

## Регенерация на експланти при вида *Helianthus tuberosus* L.

### Станислава Статева

Селскостопанска академия, Институт по растителни генетични ресурси „Константин Малков“, бул. „Дружба“ № 2, 4122, Садово

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6016-2904>

E-mail: [stanislava.stateva@gmail.com](mailto:stanislava.stateva@gmail.com)

### Резюме

Извършеното проучване е опит за съчетано използване на методите на растителната биотехнология с конвенционалните методи на селекция, чрез сравнителни изследвания върху биологичните качества на *Helianthus tuberosus* L. Прилаганите хранителни среди са Murashige & Skoog и Quorin & Lepoivre. Проучено е влиянието на химичните фактори- IBA, TDZ, BAP и GA, в условия in vitro за индуциране на калусогенез и регенерация. Най-добра морфогенетична способност при листните сегменти се наблюдава във вариант с участието на 1.0 mg/l TDZ, 0.07mg/l IBA и 0.05 mg/l GA.

**Ключови думи:** *Helianthus tuberosus* L.; регенерация; цитокинини; ауксини; in vitro

## Regeneration of explants in the species *Helianthus tuberosus* L.

### Stanislava Stateva

Agricultural Academy, Institute of Plant Genetic Resources “Konstantin Malkov”, 2 Druzhba Blvd., 4122, Sadovo, Bulgaria

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6016-2904>

E-mail: [stanislava.stateva@gmail.com](mailto:stanislava.stateva@gmail.com)

### Citation

Stateva, S. (2023). Regeneration of explants in the species *Helianthus tuberosus* L. *Bulgarian Journal of Crop Science*, 60(2) 39-43 (Bg).

### Abstract

The research carried out is an attempt to combine the methods of plant biotechnology with conventional methods of selection, through comparative studies on the biological qualities of *Helianthus tuberosus* L. The nutrient media used are Murashige & Skoog and Quorin & Lepoivre. The influence of the chemical factors - IBA, TDZ, BAP and GA, in in vitro conditions for the induction of callusogenesis and regeneration was studied. The best morphogenetic ability in the leaf segments was observed in the variant with the participation of 1.0 mg/l TDZ, 0.07 mg/l IBA and 0.05 mg/l GA.

**Key words:** *Helianthus tuberosus* L.; regeneration; cytokinins; auxins; in vitro

## ВЪВЕДЕНИЕ

Растителните биотехнологии разширяват все повече своя обхват, като естествен резултат от развитието на науката и заемат определено

място в приложението на техниките за тъкани и клетки, биология и генно инженерство.

Видът *Helianthus tuberosus* е многогодишно растение от сем. Asteraceae. Намира широко приложение като заместител на захарта (D'egidio

et al., 1998; Chekroun et al., 1996). В кулинарията се използват грудките на растението както в суров вид, така и след термична обработка (Kays & Nottingham, 2008).

Прилагането на *in vitro* методите при *Helianthus tuberosus* дава възможност за проучване реакцията на вида в контролирани условия. С разработването на протокол за индуциране на калусни тъкани може да се постигне извличане на стойностни химически съединения (Xu et al., 2003; MacRae, 2007; Jain et al., 2009 Cui et al., 2019). Размножаването на вида в контролирани условия се осъществява чрез култивиране на експлантите от грудкова тъкан. Веднъж получен, стерилният материал може да се съхранява при ниски температури (Kays & Nottingham, 2009).

Qiu et al. (2019) са проучили механизъм, чрез който ауксинът и цитокининът координират латентността и израстването на аксиларната пъпка при ягодите. Получените резултати предполагат контрастно поведение на ауксин и цитокинин при контрола на развитието на аксиларните пъпки.

Gamborg et al. (1999) съобщават, че страничните издънки на земната ябълка може да се размножават в хранителна среда Murashige & Skoog (1962), съдържаща 2% захароза и 6% агар.

