Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 18, 5, 2015, (802-815)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

СРАВНИТЕЛНО ИЗПИТВАНЕ НА ПОТОМСТВА ПРИ МЕЖДУРОДОВА И ВЪТРЕВИДОВА ХИБРИДИЗАЦИЯ НА МНОГОГОДИШНИ ЖИТНИ ТРЕВИ

Анелия Кътова

Институт по фуражни култури, ул."Ген. Владимир Вазов" 89, 5800 Плевен, България
E-mail: katova66@abv.bg

INTERGENERIC AND INTRASPECIFIC COMPARATIVE PROGENY TESTING OF PERENNIAL GRASSES

Aneliya Katova

Institute of Forage Crops, 89 "General Vladimir Vazov" Str., 5800 Pleven, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

В Институт по фуражните култури, Плевен са проведени междуродови (*Lolium perenne* x *Festuca arundinacea, Festuca pratensis*, *Festuca rubra)* и вътревидови кръстоски за получаване на хибриди *Festulolium* и F_1 с комплексна устойчивост. През 2012 г. е заложен полски опит с цел сравнително изпитване на потомствата на 14 варианта с общо 350 индивидуални растения, засадени в схема 50x50 cm. Фамилиите са изпитани по морфологични признаци за вегетативно и генеративно развитие, зимоустойчивост, толерантност на засушаване и високи летни температури, нападение от ръжди при естествен инфекциозен фон, фенофази на развитие и хабитус. Представени са средни, минимални, максимални стойности, стандартни отклонения и коефицент на вариране за 2013 г. и 2014 г. по признаците: височина на растенията, дължина и ширина на втори лист, ширина на туфата, продуктивност на семена и елементите ú: брой генеративни стъбла (класове или метлици), брой класчета в клас (метлица), дължина на класа, тегло на семената от растение и масата на 1000 семена. Установено е

SUMMARY

Intergeneric (*Lolium perenne* x *Festuca arundinacea, Festuca pratensis*, *Festuca rubra)* and intraspecific crosses were carried out to obtain *Festulolium hibrides and* F_1 from interploidy crosses with complex resistance at the Institute of Forage Crops, Pleven. Parental components had different origin, ploidy level and maturity group. Field trial was established in 2012 with the aim for comparative progeny testing. Working scheme involved 14 variants, 350 individual plants in total, planted in 50x50 cm distance. The families were evaluated by morphological characters for vegetative and generative development, winter hardiness, drought and high summer temperature tolerance, rust attack under natural infection background, stages of development and habit. The average, minimum and maximum values, standard deviation and coefficient of variation during 2013 and 2014 years by the traits: plant height, length and wide of flag leaf, tuft wide, seed productivity and it's elements: number of generative stems (ears and panicles), number of spikelets in ear or panicles, ear length, and seed weight per plant, thousands seed weight were presented. The high genetic

голямо генетично разнообразие между потомствата. Резултатите са обработени с програмата Statgraph. Проведен е ANOVA еднофакторен вариационен анализ по всеки отделен признак и множествен ранг тест. Като обобщен израз за генетичното родство и отдалеченост са резултатите от клъстърен анализ в дендрограми с по 2 основни клъстъра, в първи са включени варианти 1, 2 и 3 потомства от типа *Festuca rubra*, подходящи за декоративни цели, а всички останали в направление за фураж. Вторият клъстър има подклъстъри на няколко нива, със сходства и раздалеченост на базата на съответните признаци изразено чрез Евклидовото разстояние.

Ключови думи: многогодишни житни треви, междувидови и вътревидови кръстоски, потомства, клъстърен анализ, фестулолиум

diversity between progenies was found. Results were processed by the program STATGRAPH. One-way ANOVA for 14 variants by each trait and multitude rang test at 95% LSD were done.

The results from the Cluster analysis as the general expression for genetic relationship and distance were shown as the dendrograms with two main clusters – first – the 1, 2 and 3 progenies by the type *Festuca rubra*, suited for ornamental (amenity) use, and second – all other progenies suitable for forage use. The second cluster had the sub clusters in different levels, with the similarity and difference on the base of the characters defined as Euclidian distance.

Key wards: perennial grasses, intergeneric and intraspecific crosses, progenies, cluster analysis, *Festulolium*

УВОД

Глобалното затопляне на климата е сериозен аргумент за издирване на видове с повишена адаптивност и висок продуктивен потенциал. В тази връзка е неоходимо генетично подобряване на многогодишните житни фуражни култури и създаване на нови сортове с повишена толерантност на суша и ефективност на използване на водата, с високо качество на фуража. Чрез отдалечена хибридизация, полиплоидизация и интрогресия между пасищен райграс и тръстиковидна, ливадна или червена власатка (*Lolium – Festuca*) комплекс се постига нов растителен вид *Festulolium*, съчетаващ отлични фуражни качества и висока стресоустойчивост (към суша, студ, патогени). Този ком-

INTRODUCTION

The global warming of climate is a serious argument for searching plant species with higher adaptivity and high productive potential. With regard to this the genetic improvement of perennial forage grasses and development of new varieties with higher drought tolerance, water use efficiency and high forage quality is necessary. The new plant species *Festulolium*, combined excellent forage qualities and high stress resistance (for drought, cold, patogenes) is create by intergeneric hybridization, polyploidization and introgression between perennial ryegrass and tall, meadow and red fescue (*Lolium – Festuca*).

This complex represent unlimited

плекс представлява неограничен източник на зародишна плазма и е обект на проучване в световен план (Thomas and Humphreys, 1991; Yamada et al., 2005). Humphreys et al. (2001) в проекта SAGES съчетават конвенционалната селекция и естественото биоразнообразие в Европа за създаване на висококачествени многогодишни житни треви, адаптирани към различни абиотични стресови фактори, използвайки нова технология и уникалната възможност между видовете *Lolium* и *Festuca* да се разкрие комплекса признаци свързани с устойчивостта на стрес. Установяват се възможностите на отдалечената хибридизация между пасищен райграс и тръстиковидна и ливадна власатка за получаване на различни типове хибриди *Festulolium* и изпитване на потомствата им.

Селекционните цели за междуродовите кръстоски са:

⇒ при хибридизация на пасищен райграс и ливадна власатка – повишаване на зимоустойчивостта;

⇒ пасищен райграс и тръстиковидна власатка – сухоустойчивост;

⇒ пасищен райграс и червена власатка – декоративност.

При вътревидовите кръстоски с

⇒ пасищен райграс – на диплоидно ниво целта е чрез комбинативна селекция постигане на толерантност на засушаване,

source of germplasm and is object for researching in a world plan (Thomas and Humphreys, 1991; Yamada et al., 2005).

Humphreys et al. (2001) in the project SAGES combined conventional breeding and natural biodiversity in Europe for developing high quality perennial grasses adapted to different abiotic stress factors, using new technology and unique possibility between species *Lolium* and *Festuca* to bring to knowledge the complex of the traits connected to stress resistance. In our study we searching possibility of intergeneric hybridization between perennial ryegrass and tall and meadow fesque for increasing resistance to abiotic and biotic stress by obtaining different type hybrids *Festulolium* and testing their progenies.

The breeding aims for intergeneric crosses were:

⇒ For hybridization between perennial ryegrass and medow fescue – Increasing winter hardiness;

⇒ perennial ryegrass and tall fescue – drought resistance;

⇒ perennial ryegrass and red fescue – ornamental qualities.

