			
Kernel oil content, %	-0.26	0.34	-0.34	1		
Seeds oil content, %	-0.27	0.64**	-0.64**	0.87***	1	
Protein content in the defatted kernel,%	0.22	-0.28	0.28	-0.60**	-0.59**	1
Protein content in kernel,%	0.30	-0.36	0.36	-0.71**	-0.64**	0.77***

*** Proved at P = 0.01; *** Proved at P = 0.001.*

фициентите на вариране са определени при статистическа достоверност на ниво p = 0,05 на алтернативната хипотеза и се базират на популационния характер на бащиния родител – дивият вид. Висок коефициент е определен за показателя маса на 1000 семена. Стойностите на вариационния коефициент, отчетени за останалите показатели не са високи. Това показва, че няма голямо вариране между проучваните хибридни комбинации по тези показатели. С относително по-високо съдържание на масло са комбинациите с участието на образци Е-137 и Е-139.

Наличието на корелационна зависимост между проучваните показатели е установено чрез приложения корелационен анализ (табл. 4).

Таблица 5. Параметри, характеризиращи изходните родителски форми и техните F_1 хибриди
Table 5. Parameters, characterized initial parental forms and their F_1 hybrids

Characters	P1			P2			F_1				
	cultivated sunflower (*H. annuus* L.)			*Helianthus debilis* T. & G.			***Helianthus annuus* × *Helianthus debilis***				
	$\bar{x}$	SD	VC	$\bar{x}$	SD	VC	$\bar{x}$	SD	VC	d/a	H^2
Plant height, cm	113	14.4	12.9	126.32	15.41	12.20	139.47	15.3	11.1	-1.22h	0.91
Stem – diameter, cm	3.1	0.31	9.7	1.05	0.11	10.68	1.98	0.2	9.9	-0.14i	0.92
Number of branches	-	-	-	16.38	1.86	11.34	14.6	2.2	14.1	-0.87d	0.91
Length of the longest branch	-	-	-	74.33	20.65	27.78	71.3	17.8	19.7	-1.44h	0.91
Leaf – length, cm	25.9	2.1	8.3	7.92	1.79	22.60	16.12	3.7	23.4	-0.09i	0.94
Leaf – width, cm	25.6	1.2	4.9	5.31	1.10	20.64	12.41	1.8	14.1	-0.27i	0.94
Leaf petiole – length, cm	13.8	1.4	9.5	6.36	1.37	21.56	14.24	2.5	16.6	1.15h	0.92
Head diameter, cm	19	2.2	11.4	1.71	0.16	9.31	5.49	1.7	32.7	-0.57pd	0.89
Bract leaves – number	66.7	5.5	8.9	34.42	2.18	6.34	47.27	5.9	13.2	-0.45i	0.95
Bract leaves – length, cm	5.7	0.3	6.6	1.31	0.17	13.12	2.23	0.4	15.8	-0.42i	0.96
Bract leaves – width, cm	2.6	0.3	12.9	0.28	0.03	10.14	1.1	0.3	31.4	-0.21i	0.94
Bract leaves – tip length, cm	1.3	0.5	19.8	0.33	0.04	12.46	0.71	0.1	29.7	-0.11i	0.92
Ray flowers – number	44.4	3.9	8.2	14.14	1.68	11.89	20.54	4.3	17.5	0.19i	0.94
Ray flower – length, cm	6.4	0.4	10.2	2.35	0.30	12.81	4.15	0.7	16.9	-0.22i	0.88
Ray flower – width, cm	2.2	0.2	9.3	0.61	0.12	20.38	1.33	0.2	16.2	0.32i	0.89
Number of disk flowers	1567.2	254.1	16.1	106.89	8.55	8.00	469	120.6	26.1	-0.49i	0.97
Number of inseminated disk flowers	1275.1	301.1	25.7	10.67	2.97	27.88	44.27	11.7	28.1	-0.96d	0.91
1000 seed weight, g	97.1	8.2	8.8	4.32	0.54	12.59	39.63	8.7	23.1	-0.51i	0.88

I – intermediate; pd – partial dominance; d – dominance; h – heterosis.