За образуване на калус от регенерация от листни сегменти и възлови експлантите съобщава Таха et al. (2007) в хранителна среда MS с участие на 1 mg/l BAP 0.5 mg/l NAA. За подобряване на по-бързото развитие и растеж на калуса се добавя в хранителната среда антибиотика цефалексин (cefalexin) (Mathias & Boyd, 1986; Mittal et al., 2009).

Повишаването на концентрацията на ВА стимулира образуването на издънки, но съкращава тяхната дължина (Hristova et al., 2013). Над 50% от микрорастенията при вида *Artemisia*

*chamaemelifolia* са дали началото на повече от 10 нови издънки на експлант, в концентрации от 0,2, 0,3 и 0,9 mg.L<sup>-1</sup> ВА. Доказано е, че всички концентрации на ВА потискат образуването на корени.

Авторите Schneider et al. (2019) посочват, че в зависимост от условията на растеж, светлината може да задейства различни пътища на апикално доминиране.

Проучване на вида *Helianthus tuberosus* са извършили Alla et al. (2013) в хранителна среда MS с участие на 15 mg/l 2,4 D. Получили са най-голям брой регенеранти от листен експлант.

Целта на настоящото изследване е съчетано използване на методите на растителната биотехнология с конвенционалните методи на селекция, чрез сравнителни изследвания върху биологичните качества на *Helianthus tuberosus*, с възможност за получаване на изходен селекционен материал.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

В изследванията като изходен растителен материал бяха включени растения с произход село Зелениково, област Пловдив.

В експериментите за получаване на *in vitro* култури бяха използвани върхни пъпки на грудки.

За проучване на регенерационната способност *in vitro* отглеждани растения от *Helianthus tuberosus* са използвани експлантите, развиващи се на основна хранителна среда MS.

За получаване на калусни култури бяха използвани различни експлантите - листа от цялата част на растението и стъбло.

В изследването са използвани два вида стерилизиращи агенти - 0.2% и 0.3 % HgCl<sub>2</sub> и бе-

**Таблица 1.** Хранителни среди за адвентивен органогенез

**Table 1.** Nutrient media for adventitious organogenesis

Варианти/ Variants	Основна хранителна среда/ Main nutrient medium	Вид и количество на растежните регулатори/ Type and amount of growth regulators		
G1	Quorin & Lepoivre (1977)	TDZ 1mg/l	IBA 0.07 mg/l	GA 0.05 mg/l
G2	Murashige & Skoog (1962)	BAP 1 mg/l	IBA 0.08 mg/l	GA 0.05 mg/l
G3	Quorin & Lepoivre (1977)	BAP 1 mg/l	IBA 0.08mg/l	GA 0.05 mg/l
G4	Murashige & Skoog (1962)	TDZ 1mg/l	IBA 0.07 mg/l	GA 0.05 mg/l

лина съдържаща процент активен хлор – 2.0%, прилагани в различни концентрации и комбинации:

1. белина за 2 мин; 85 %  $C_2H_5OH$  за 1 мин.
2. 0.2 %  $HgCl_2$  за 3 мин; 85%  $C_2H_5OH$  за 1 мин.
3. 0.3 %  $HgCl_2$  за 2 мин; 50%  $C_2H_5OH$  за 1 мин.

В експеримента са включени четири броя хранителни среди, разработени в зависимост от целта на изследването (Таблица 1). Добавянето на цитокинина TDZ се извърши след автоклавиране на хранителната среда в ламинар-бокс.

Експлантите са поставени в петриеве блюда и епруветки, съдържащи 10 ml хранителна среда.

Хранителните среди, използвани за регенерация, съдържат 30 g/l захароза, 7 g/l агар и 5.6 pH. Така приготвените среди се съхраняват в хладни и тъмни помещения до 30 дни преди тяхното използване.