For intraspecific crosses between

⇒ perennial ryegrass – diploid level the aim was by combinative breeding to obtain drought tolerance, persistence, ornamental

дълготрайност, декоративност;

⇒ на тетраплоидно ниво – толерантност на засушаване, устойчивост на ръжди, високо качество на фуража.

А при вътревидовите, интерплоидни кръстоски -

⇒ мейотични тетраплоиди и

⇒ трансфер на гените stay – green – за запазване на зеления цвят при стареене, суша, зимни условия.

qualities;

⇒ for tetraploid level – drought tolerance, rust resistance, high forage quality.

For intraspecific, interploid crosses -

⇒ meotic tetraploids and

⇒ transfer of the genes “stay – green” – preservation of the green colour in senescence, drought and winter conditions.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проведени са междуродови (*Lolium perenne* x *Festuca arundinacea, Festuca pratensis*, *Festuca rubra)* и вътревидови кръстоски за получаване на хибриди *Festulolium* и F_1 с комплексна устойчивост. През 2012 г. е заложен полски опит с цел сравнително изпитване на потомствата на 14 варианта с общо 350 индивидуални растения, засадени на разстояние 50x50 cm. Фамилиите са изпитани по морфологични признаци за вегетативно и генеративно развитие, зимоустойчивост, толерантност на засушаване и високи летни температури, нападение от ръжди при естествен инфекциозен фон, фенофази на развитие и хабитус. Представени са средни, минимални, максимални стойности, стандартни отклонения и коефицент на вариране за 2013 г. и 2014 г. по признаците: височина на растенията, дължина и ширина на втори лист, ширина на

MATERIAL AND METHODS

Intergeneric (*Lolium perenne* x *Festuca arundinacea, Festuca pratensis*, *Festuca rubra)* and intraspecific crosses were made for obtaining hybrids *Festulolium and* F_1 with complex resistance. Field trail was established in 2012 with the aim for comparative progenies testing of 14 variants with 350 individual plants in total, planted in a distance 50x50 cm.

The families were evaluated by morphological characters for vegetative and generative development, winter hardiness, drought and high summer temperature tolerance, rust attack under natural infection background, stages of development and habit. The average, minimum and maximum values, standard deviation and coefficient of variation during 2013 and 2014 years by the traits: plant height, length and wide of flag leaf, tuft wide, seed productivity and it’s elements: number of generative

туфата, продуктивност на семена и елементите й: брой генеративни стъбла (класове или метлици), брой класчета в клас (метлица), дължина на класа, тегло на семената от растение и масата на 1000 семена. Установено е голямо генетично разнообразие между потомствата. Резултатите са обработени с програмата Statgraph. Проведен е ANOVA еднофакторен вариационен анализ за 14 варианти по всеки отделен признак и множествен ранг тест за доказаност на разликите (LSD) при 95%. Като обобщен израз за генетичното родство и отдалеченост са резултатите от кластърен анализ, представени като дендрограми.

stems (ears and panicles), number of spikelets in ear or panicles, ear length, and seed weight per plant, thousands seed weight were presented.

The high genetic diversity between progenies was found.

Results were processed by the program Statgraph. One-way ANOVA for 14 variants by each trait and multitude rang test at 95% Least Significant Difference (LSD) test were done.

The Cluster analyses results were summariesed expression of the genetic similarity and distance and were presented as dendrograms.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

След презимуване е оценена зимоустойчивост като процент живи растения. Потомствата под номера 1, 2 и 3, както и 9, 13 и 14 са с висока степен на зимоустойчивост – 80 до 100%, съответно *Festuca rubra*, *Lolium perenne* тип. При варианти *Festuca arundinacea* и *Festuca pratensis* тип – средна степен 60– 76 %, а за варианти 10, 11 и 12 *Bromus inermis* – презимуването е слабо 8 до 32%.

В Таблица 1 са представени средни, минимални, максимални стойности, стандартни отклонения и коефицент на вариране по признаците височина на растенията, дължина и шири-

RESULTS AND DISCUSSION

The winter hardiness was estimated after winter as a percent alive plants. Progenies numbers 1, 2 and 3, as well as 9, 13 and 14 had high degree of winter hardiness – from 80 to 100%, respectively *Festuca rubra*, *Lolium perenne* type. The variants *Festuca arundinacea* and *Festuca pratensis* type – average degree 60 – 76 %, and the variants 10, 11 and 12 *Bromus inermis* – low degree from 8 to 32%.

The average, minimum, maximum values, standard deviation and coefficient og variation by the traits plant height, second leaf length and width, tuft width measured in spring and

на на втори лист, и ширина на туфата измерена на две дати (пролет и есен). На лице е голямо генетично разнообразие между потомствата (варианти).

autumn are presented in Table 1.

The high genetic diversity between progenies was found.

Таблица 1. Морфологични признаци на потомства многогодишни житни треви
Table 1. Morphological characters for perennial grasses progenies

Вариант Variant	Брой р-я Plant number	Височина Height cm	Дължина на листа Leaf length cm	Ширина на листа Leaf width mm	Ширина на туфата отгоре Tuft width on the top cm	Ширина на туфата в основата Tuft width on the base, cm
1	21,00	16,62	6,71	1,19	8,24	11,95
2	25,00	21,64	7,20	1,20	10,40	19,68
3	25,00	27,52	8,20	1,24	12,00	20,32
4	17,00	34,82	13,88	4,35	17,00	19,12
5	16,00	42,44	21,13	9,88	16,25	23,44
6	11,00	35,73	16,27	6,36	21,64	17,09
7	15,00	21,47	10,93	5,60	24,40	14,87
8	19,00	25,74	13,05	5,74	17,89	11,53
9	21,00	25,24	15,67	7,10	15,86	13,71
10	8,00	23,75	16,50	9,63	11,25	23,14
11	3,00	20,67	18,67	11,00	9,00	33,67
12	2,00	35,50	11,50	4,50	9,00	8,00
13	24,00	42,58	12,96	6,96	19,29	14,25
14	20,00	42,75	11,30	6,15	20,60	15,75
Average	16,21	29,75	13,14	5,78	15,20	17,61
min	2,00	16,62	6,71	1,19	8,24	8,00
max	25,00	42,75	21,13	11,00	24,40	33,67
STDEV	7,63	9,01	4,25	3,15	5,25	6,42
CV,%	47,04	30,30	32,31	54,47	34,53	36,45

По височина, размери на листата и цвят, има диференциране – подходящи за декоративни цели (1, 2 и 3), за пасищно (4, 7, 8, 9 , 13 и 14) и сенокосно използване (5, 6, 10, 11 и 12). По отношение ширината на туфата, сравнител-но най – интензивно братене и чимообразуване се наблюдава при вариантите от *Festuca rubra* тип и

The differentiation between numbers was found according to the traits: height, leaves size and colour – suitable for ornamental purpose (1, 2 and 3), for pasture use (4, 7, 8, 9, 13 and 14) and for hay (5, 6, 10, 11 and 12). The most intensive tillering regarding tuft wide and turf forming was found for variants *Festuca rubra* type and short – roots forms of

късокоренищните форми на *Bromus inermis*.

В Таблица 2 са представени средни стойности, стандартни отклонения и коефицент на вариране по продуктивност на семена и елементите ú – брой генеративни стъбла (класове или метлици), брой класчета в клас или метлица, дължина на класа, метлицата и тегло на семената от растение.

Bromus inermis.

The average, minimum, maximum values, standard deviation and coefficient of variation by the seed productivity and its elements – stems number (ears, panicles), number of spikelets per ear, ear length, seed weight per plant are presented in Table 2.