Таблица 6. Фитопатологична оценка на F_1 хибридно поколение за устойчивост към *Pl. helianthi* и паразита *Orobanche cumana*
Table 6. Phytopathological evaluation of F_1 hybrid progeny for resistance to *Pl. helianthi* and the parasite *Orobanche cumana*

Resistance, %	Hybrid combination		Total number
Resistance 100 % to *Pl. helianthi* Novot. and 76 - 99% to parasite *Orobanche cumana* Wallr.	217 A × E-137 807 A × E-137 3607 A × E-137	217 A × E-139 807 A × E-139 1017 A × E-139	6
Resistance 76 - 99% to *Pl. helianthi* Novot. and parasite *Orobanche cumana* Wallr.	217 A × E-012 807 A × E-012 3607 A × E-138	807 A × E-138 3607 A × E-138	5

Таблица 7. Фитопатологична оценка на F_1 хибридно поколение за устойчивост към *Phomopsis helianthi* Munt.-Cvet. et al. и *Phoma macdonaldii* Boerema
Table 7. Phytopathological evaluation of F_1 hybrid progeny for resistance to *Phomopsis helianthi* Munt.-Cvet. et al. and *Phoma macdonaldii* Boerema

Type of reaction	Hybrid combination		Total number
Immune to *Phomopsis helianthi* and *Phoma macdonaldii*	217 A × E-137 807 A × E-137 3607 A × E-137	217 A × E-139 807 A × E-139 3607 A × E-139	6
Resistance to *Phomopsis helianthi* and *Phoma macdonaldii*	217 A × E-012 807 A × E-012 3607 A × E-012	217 A × E-138 807 A × E-138 1017 A × E-138	6

Висока отрицателна корелационна зависимост е установена за показателя съдържание на протеин и съдържание на масло в ядката (r = -0,71) и масло в семето (r = -0,64). Съдържанието на масло в семената е с висока положителна корелационна зависимост спрямо показателите съдържание на ядка (r = 0,64) и масло в ядката (r = 0,87).

На табл. 5 са представени данни за родителските форми и F_1 хибридите по проучваните признаци. Бащиният родител – дивият вид и F_1 комбинациите се характеризират с най-висока стойност на VC за признака брой осеменени тръбести цветове, като за хибридните растения той е по-висок. Съществено вариране по признаците диаметър на питата, дължина на връхчето и ширина на прицветните листа е отчетено при хибридите за разлика от родителските форми. Стойностите на коефициента на наследяване в широк смисъл за изучаваните признаци са високи. Хибридните растения се отличават с ясно изразен хетерозисен ефект по отношение на признаците височина на растението, дължина на най-дългото разклонение и дължина на листната дръжка. Доминиране към бащиния родител – дивия вид, е установено по отношение броя на разклоненията и броя на осеменените тръбести цветове, а частично доминиране – по отношение на признака диаметър на питата. По отношение на останалите проучвани признаци F_1 хибридите са от междинен тип.

В F_1 потомствата се срещат стерилни и фертилни растения. Наличието им доказва, че образците от дивия вид *Helianthus debilis* имат гени за възстановяване на фертилността на ЦМС-Pet 1. Резултатите от наблюденията показват, че възстановяването на фертилността на тестера е от 40 до 90% за *H. debilis*, ssp. *cucumerifolius* (образци Е-012 и Е-137) и от 35 до 75% за *H. debilis*, ssp. *silvestris* (образци Е-138 и Е-139). Наличието на фертилни и стерилни растения в една и съща кръстоска се обяснява с популационния характер на образците от дивия вид.

Реакцията на изучаваните хибридни материали към патогените *Plasmopara helianthi*, *Phomopsis helianthi*, *Phoma macdonaldii* и паразита *Orobanche cumana* е проучена с цел да се определи дали устойчивостта, установена за образците Е-012, Е-137, Е-138 и Е-139 е прехвърлена в хибридния материал. Обобщените резултати от направената фитопатологична оценка са представени в табл. 6 и 7.

Хибридните форми с участието на образците Е-012, Е-137, Е-138 и Е-139 се характеризират с устойчивост към икономически важни болести и паразита синя китка по слънчогледа и могат да бъдат използвани като изходен материал.