Отглеждането на експлантите в етапите на изпитване се осъществи в камера с температурен режим  $24 \pm 2^\circ C$  и фотопериод 16 часа светлина и 8 часа тъмнина с осветление 3000 lx.

От всеки вариант са заложени по 100 броя. Регенерационният процес се проследява в продължение на два месеца, като през този период експлантите не са пренасяни върху нова хранителна среда.

Отчетените показатели

- Брой регенерирани експланти
- Брой регенеранти от един експлант

За определяне на регенерационния потенциал на проучваният генотип върху различните хранителни среди и типове експланти, в зависимост от вида и концентрацията на използваните растежни регулатори, данните са обработени със специализирания програмен продукт SPSS16.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Получаването на чист изходен материал при вида *Helianthus tuberosus* е важен етап в процеса на микроразмножаване. Чиста от вируси и патогени *in vitro* култура се установи при вариант с участието на 0.3 %  $HgCl_2$  за 2 мин и 50%  $C_2H_5OH$  за 1 мин.

След получаване на чист растителен материал, експлантите бяха култивирани на различни варианти хранителни среди на базата на Murashige & Skoog (1962), с добавени растителни хормони за индуциране на калусогенезис и органогенезис.

От направените наблюдения регенерацията от листен експлант показва, че *Helianthus tuberosus* притежава удовлетворителна регенерационна способност, в резултат на култивирането върху проучваните комбинации на растежни регулатори. Регенерацията е свързана и с индуциране на калус с бял цвят. Калусните тъкани са разположени по повърхността на листния експлант.

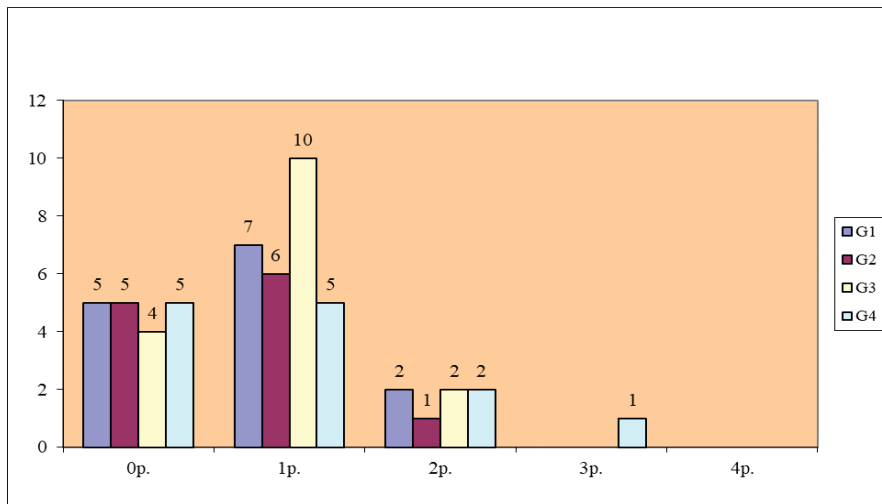
Динамиката на регенерация от листни експланти е в определена зависимост от средата за развитие на адвентивни летораста. Появата на първите регенеранти след изолиране на листните експланти се наблюдава между 22 и 25 ден след залагането на опита върху G1 модифицирана хранителна среда. Добавянето на TDZ дава възможност в този вариант растителният вид да реализира  $\bar{x}=7$  броя единични регенеранти. Наблюдава се появата на два регенеранта от един експлант (Фигура 1).

Във вариант G2 се наблюдава на 20-ия ден появата на регенеранти, но с показатели, значително занижени от предходната модифицирана хранителна среда. Регенерантите са в групи по 2 броя, много жизнени и нарастват бързо.

Най-добър резултат се откроява във вариант G3 с максимум 10 получени регенеранта на 35 ден от залагане на опита, което вероятно се дължи на наличие на ендогенни хормони и особености на растителният вид (Фигура 2). Комбинацията от BAP 1 mg/l и IBA 0.08 mg/l в хранителна среда Quorin & Lepoivre (1977) има стимулиращ ефект за регенерационния процес при вида *Helianthus tuberosus*.