Таблица 2. Елементи на продуктивността на семена от растение при оценка на потомства многогодишни житни треви
Table 2. Elements of the seed productivity per plant for evaluation of perennial grasses progenies

Вариант Variant	Брой стъбпа Stems number	Брой разкл., класчета Spikelets number	Дължина на класа, метлицата Ear length, cm	Тегло на семената Seed weight, g
1	6,50	6,01	8,20	0,73
2	7,73	6,34	9,21	0,90
3	8,70	7,96	9,84	0,76
4	46,87	14,17	15,04	4,17
5	21,43	52,84	17,64	2,76
6	70,64	20,37	19,73	3,84
7	56,12	20,86	17,42	2,30
8	51,63	22,88	17,26	2,05
9	48,45	29,14	17,24	1,71
10	13,57	36,95	16,89	1,22
11	24,67	35,86	16,21	0,36
12	30,00	17,64	14,66	1,11
13	63,96	18,57	18,39	3,35
14	68,70	17,97	17,83	2,51
Average	37,07	21,97	15,40	1,98
STDEV	23,62	13,09	3,66	1,22
CV,%	63,71	59,61	23,78	61,56

С най-малък брой генеративни стъбла са 1, 2 и 3 варианти – *Festuca rubra* – декоративен тип, съот-ветно и с най-ниска семенна продуктивност. Потомствата от типа *Lolium perenne* имат най-голям брой

Festuca rubra – ornamental type variants 1, 2 and 3 had the lowest number of stems and lowets seed productivity, respectively.

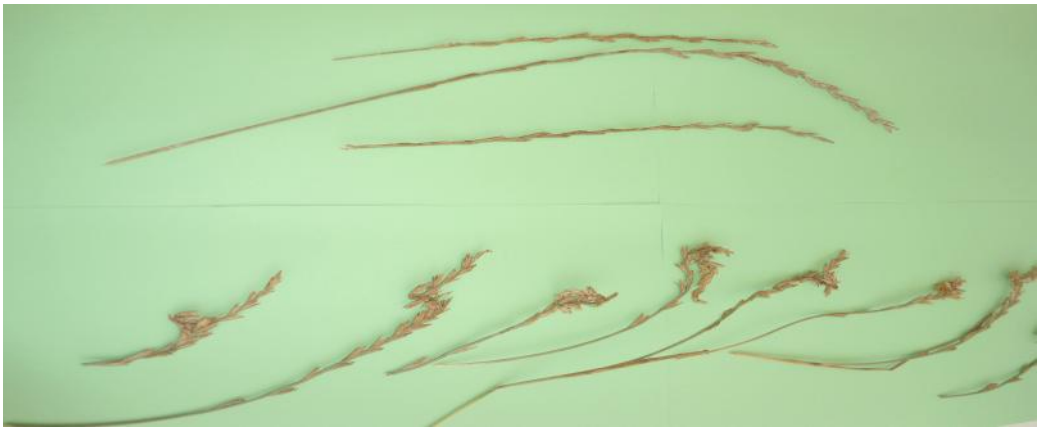
The families *Lolium perenne* type had the highest stems

генеративни 48 до 70 на растение и по-висока продуктивност на семена от 1,71 до 4,17 g. Най-силно е варирането по признакците брой генеративни стъбла – вариационен коефицент (CV) – 63, 71% и тегло на семената от 1 растение – 61,56%. Дължината на класа, метлицата е сравнително по-слабо вариабилен признак – вариационен коефицент – 23,78 %.

Морфологично доказателство за осъществена междувидова хибридизация е типа на генеративните органи и тяхното видоизменение (Снимки 1 и 2) - общо 12 растения от 4 потомства. Измененията се изразяват като пречупен клас метлица при варианти 8, 9 и 13, съответно 8 растения и като метлица с наличие на пролиферация (разклоненията на метлиците завършват с дребни фотосинтезиращи листенца) за варианти 10 и 11, сответно 4 такива растения.

number from 48 to 70 per plant and higher seed productivity from 1,71 to 4,17 g. The characters number of generative stems (coefficient of variation (CV) – 63, 71%) and seed weight per plant (CV - 61,56%) were the most variable. The length of the ear (panicle) had comparatively lower variability – coefficient of variation – 23,78 %.

The morphological evidence for realized intergeneric hybridization is the type of generative organs and their modifications (Pictures 1 and 2) – 12 plants in total from 4 progenies. The modifications were express as refracted ear – panicle for variants 8, 9 and 13, 8 plants respectively or as panicle with presents of proliferation (the panicle branches ends with small green leaves) for variants 10 and 11, 4 plants, respectively.



Сн. 1. Видоизменени класове при междуродови хибриди – тип пасищен райграс
Picture 1. Modified ears from intergeneric hybrids – perennial ryegrass type

Сн. 2. Видоезменени метлици при безосилеста овсига
Picture 2. Modified panicles for smoth brome

През годината е извършена и селекционна оценка за нападение от болести при естествен инфекциозен фон. Наблюдава се нападение от коронеста ръжда (*Pucinia coronata* Corda.) по листата и стъблата на вариант 5 тип ливадна власатка, отчетено на индивидуални растения в бал (1,3,5,7 и 9) и процент, както следва – бал1 – 11,5% от растенията, т. е. здрави, бал 3 – 33% от растенията, бал 5 – 44 %, бал 7 – 11,5% и бал 9 – 0% – много силно нападение, а средният бал е 4,11%. При варианти 10 и 11 – безосилеста овсига нападението е в по-силна степен, както следва: бал1 – 0% от растенията , т. е. няма здрави, бал 3 – 16,7% от растенията, бал 5 – 25 %, бал 7 – 33,3% и бал 9 – 25% - среден бал 6,33% за вида.

Като обобщен израз за генетичното родство и отдалеченост са представени резултати от кластърен анализ на Фиг. 1 и

The breeding evaluation of the diseases attack under natural infection background was done. The attack from crown rust was found (*Pucinia coronata* Corda.)on the leaves and stems for variant 5 meadow fescue type, measured on the individual plants by scores (1,3,5,7 and 9) and percent, as follows – score1 – 11,5% from the plants, (healthy plants), score 3 – 33% from the plants, score 5 – 44 %, score 7 – 11,5% and score 9 – 0% – very heavy attack, but average score was 4,11%. The attack of crown rust was higher degree for variants 10 and 11 – smooth brome grass as follows: score1 – 0% from the plants (there aren't healthy plants), score 3 – 16,7% from the plants, score 5 – 25 %, score 7 – 33,3% and score 9 – 25% - average score 6,33% for that species.

The results from the Cluster analysis as the general expression for genetic relationship and distance were shown as the

2 – дендрограма по 5 признака за вегетативно развитие на 14 варианта (потомства), и по 5 признака за генеративно развитие на 14 варианта за 2013г., а на Фиг. 3 и 4, съответно за 2014г.

dendrograms on the Figures 1 and 2 – dendrogram by 5 traits for vegetative development of 14 variants (progenies), and by 5 traits for generative development during 2013, and on Figures 3 and 4, for 2014, respectively.