ИЗВОДИ

Колекцията на ДЗИ – Генерал Тошево разполага с разнообразие от образци от дивия вид *Helianthus debilis* T. & G., които могат да бъдат използвани като донори за устойчивост към икономически важни болести по слънчогледа и на Rf гени за възстановяване фертилността на CMS PET1.

Получени са хибридни F_1 растения с разнообразни морфологични, фенологични и биохимични характеристики. Установената реакция на хибридните растения към фома, фомопсис, мана и паразита синя китка е от значение за правилния избор на донори за устойчивост в селекционната работа по слънчогледа. Направените анализи показват, че получените хибридни материали са с различен генетичен потенциал по отношение на изявата на изучаваните признаци.

ЛИТЕРАТУРА

Енчева В., Д. Вълкова. 2012. Оценка за устойчивост на едногодишни диви видове слънчоглед към причинителя на сивите петна *Phomopsis Diaporthe helianthi* Munt.-Cvet. et al. *Селскостопанска наука*, 45 (4), 13-18

Николова, В. 1987. Проучване върху възможността за селекция на слънчогледа с различен мастнокиселинен състав на маслото. Дисертация. София.

Стоянова, Й. и П. Иванов. 1968. Проучвания върху подготовката на семената от слънчогледа за лабораторно определяне на маслеността им. *Растениевъдни науки*, 5, № 4, 49-57

Христов, М. 1990. Проучване на диви видове от род *Helianthus* с оглед използването им в селекцията на слънчогледа. Дисертация. София.

Цветкова, Ф. и Т. Шопов. 1976. Характеристика на някои видове от род *Helianthus* с оглед на използването им при селекцията. *Растениевъдни науки*, 13, № 9, 11-14

Панченко, А. Я. 1975. Вестник сельскохозяйственной науки, № 2.

Рушковский, С. В. 1957. Методы исследовании при селекции масличных растений на содержание масла и его качество*. Пищепромиздат*, Москва.

Christov, M. 1996a.Characterization of wild *Helianthus* species as sources of new features for sunflower breeding. In P. D. S. Caligari & D. J. N. Hind (Eds). Compositae: Biology & Utilization. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, 1994. (D. J. N. Hind, Editor-in-Chief), vol. 2, p. 547-570. Royal Botanic Gardens, Kew.

Christov, M. 1996b. Hybridization of cultivated sunflower and wild *Helianthus* species. In P. D. S. Caligari & D. J. N. Hind (Eds). Compositae: Biology & Utilization. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, 1994. (D .J. N. Hind, Editor-in-Chief), vol. 2, p. 603-615. Royal Botanic Gardens, Kew.

Christov, M., L. Nikolova, T. Djambasova and V. Venkov. 1997. Evaluation and use of wild *Helianthus* species, grown in the collection of IWS “Dobroudja”, Gen. Toshevo, Bulgaria for 1995-1996. FAO Progress Report 1995-1996, Giessen, Germany, 1997, p. 22-37

Encheva, V., D. Valkova, G. Georgiev, M. Christov. 2012. Sources for resistance to the leaves pathogens caused grey (*Phomopsis helianthi*), brown (*Alternaria* sp.) and black (*Phoma macdonaldi*) spots on sunflower originated from the wild species *Helianthus annuus* L. Proc. 18th ISC - Mar del Plata, February 27 - March 1, 2012, Argentina, p. 205-210

IBPGR. 1985. Descriptors for cultivated and wild sunflower. AGPG. IBPGR/85/54, Roma, Italy.

Schilling, E. E. and Ch. B. Heiser. 1981. Infrageneric classification of *Helianthus (Compositae)*. *Taxon*, vol. 30, 2, p. 393-403

Serieys, H. 1980. Utilisation des especе sauvage D’*Helianthus* pour L’amelioration du tournesol cultive. In: IX Conferencia Int.del Girasol., Torremolinos, España, t. I, p. 107-121

Skoric, D. 1985. Sunflower breeding for resistance to *Diaporthe* (*Phomopsis*) *helianthi* Munt-Cvet. *Helia*, 8: 21-24