При изследване разликата във възрастта на листата се установи, че младите листа са податливи към образуване на калус.

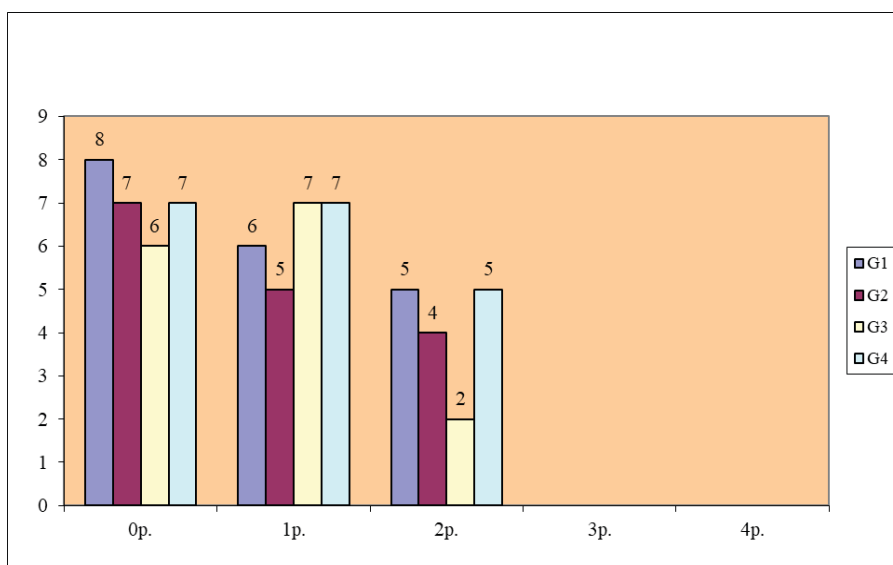
От извършените визуални наблюдения регенерация от стъблен сегмент в хранителните среди се отчита след 26-я ден от залагането на опита и в четирите вида модифицирани хранителни среди. Калусните тъкани са с бял цвят и са разположени по повърхността на експланта. При нарастване на калусната тъкан, клетките



**Фигура 1.** Регенерация листен сегмент при *Helianthus tuberosus*  
**Figure 1.** Leaf segment regeneration at *Helianthus tuberosus*



**Фигура 2.** Листни експланти в модифицирана хранителна среда G4  
**Figure 2.** Leaf explants in modified G4 medium



**Фигура 3.** Регенерация стъблен сегмент при *Helianthus tuberosus*  
**Figure 3.** Stem segment regeneration at *Helianthus tuberosus*

след процеса на деление преминават към нарастване и се диференцират като зряла калусна тъкан.

С ниски показатели на регенерация е модифицирана хранителна среда G1 и G2 с минимум  $\bar{x} = 6$  броя регенеранти от един стъблен сегмент.

Получените резултати по отношение на формиране на регенеранти от един листен сегмент (Фиг. 3) в модифицирани среди G3 и G4 е с реализирани  $\bar{x} = 7$  броя. Това е потвърждение, че концентрацията на растежните регулатори може силно да повлияе способността за регенерация.

От четирите вида модифицирани хранителни среди се отличи вариант G4 с максимум реализирани регенеранти.

Разработването на система за регенерация се определя от изискванията на генотипа на изследваният вид. След получаване на регенеранти ще се извърши проучване за максимално микроразмножаване и получаване на вторични метаболити.

## ИЗВОДИ

От проучваните четири модифицирани хранителни среди при вида *Helianthus tuberosus*, като най-подходящи за реализация на морфогенетичната способност на изследваният генотип са установени: листен експлант във модифицирана хранителна среда G3 (Quorin & Leroivre (1977) с добавени 1 mg/l BAP, 0.08 mg/l IBA и 0.05 mg/l GA), а при стъблени експлант G4 (Murashige & Skoog (1962), с добавени 1 mg/l TDZ, 0.07 mg/l IBA и 0.05 mg/l GA).