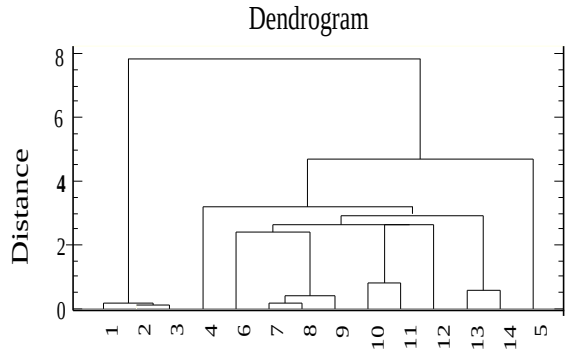


Fig. 1 Nearest Neighbor Method,Squared Euclidean

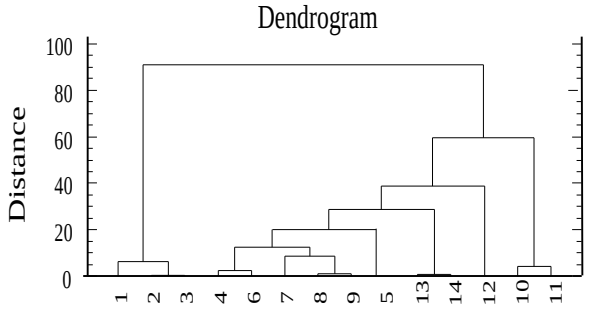
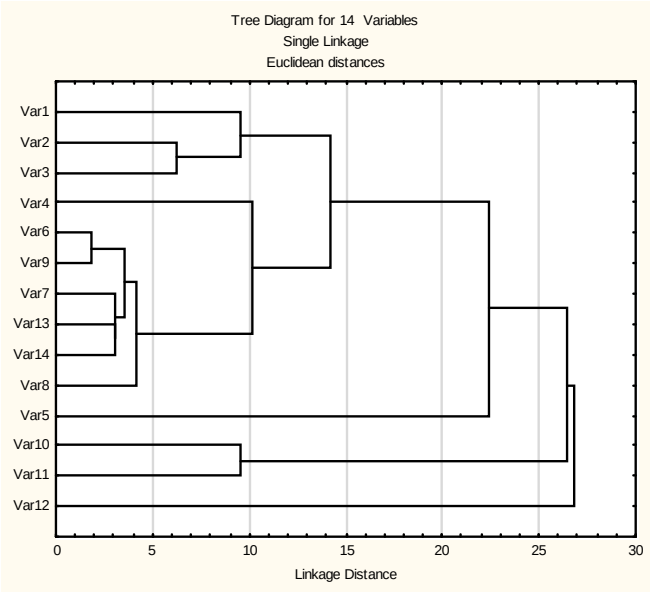


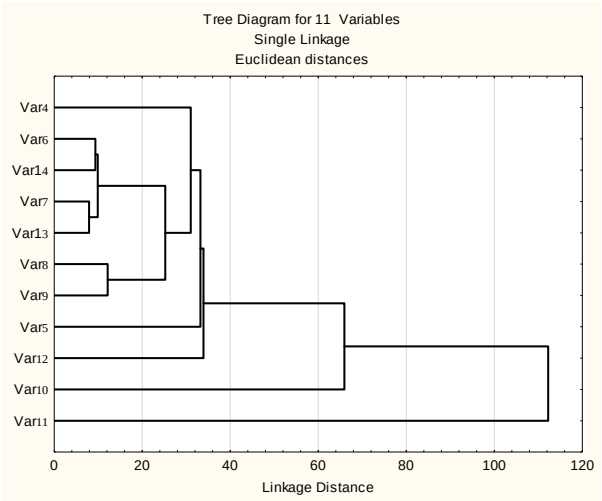
Fig. 2 Nearest Neighbor Method,Squared Euclidean

Фиг. 1 и 2. Дендрограми от Кластърен анализ по 5 признаци за вегетативно развитие – височина, дължина и ширина на листа, ширина на туфата в основата през пролетта и през есента и по 5 признаци за генеративно развитие – брой генеративни стъбла, дължина на класа, метлицата, брой разклонения на метлицата, брой класчета в клас, тегло на семената на растение – потомства 2013 г.

Fig. 1 and 2. Dendrograms (Ward's Method, Squared Euclidean) from Cluster analysis by 5 characters for vegetative development – height, leaf length and width, tuft width on the base during spring and autumn; and by 5 characters for generative development – number of generative stems, ear length, or panicle length, number of spikelets, seed weight per plant – progenies, 2013



Фиг. 3. Дендрограма (Ward's Method,Squared Euclidean) от Кластърен анализ по 5 признаци за вегетативно развитие – височина, дължина и ширина на листа, ширина на туфата в основата през пролетта и през есента – потомства, 2014 г.
Fig. 3. Dendrogram from Cluster analysis by 5 characters for vegetative development – height, leaf length and width, tuft width on the base during spring and autumn – progenies, 2014



Фиг. 4. Дендрограма (Nearest Neighbor Method, Squared Euclidean) от Кластърен анализ по 5 признаци за генеративно развитие – брой генеративни стъбла, дължина на класа, метлицата, брой разклонения на метлицата, брой класчета в клас, тегло на семената на растение – потомства, 2014
Fig. 4. Dendrogram from Cluster analysis by 5 characters for generative developmen– number of generative stems, ear length, or panicle length, number of spikelets, seed weight per plant – progenies, 2014

Обособени са по 2 основни кластера, в първи са включени варианти 1, 2 и 3 потомства от типа *Festuca rubra*, подходящи за декоративни цели (Снимка 3), а всички останали в направление за фураж. Вторият кластер има подкластери на няколко нива, със сходства и раздалеченост на базата на съответните признанци изразено чрез Евклидовото разстояние.

Two main clusters were established. The first cluster involved 1, 2 and 3 progenies by the type *Festuca rubra* (Picture 3), suited for ornamental (amenity) use, and second – all other progenies suitable for forage use. The second cluster had the sub clusters in different levels, with the similarity and difference on the base of the characters defined as Euclidian distance.

Сн. 3. Индивидуални растения – *F. rubra* type – потомства
Picture 3. Individual plants *F. rubra* type progenies

ИЗВОДИ

1. По височина, размери на листата и цвят, има диференциране на потомствата – подходящи за декоративни цели (1, 2 и 3), за пасищно (4, 7, 8, 9 , 13 и 14) и сенокосно използване (5, 6, 10, 11 и 12). По отношение ширината на туфата, сравнително най-интензивно братене и чимообразуване се наблюдава при вариантите от *Festuca rubra* тип и късокоренищните форми на *Bromus inermis*.

CONCLUSIONS

1. The differentiation between numbers was found according to the traits: height, leaves size and colour – suitable for ornamental purpose (1, 2 and 3), for pasture use (4, 7, 8, 9, 13 and 14) and for hay (5, 6, 10, 11 and 12). The most intensive tillering regarding tuft wide and turf forming was found for variants *Festuca rubra* type and short – roots forms of *Bromus inermis*.

2. Потомствата от типа *Lolium perenne* имат най-голям брой генеративни 48 до 70 на растение и по-висока продуктивност на семена от 1,71 до 4,17 g. Най-силно е варирането по признакците брой генеративни стъбла – вариационен коефицент (CV) – 63, 71% и тегло на семената от 1 растение – 61,56%. Дължината на класа, метлицата е сравнително по-слабо вариабилен признак – вариационен коефицент – 23,78 %.

3. Установено е голямо генетично разнообразие между потомствата. Като обобщен израз за генетичното родство и отдалеченост са резултатите от кластърен анализ в дендрограми с по 2 основни кластъра.

4. В първи са включени варианти 1, 2 и 3 потомства от типа *Festuca rubra*, подходящи за декоративни цели, а всички останали в направление за фураж.

5. Вторият кластър има подкластъри на няколко нива, със сходства и раздалеченост на базата на съответните признаци изразено чрез Евклидовото разстояние.

2. The families *Lolium perenne* type had the highest stems number from 48 to 70 per plant and higher seed productivity from 1,71 to 4,17 g. The characters number of generative stems (coefficient of variation (CV) – 63, 71%) and seed weight per plant (CV – 61,56%) were the most variable. The length of the ear (panicle) had comparatively lower variability – coefficient of variation - 23,78 %.

3. The high genetic diversity between progenies was found. The results from the Cluster analysis as the general expression for genetic relationship and distance were shown as the dendrograms with two main clusters.

4. The first cluster involved , 2 and 3 progenies by the type *Festuca rubra*, suited for ornamental (amenity) use, and second – all other progenies suitable for forage use.

5. The second cluster had the sub clusters in different levels, with the similarity and difference on the base of the characters defined as Euclidian distance.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Humphreys M. W.; M. Ghesquire, Z. Zwierzykowski, M .Rapacz, O. A. Rognli and L. Ostrem.** 2001. A Pan - European approach to "dissecting" stress resistance traits in the forage grasses, In: P. Monjardino, A. da Camara Machado, V. Carnide (eds.): Breeding for stress tolerance in fodder crops and amenity grasses, 139-145.

2. **SAGES.** 2004. Sustainable Grasslands Withstanding Environmental Stresses, 5th PCRDT shared cost project QLK5-CT-2000-00764 for 2001-2003. Key-Action 5.1.1. Sustainable Agriculture, Technological Implementation Plan. European Commission, Brussels, Belgium, 42p. (http://www.sages-eu.co.uk/)

3. **Thomas H. and Humphreys, M.O.** 1991. Progress and potential of interspecific hybrids of *Lolium* and *Festuca*. J. Agric. Sci. Camb. 117:1-8.

4. **Yamada T., Forster, J.W., Humphreys, M.W. and Takamizo, T.** 2005. Genetics and molecular breeding in *Lolium/Festuca* grass species complex. Grassl. Sci. 51:89-106.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 18, 5, 2015, (816-828)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan

ПРОУЧВАНЕ НА ВЪЗМОЖНОСТИТЕ ЗА ИНДУЦИРАНЕ НА КАЛУС ОТ ЗРЕЛИ ЗАРОДИШИ НА ЛИНИИ ОБИКНОВЕНА ЗИМНА ПШЕНИЦА /*TRITICUM AESTIVUM* L./ *IN VITRO*

Светла Качакова, Димитър Диманов, Катя Узунджалиева, Руска Русева*

Институт по растителни генетични ресурси, 4122 Садово, България
**E-mail: ruska_r1951@abv.bg*

STUDY THE POSSIBILITIES FOR INDUCING CALLUS FROM MATURE EMBRYO WHEAT LINES /*TRITICUM AESTIVUM* L./ *IN VITRO*

Svetla Kachakova, Dimitar Dimanov, Katya Uzundzhalieva, Ruska Ruseva*

Institute of Plant Genetic Resources, 4122 Sadovo, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

В резултат на изведена експериментална работа с 48 линии от обикновена зимна пшеница беше осъществен подбор на линии по показателите: добив, студоустойчивост и някои технологични качества на зърното. Зрели зародиши от подбраните 9 линии бяха инокулирани на 7 хранителни среди с различен състав на основните компоненти и растежни регулатори за изпитване на възможността за индуциране на калусогенез. Резултатите от изследването показаха, че в хранителна среда по Murashige-Skoog /1962/ без растежни регулатори не се наблюдава индукция на калус. В хранителните среди съставени по Murashige-Skoog, съдържащи фитохормоните кинетин и BAP /бензиламинопурин/ по 2 ml/l, се отчете развитие на калус в ниска степен – средно 3,25% с кинетин и 8,21 % с BAP. Най-добре е изразено

SUMMARY

As a result of the experimental work with 48 lines of Triticum aestivum were selected lines with cold resistance, productivity as well as with some technological indices. Mature embryo from the selected 9 lines was inoculated in 7 nutrient media with different content of basic components and growth regulators for investigation of the possibilities for callus induction. The results from the study showed that the culture media of Murashige-Skoog /1962/, which does not contain growth regulators does not induce callus development.

In the culture media Murashige-Skoog, containing kinetin 2 m/l and BAP 2 mg/l was observed very little callus development – average 3,25% with kinetin and 8,21% with BAP.

Very well is expressed the influence of

влиянието на ауксина 2,4-D, чиято концентрация в хранителна среда по MS (обогатена с витамини по Linsmaier-Skoog/1965/) нараства от 1 mg/l до 4 mg/l. Степента на калсусо-образуване нараства с увеличаване на концентрацията – от 11,10% с 1 mg/l до 42,50% с 4 mg/l. Влиянието на отдел-ните генотипове не е така ясно изра-зено, както е изразена тенденция за влиянието растежния регулатор 2,4-D в хранителната среда.

Ключови думи: пшеница, линии, зрели зародиши, инокулиране, калус, *in vitro*

2,4-D in concentration in the nutrient media of MS, containing vitamins of Linsmaier-Skoog/1965/ was applied from 1 mg/l to 4 mg/l. The level of callus development increases with increasing of the concentration – from 11,10% with 1 mg/l to 42,50% with 4 mg/l. The influence of the genotypes is expressed not very clearly as the influence of 2,4 D in nutrient media.

Key words: Triticum, lines, mature embryo, inoculation, callus, *in vitro*

УВОД

Основната цел на всяка програма по селекция на пшеницата е създаване на сортове с висок продуктивен потенциал, притежаващи комплекс от биологични и стопански качества, устойчиви на биотични и абиотични стресови фактори и подходящи за отглеждане при намаление на разходите за производство (Рачовска, 2003; Димова, 2006; Иванова, 2009; Ценов, 2009). Добивът на зърно е показател, чиято годишна стойност се определя от взаимодействието на генотипа с условията на средата (Терзиев, 2000; Tsenov, 2006). Този признак е комплексен и до голяма степен се влияе от факторите на околната среда (Akcura, 2005). За достигане на високи селекционни цели от изключителна важност е създаването и идентифицирането на генетично разнообразие, като първа стъпка от класическия селекционен процес.

INTRODUCTION

The main goal of any program in wheat breeding is to create varieties with high productive potential, possessing a complex of cultivation and resistant to biotic and abiotic stress factors and suitable for growing with reduced production costs (Rachovska, 2003; Dimova 2006; Ivanova, 2009; Tzenov, 2009).

Grain yield is an indicator whose annual value is determined by the interaction between the genotype and the environmental conditions (Terziev, 2000; Tsenov, 2006). This feature is complex and is largely influenced by environmental factors (Akcura, 2005). To reach the high breeding purposes of utmost importance is the creation and identification of genetic diversity, as a first step of the classic selection process.

Наред с класическите методи на селекция се използват и тези на растителните биотехнологии. Приложението им за създаване на нови линии и сортове е основна тенденция в съвременната селекция при пшеницата. Публикуван е обзорен материал от Larkin and Scowcroft (1981), в който се анализира потомство на регенеранти, получени *in vitro*. Авторите установяват, че растителната тъканна култура представлява един нов източник за генетическо разнообразие, а самият цикъл на тъканно и клетъчно култивиране генерира мутационните изменения. Наблюдаваните отклоненията от изходната форма са обяснени като модификационни или експериментална грешка. Все повече факти се натрупват в полза на генерирани изменения *in vitro*, особено при системата експлант-калус-регенерант. Авторите доказават, че отклоняващите се форми, желани при култивиране *in vitro*, се явяват нов и богат източник на генетично разнообразие (Диманов, 1990; Dimanov, 1994; Атанасов, 2001; Yan, 2008; Dencic, 2011). Целта на настоящата изследователската работа беше, след подбор на изходен материал от линии пшеница, да се проучват възможностите за индуциране на калусогенез в условия *in vitro* от инокулиране на зряло ембрио.