## ЛИТЕРАТУРА

- Alla, N. A. A., Ragab, M. E., El-Miniawy, S. E. M., & Taha, H. S. (2013). Callus induction, regeneration and molecular characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Applied Sciences Research*, 9(6), 3781-3790.
- Chekroun, M. B., Amzile, J., Mokhtari, A., El Haloui, N. E., Prevost, J., & Fontanillas, R. (1996). Comparison of fructose production by 37 cultivars of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *New Zealand journal of crop and horticultural science*, 24(1), 115-120.
- Cui, Y., Deng, Y., Zheng, K., Hu, X., Zhu, M., Deng, X. & Xi, R. (2019). An efficient micropropagation protocol for an endangered ornamental tree species (*Magnolia sirindhorniae* Noot. & Chalermglin) and assessment of genetic uniformity through DNA markers. *Sci. Rep.*, 9, 9634
- D'egidio, M. G., Cecchini, C., Cervigni, T., Donini, B., & Pignatelli, V. (1998). Production of fructose from cereal stems and polyannual cultures of Jerusalem artichoke. *Industrial Crops and Products*, 7(2-3), 113-119.
- Gamburg, Z., Vysotskaya, E. F., & Gamanets L.V. (1999). Microtuber formation in micropropagated Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55: 115-118.
- Hristova, L., Damyanova, E., Doichinova, Z., & Kapchina-Toteva, V. (2013). Effect of 6-benzylaminopurine on micropropagation of *Artemisia chamaemelifolia* Vill. (Asteraceae). *Bulg. J. Agric. Sci*, 19, 57-60.
- Jain, R., Sinha, A., Kachhwaha, S., & Kothari, S. (2009). Micropropagation of *Withania coagulans* (Stocks) Dunal: A critically endangered medicinal herb. *J. Plant Biochem. Biotechnol*, 18, 249-252.
- Kays, S. J. & Nottingham S. F. (2008). Propagation. In: *Biology and Chemistry of Jerusalem Artichoke Helianthus tuberosus* L. CRC Press Taylor & Francis Group, 251-268.
- Kays, S. J. & Nottingham, S. F. (2009). Chemical Composition and Inulin Chemistry In: *Biology and Chemistry of Jerusalem artichoke: Helianthus tuberosus* L. CRC press, Boca Raton, 56-79
- MacRae, Allan. (2007). Can biotechnology help kiwifruit breeders? *Acta Horticulturae*, 753, 129-138.
- Mathias, R.J. & Boyd L.A. (1986). Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci* 46, 217-223.
- Mittal, P., Gosal S. S., Senger A., & Kumar P. (2009). Impact of cefotaxime on somatic embryogenesis and shoot regeneration in sugarcane. *Physiol Mol Biol Plants* 15, 257-265.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15, 473-497.
- Qiu, Y., Guan, S. C., Wen, C., Li, P., Gao, Z., & Chen, X. (2019). Auxin and cytokinin coordinate the dormancy and outgrowth of axillary bud in strawberry runner. *BMC Plant Biol.*, 19, 528.
- Schneider, A., Godin, C., Boudon, F., Demotes-Mainard, S., Sakr, S., & Bertheloot, J. (2019). Light regulation of axillary bud outgrowth along plant axes: An overview of the roles of sugars and hormones. *Plant Sci*, 10.
- Taha, H. S., El-Sawy, A. M., & Bekheet, S. A. (2007). In Vitro Studies on Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) and Enhancement of Inulin Production. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(9), 853- 858.
- Xu X., Yao, X., & Chen, H. (2003). Application of modern biotechnology on kiwifruit, *Acta Horticulturae*, 610, 525-531.