Along with the classical methods of selection those of plant biotechnology are also used. Their application to create new lines and varieties is a major trend in modern selection of wheat.

The review material published by Larkin and Scowcroft (1981), analyzes the progeny of *in vitro* obtained regenerants.

The authors found that plant tissue culture is a new source of genetic diversity, and the cycle of tissue and cell cultivation generates mutational changes.

The observed deviations from the original are considered as a modification or experimental error.

More and more evidence is accumulating in favor of the *in vitro* generated changes, especially in system explant – callus-regenerants. The authors established that aberrant forms desirable when cultured *in vitro*, are a new and rich source of genetic diversity (Dimanov, 1990; Dimanov, 1994; Atanasov, 2001; Yan, 2008; Dencic, 2011). The purpose of this research was, after selection of a starting material of wheat lines, to study the possibilities for *in vitro* induction of callus formation of mature embryo.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В опитното поле на ИРГР-Садово бяха проведени тригодишни изследвания с 48 линии от пшеница за подбор на изходен материал по следните показатели:

а/ За изследване показателя на студоустойчивост на проучваните линии беше заложен опит с пряко замразяване на растенията в хладилна камера при 20С°/24h.

б/ За определяне на добива, изпитваните линии пшеница бяха заложени след предшест-веник фуражен грах в стандартна схема в 4 повторения по 12 m^2 с челна и тилна охрана от по 1 m^2.

в/ технологични показатели на зърното – седиментационна стойност по метода на Пумпьянский (1961); ферментационно число чрез Пелшенке тест (Pelshenke et al., 1953).

След оценките и обработката на резултатите бяха подбрани линии по изпитваните показатели, със стойности надвишаващи тези на стандартите. От тях 9 линии бяха определени за работа по инокулиране на зрели зародиши върху хранителни среди в условия *in vitro*. Експерименталната работата по получаване на регенеративен калус от избрания изходен материал се проведе в Лабораторията по растителни биотехнологии. Зрелите семена се обеззаразиха посредством традиционната методика, която включва дезинфекциране на семената чрез поста-

MATERIAL AND METHODS

In the experimental field of IPGR-Sadovo three-year studies were conducted with 48 lines of wheat for selection of source material according to the following indicators:

a/ To examine the cold tolerance of studied lines an experiment with direct freezing of plants at 20C°/24h was set.

b/ To determine the yield the tested wheat lines were sown after fodder peas predecessor in a standard scheme in four repetitions of 12 m^2 with frontal and occipital security of 1 m^2.

c/ Technological traits of grain – sedimentation value after Pumpyyanskiy (1961); Pelshenke test for determining of the fermentation value (Pelshenke et al., 1953).

After evaluation and processing of the results were selected lines according to the tested indicators, with values exceeding those of the standards. Nine of them were set for work on inoculating mature embryos on nutrient media under *in vitro* conditions. The experimental work for obtaining of regenerative callus from the selected source material was held at the Laboratory of Plant Biotechnology.

Mature seeds were decontaminated by conventional methodology, which includes disinfecting the seeds by placing

вяне за 1 минута в 70% етилов алкохол за 10 минути, стерилизация с 0.3 % разтвор на живачен двухлорид /HgCl2/, последвано от трикратно измиване със стерилна дестилирана вода за по 1 минута. Стерилизираните семена се поставиха върху стерилна филтърна хартия в петриеви блюда, за престояване в термостат за 24 часа при температура 25^{o}C до набъбване на семената.

Зародишите от набъбналите семена се изолираха асептично и се култивираха на агарова среда в колби с обем 400 ml, със скутелума нагоре. Експлантите се отглеждаха на тъмно при температура 25$_{\pm}$1^{o}C и влажност 75% във фитостатна камера. За намиране на най-подходяща хранителна среда, предизвикваща индуциране на калус зародишите се култивираха на 7 хранителни среди с различен състав на отделните компоненти (Таблица 1).

them for 1 minute in 70% ethyl alcohol for 10 minutes, sterilized with a 0.3% solution of mercuric chloride /HgCl2/, followed by washing three times with sterile distilled water for 1 minute. Sterilized seeds were placed on a sterile filter paper in petri dishes for standing in a thermostat for 24 hours at 25^{o}C until the swelling of the seeds.

Embryos from the swollen seeds were isolated aseptically and cultured on an agar medium in the flasks with a volume of 400 ml, with scutellum facing up. The explants were grown in the dark at 25 ± 10^{o}C and humidity of 75% in growth-camera. To find the most suitable medium, causing induction of callus embryos are cultured for 7 nutrient media of different composition of individual components (Table 1).

Таблица 1. Състав на хранителната среда
Table 1. Composition of the culture media

Компоненти / Components	Хранителни среди / Culture media						
	1	2	3	4	5	6	7
Макроелементи / Macroelements	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Микроелементи/ Microelements	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Витамини/ Vitamins	LS	LS	LS	LS	MS	MS	MS
2.4 - D /mg/ l/ /2.4 - D /mg/ l /	1,0	2,0	3,0	4,0	-	-	-
meso-inositol /mg/ l / / meso-inositol /mg/ l /	100	100	100	-	100	100	100
Казеин хидролизат /mg/l/ / Cazin hydrolizat /mg/l/	-	-	-	500	500	500	500
Захароза /g/ l / / Sucrose /g/ l /	30	30	30	30	30	30	30
Агар /g/ l / / Agar /g/ l /	7	7	7	7	7	7	7
АБК /mg/ l / / ABA /mg/ l /	-	-	-	-	-	-	-
Kinetin /mg/ l / / Kinetin /mg/ l /	-	-	-	-	-	2,0	-
BAP /mg/ l / / BAP /mg/ l /	-	-	-	-	-		2,0

Макроелементите и микроелементите на хранителните среди са по Murashige-Skoog /1962/ /MS/ и модификации от нея. Като въглехидратен източник е използвана захароза 30 g/l и агар 7.0 g/l, с ph на средите 5.6. Стерилизацията е извършена за 20 min при 120^{o}C и налягане 0.9 atm. При всички варианти се използваха еднакъв брой зародиши – 15 при 4 повторения.

The macro- and microelements of the nutrient media are made of Murashige-Skoog /1962/ /MS/ and modified. Sucrose 30 g/l was used as a carbohydrate source and agar 7.0 g/l with average ph 5.6. Sterilization was made for 20 min in 120^{o}C and 0.9 atm pressure. Equal number of embryos were used in all variants – 15 with 4 repetitions.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от проведеното изследване за студоустойчивост на 48 линии обикновена зимна пшеница показваха, че по броя на преживели растения при -20^{o}C/24h, отнесени към стандартите, изследваните линии могат да се групират по показателя студоустойчивост към шестте класа. За подбор на изходни материали по този показател и за включване изследователска работа *in vitro*, интерес представляват тези от Клас I и Клас II, съответно 10 линии с номера № 6, 8, 9, 10, 26, 29, 31, 32, 34, 35, всички със степен на студоустойчивост, равна на сортовете пшеница, стандарти за студоустойчивост – St_1-Мироновска 808 и St_2-Победа от Клас I и Клас II (Таблица 2).

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the study on cold resistance of 48 winter wheat lines showed that the number of surviving plants at – 20^{o}C/24h, in comparison to the standards, can be grouped according to six indicators of cold tolerance class.

Selection of starting materials according to this indicator and with incorporation of *in vitro* research, interest represent those of Class I and Class II, respectively 10 lines with numbers № 6, 8, 9, 10, 26, 29, 31, 32, 34, 35, all with a degree of cold resistance equal to wheat varieties, standards for cold tolerance – St1-Mironovska 808 and St2-Win Class I and Class II (Table 2).

Таблица 2. Студоустойчивост на сортове и линии обикновена зимна пшеница *T.aestivum* L.
Table 2. Cold resistance of *T.aestivum* L. varieties and lines

Сорт/Линия Variety/Line	Преживели растения Survival plants (-20^0C/24h) (%)	Доверителен интервал Acceptable range (%)	Клас Class
St_1-Мироновска 808/ St_1-Mironovska 808	100.0	100.0	I
St_2-Победа/ St_2-Pobeda	97.4	100.0-92.3	II
St_3-Безостая 1/ St_3-Besostaya1	74.5	89.8-59.2	III
St_4- N 301/ St_4- N 301	63.6	80.0-47.2	IV
St_5- Русалка/ St_5- Rusalka	52.6	73.5-31.7	V
St_6-Сан Пасторе/ San Pastore	0	0	VI
№ 6	97.4		II
№ 8	97.4		II
№ 9	95.1		II
№ 10	97.4		II
№ 26	97.4		II
№ 29	97.2		II
№ 31	100.0		I
№ 32	97.0		II
№ 34	100.0		I
№ 35	100.0		I

Отчетените средни добиви на изпитаните 48 линии и статистическата обработка на резултатите послужиха за основа при подбора на най-подходящите от тях за включване в изпитвания по индуциране на калус от зряло ембрио, за създаване на ново генетично разнообразие. Въз основа на резултатите от дисперсионния анализ на данните за среден добив бяха отделени линии, с доказано най-висок добив спрямо стандарт Енола, а именно линиите № 7, № 8 и № 14 (Таблица 3).

The reported average yields of 48 lines tested and statistical processing of the results formed the basis for the selection of the most appropriate ones for inclusion in tests induction of callus from mature embryo to create new genetic diversity.

Based on the results of analysis of variance data for average yield were separated lines with proven highest yield compared to standard Enola, namely lines № 7, № 8 and № 14 (Table 3).

Таблица 3. Дисперсионен анализ на данните за среден добив
Table 3. Disperssions analysis of the average yield data

Номер Number	Сортове Varieties	Класир. Rating	Ср. аритм. Average	Отн. д. Variation, %	Разлика Difference	Доказаност Significance
№ 1	Енола/Enola	17	786.50	100.00	0.00	*
№ 7	7	1	957.00	121.68	170.50	+ + +
№ 8	8	3	929.75	118.21	143.25	+ + +
№ 14	14	2	952.00	118.21	165.50	+ + +
GD: 5.0 %		= 63.92				
GD: 1.0 %		= 84.88				
GD: 0.1 %		= 110.14				

Изследванията по отношение на качествените показатели на 48 линии пшеница и получените резултати не показаха категорично открояване на отделни генотипове спрямо стандарта Садово 1, комплексно за двата показателя. Някои от линиите имат по високо седиментационно число спрямо стандарта, други по-добри стойности на ферментационно число. Подходящи за по-нататъшните проучвания са линиите със стойности, превишаващи стандарта в двете посоки – линии № 1, № 5, № 13, № 16, № 17, №18, № 19, № 20, № 22 и № 24 (Таблица 4).

Research regarding the quality indicators of 48 wheat lines and the results showed no definite highlighting of individual genotypes compared to standard Sadovo 1, in complex for both indicators.
Some of the lines have a high number, compared to standard, sedimentation, other has better values of fermentation number. Lines, suitable for further research are in excess of the standard in both directions - № 1, № 5, № 13, № 16, № 17, №18, № 19, № 20, № 22 and № 24 (Table 4).

Таблица 4. Качествени показатели на зърното
Table 4. Quality of the grain indices

Линии Lines	Седимент. число (cm^3) Sedimentation value(cm^3)	Фермент. число на Пелшенк (min) Fermentation value of Pelshenke (min)
Ст. - Садово1 St - Sadovo1	48	123
№ 1	54	154
№ 5	48	174
№ 13	52	185
№ 16	48	180
№ 17	50	214
№ 18	44	155
№ 19	53	201
№ 20	52	152
№ 22	46	150

За продължаване на експерименталната работа в in vitro условия се използваха 9 линии, подбрани по 3 от трите изпитвания. Обобщавайки данните за подбор на изходни форми, по показателя студоустойчивост най-добри са линиите № 31, № 34 и № 35. По отношение на добива категоричен е подбора на линии с № 7, № 8 и № 14 и по технологични показатели беше препоръчително включването на линии с № 1, 17, 19. Зрели зародиши от 9-те линии се инокулираха върху 7-те представени хранителни среди.

Резултатите за влиянието на хранителната среда върху степента на развитие на калус от зрели зародищи са представени на Таблица 5. Формирането на калус се предизвиква от наличието на ауксини и цитокинини в хранителната среда в зависимост от приложената концентрация, с които се предизвиква недиференцирано делене на клетките. Тази констатация се потвърждава и от конкретните резултати. Хранителна среда 5 не съдържа растежни регулатори и в нея не се наблюдава развитие на калус от заложените зародиши. В хранителни среди 6 и 7, съдържащи съответно кинетин и BAP по 2 m/l, се отчита развитие в ниска степен– средно 3,25% с кинетин и 8,21 % с BAP.

To continue the experimental work in *in vitro* conditions were used 9 lines - 3 of the each 3 tests. The data for the selection of suitable cold tolerance forms showed that the best lines are № 31, № 34 and № 35.

In terms of yield best results showed lines № 7, № 8 and № 14 and for technological indicators was recommended inclusion of lines № 1, 17, 19.

Mature seeds of the 9 lines were inoculated on the 7 nutrient media.

The results for the effect of culture media on the rate of development of the callus of mature embryo are shown in Table 5. The formation of the callus is induced by the presence of auxins and cytokinins in the nutrient media depending on the concentration at which undifferentiated cell division is induced. That was confirmed by concrete results.

Nutrient media 5 does not contain growth regulators and thus no development of callus was observed. In media 6 and 7, respectively containing kinetin and BAP – 2 mg/l, low development was observed – an average of 3.25% to 8.21% and kinetin with BAP.

Таблица 5. Формиране на калус на различни хранителни среди
Table 5. Callus formation on different culture media

Генотип Genotype	ХРАНИТЕЛНА СРЕДА / CULTURE MEDIA																				
	1			2			3			4			5			6			7		
	Ембрио Embtio	Калус Callus	%	Ембрио Embtio	Калус Callus	%	Ембрио Embtio	Калус Callus	%	Ембрио Embtio	Калус Callus	%	Ембрио Embtio	Калус Callus	%	Ембрио Embtio	Калус Callus	%	Ембрио Embtio	Калус Callus	%
№ 1	105	12	11,4	105	16	15,2	105	25	23,8	105	41	39,0	105	0	0	105	5	4,8	105	8	7,6
№ 7	105	14	13,3	105	19	18,0	105	29	27,6	105	50	47,6	105	0	0	105	0	0,0	105	10	0,9
№ 8	105	10	9,5	105	14	13,3	105	22	20,9	105	42	40,0	105	0	0	105	7	6,6	105	13	12,4
№ 14	105	15	14,3	105	14	13,3	105	24	22,8	105	44	41,9	105	0	0	105	2	1,9	105	7	6,6
№ 17	105	11	10,5	105	20	19,0	105	30	28,6	105	44	41,9	105	0	0	105	1	0,9	105	11	10,4
№ 19	105	9	8,6	105	13	12,4	105	21	20,0	105	43	40,9	105	0	0	105	6	5,7	105	13	12,4
№ 31	105	10	9,5	105	15	14,3	105	21	20,0	105	47	44,8	105	0	0	105	3	2,8	105	7	6,6
№ 34	105	12	11,4	105	12	11,4	105	28	26,6	105	42	40,0	105	0	0	105	3	2,8	105	9	8,5
№ 35	105	12	11,4	105	15	14,3	105	20	19,0	105	49	46,6	105	0	0	105	4	3,8	105	9	8,5
Средно Average	105	11,7	11,10	105	15,3	14,62	105	24,4	23,25	105	44,6	42,5	105	0	0	105	3,4	3,25	105	9,6	8,21

Най-добре е изразено влиянието на 2,4 D, чийто концентрация в хранител-ни среди 1, 2 , 3 и 4 нараства от 1 до 4 mg/l, така както нараства степента на калсусообразуване – от 11,10% с 1 mg/l до 42,50% с 4 mg/l. Влиянието на отделните генотипове не е така ясно изразено, както изразената тенденция за влиянието на хранителната среда, по-конкретно за ролята на ауксина 2,4-D. Дори най-добрият отчетен резултат е неудовлетворителен на този изследователски етап, но насоч-ващите резултати могат да бъдат основа за разгръщане на по-детайлни изследвания с нови стимулатори и с различни концентрации.

The best was expressed the influence of 2,4-D, whose concentration in the culture media 1, 2, 3 and 4 increases from 1 to 4 mg/l, as well as increasing the rate of callus formation – of 11.10% with 1 mg/l to 42.50% with 4 mg/l. The influence of the individual genotypes is not so pronounced as expressed tendency for the effect of culture medium, in particular on the role of auxin 2,4-D. Even the best reporting is unsatisfactory result at stage of research, but targeted results can be the basis for developing more detailed studies with new promoters with different concentrations.

ИЗВОДИ

От изследваните 48 линии пшеница за студоустойчивост 10 линии попадат в Клас I и Клас I, които по студоустойчивост са равни на стандартите в съответния клас. По отношение на показателя добив само 3 от изпитаните линии надвишават стандарта Енола. Изследванията по отношение на технологичните показатели – седиментационно и ферментационно число на линиите пшеница и получените резултати не показаха категорично откроряване на отделни генотипове спрямо стандарта Садово 1, комплексно за двата показателя.

Девет линии с оптимални параметри по изследваните

CONCLUSIONS

From the 48 investigated for cold resistance wheat lines 10 can be classified in Class I and Class I, and are equal to the standards.

With respect to the indicative yield of only 3 tested lines exceed the standard Enola.

Studies in terms of technological performance – including sedimentation and fermentation of wheat lines the results showed no definite highlighting of definite genotypes compared to standard Sadovo 1.

Nine lines with optimal parameters for the studied

показатели послужиха като надеждни източници при подбора на материали за *in vitro* инокулиране.

При куртивирането на зрели зародиши от 9-те линии върху хранителни среди с различни растежни регулатори, най-добре е изразено влиянието на 2,4-D. От изпитаните концентрации в интервал от1 mg/l до 4 mg/l в хранителна среда по MS, снабдена с витамини по Linsmaier-Skoog /1965/, степента на калсусообразуване нараства с увеличаване на концентрацията – от 11,10% с 1 mg/l до 42,50% с 4 mg/l.

Отделните генотипове реагираха еднопосочно в различните комбинации и варианти, което потвърждава по-силното влияние на фактора, стимулиращ калусообразователния процес – ауксина 2,4-D. Получените насочващи резултати могат да бъдат основа за разгръщане на по-детайлни изследвания с нови стимулатори и с различни концентрации.

indicators served as reliable sources for selection materials for *in vitro* inoculation.

In the cultivation of mature embryos of the 9 lines on culture media with various growth regulators, the best is expressed the influence of 2,4-D. From the tested concentrations in the range from 1 mg/l to 4 mg/l in the culture medium MS, provided with vitamins Linsmaier-Skoog /1965/, the degree of callus formation increased by increasing the concentration – of 11.10% with 1 mg/l to 42.50% with 4 mg/l.

Individual genotypes responded one uniformly to different combinations and variants, which confirms the strong influence of the factor stimulating callus formation process – auxin 2,4-D. The obtained results can be a basis for developing of more detailed studies with new promoters with different concentrations.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Атанасов А.** 2001. Биотехнологиите на XXI век. Периодичен бюлетин. Diagnosis press, София, Балгария, 8 pp. 3
2. **Диманов Д., И. Бързакова, Л. Влахова.** 1990. Соматичен ембриогенез и регенериране на растения при пшеница / Triticum aestivum L./. IV-та младежка научно-практическа конференция „Приносът на младежта за повишаване на ефективността на растениевъдството”, Чирпан, 7-8 юли, 82-84.
3. **Димова Д., М. Димитрова, Г. Рачовска.** 2006. Оценка по добив и стабилност на перспективни линии пшеница. Field Crops Studies, Vol.III-1, 19-24.
4. **Иванова А., Н. Ценов.** 2009. Биологични и стопански признаци на сортове обикновена пшеница според условията на отглеждане. Field Crops Studies, Vol. 1: 173-182.
5. **Плохинский Н. А.** 1970. Биометрия, „Колос”, Москва, 334.

6. **Терзиев Ж.** 2000. Добив и качество на зърното при някои сортове пшеница, тритикале и ечемик. Растениевъди науки, 37(7): 431-435.

7. **Ценов Н., К. Костов, И. Тодоров, И. Стоева, Т. Петрова, И. Илиев, В. Кирякова.** 2009. Характеристика на сорт хлебна пшеница Неда. Field Crops Studies, Vol. 1, 11-20.

8. **Akcura M., Y. Kaya, S. Taner.** 2005. Genotype-environment interaction and phenotypic stability analysis for grain yield of durum wheat in the Central Anatolian region. Turc. J.Agric. For., 29, 369-375.

9. **Dencic S., N. Mladenov, B. Kobiljski.** 2011. Effect of genotype and environment on bread making quality in wheat. International. Journal of plant production 5(1): 71-82.

10. **Dimanov D., Petkova, D, Sobou F.** 1994. Embryogenic calli induction and plant regeneration in wheat /Triticum sativum L./ and rice /Oyzisa sativa L./ under unified culture conditions. Biotechnology biotechnological equipment. 8/1994/1, 44-49.

11. **Larkin P., W. Scowcroft.** 1981.S omaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appi. Genet., 60:197-214.

12. **Tsenov N., T. Gubatov, V. Peeva.** 2006. Study on the genotype x environment interaction in winter wheat varieties. II. Grain yield. Field Crops Studies, Vol. III – 2, 167-175.

13. **Yan W., J. Fregeau-Reid.** 2008. Breeding line selection based on multiple traits. Crop Science 48(2): 417-423.