



Списание за наука

„Ново знание“

ISSN 2367-4598 (Online)

Академично издателство „Талант“

Висше училище по агробизнес и развитие на
регионите - Пловдив

New Knowledge

Journal of Science

ISSN 2367-4598 (Online)

Academic Publishing House „Talent“

University of Agribusiness and Rural Development -
Bulgaria

<http://science.uard.bg>

EVALUATION OF SEED DEVELOPMENT AND STERILIZATION OF VARIOUS GRAIN LEGUME CROPS (PEA, CHICKPEA AND BITTER VETCH) UNDER *IN VITRO* CONDITIONS

Sofia Petrova, Stanislava Stateva

Institute of Plant Genetic Resources “Konstantin Malkov”, Sadovo, Bulgaria

Abstract: Grain legumes are protein crops that occupy an important place in the structure of agricultural production. Their use has two aspects - human food and grain and green fodder. Besides being rich in protein, they are important for natural soil fertility.

The sterilization of pea, chickpea and bitter vetch seeds is carried out with 10% calcium hypochlorite solution for 20 minutes under sterile conditions in a laminar box. The sterilized explants are cultivated on nutrient medium - Murashige & Skoog.

In the initial reporting period, most of the pea seeds survive after the sterilization. On the 15th day of experience the percentage of contamination is increased. After this period there is no change in the sterilization of pea seeds. Other sterilizing agents should be used in varying concentrations. The use of 10% calcium hypochlorite solution for 20 minutes has very good results in introducing the bitter vetch under controlled growth and development conditions. In the first reporting we have 30% contaminated chickpea seeds. In subsequent reporting, the percentage of contamination reaches to 60%, which requires at the next introduction *in vitro* to be changed sterilization procedures and to be search other sterilizing agents.

The purpose of this study is to trace the sterilization and seed development of various grain legumes (pea, chickpea and bitter vetch) under *in vitro* conditions and their subsequent testing with plant hormones added to the nutrient medium.

Keywords: pea, chickpea, bitter vetch, sterilization, *in vitro* conditions.

ОЦЕНКА НА РАЗВИТИЕ И СТЕРИЛИЗАЦИЯ НА СЕМЕНА ОТ РАЗЛИЧНИ ПРЕДСТАВИТЕЛИ НА ЗЪРНЕНО-БОБОВИ КУЛТУРИ (ГРАХ, НАХУТ И БУРЧАК) ПРИ *IN VITRO* УСЛОВИЯ

София Петрова, Станислава Статева

Институт по растителни генетични ресурси „Константин Малков“ – Садово

Резюме: Зърнено-бобовите култури са протеинови култури, които заемат важно място в структурата на земеделското производство. Тяхното използване има два аспекта – за храна на хората и за зърнен и зелен фураж. Освен че са богати на белтъчини, те има важно значение за естественото почвено плодородие.

Стерилизацията на семена от грах, нахут и бурчак се извършва с 10-процентен разтвор на калциев хипохлорид за 20 минути при стерилни условия в ламинар-бокс. Така стерилизираните експлантите се култивират върху хранителна среда – Murashige & Skoog.

В началния период на отчитане голямата част от семената на граха оцеляват след стерилизацията. На 15^{-тия} ден от залагане на опита се увеличава процентът на замърсяване. След този период няма промяна в стерилизацията на семената от грах. Налага се да се използват други стерилизиращи агенти във вариращи концентрации. Използването на 10% разтвор на калциев хипохлорид за 20 минути е с много добри резултати при въвеждане на бурчака в контролирани условия на растеж и развитие. При първото отчитане имаме 30% замърсени нахутени семена. При следващите отчитания процентът на замърсяване достига 60%, което налага при следващи въвеждания *in vitro* да се промени стерилизационната процедура и да се търсят други стерилизиращи агенти. Целта на това изследване е да се проследи стерилизацията и развитието на семената на различни представители на зърнено-бобови култури (грах, нахут и бурчак) при *in vitro* условия и последващото им изпитване с растителни хормони добавени към хранителната среда.

Ключови думи: грах, нахут, бурчак, стерилизация, *in vitro* условия.

ВЪВЕДЕНИЕ

Настъпилото през последните години глобално затопляне постави редица сериозни проблеми пред съвременната наука. В тази връзка по-детайлното изучаване на бобови култури, устойчиви към засушаване, е особено актуално и се налага от факта, че сушата е един от основните стресови фактори, оказващи неблагоприятно въздействие върху нормалното функциониране на симбиотичната система грудкови бактерии – бобово растение (Ангелова и Стоилова, 2009). Зърнено-бобовите са протеинови култури, които заемат важно място в структурата на земеделското производство. Тяхното използване има два аспекта - храна на хората и за зърнен и зелен фураж. Освен че са богати на белтъчини, те има важно значение за естественото почвено плодородие. Включването им в сеитбооборотните схеми като предшественици на други култури намалява до голяма степен азотното торене, което е особено важно с въвеждане на биологичното земеделие (Петрова, 2015).

През последните десетилетия се наблюдава завишен интерес към нахута (*Cicer arietinum*) и неговата роля в здравословния хранителен режим, както и свързано с необходимостта от ограничаване на протеините с животински произход. Семената на нахута и граха са храна с голяма биологична стойност за човека, тъй като са богати на белтъчини, въглехидрати, мазнини и минерални вещества (Lanza et al., 2003). За

отглеждане на нахут в контролирани условия с 3% захароза, добавена в хранителната среда, съобщава Gehlor et. al (2003).

Бурчакът (*Vicia ervilia*) е изключително сухоустойчив и високо продуктивен на зърно, дори на ниски и средно продуктивни почви. Културата е лесна за отглеждане и може да се развива в много плитки, алкални почви (Попов и др., 1957).

Установяване на състава на хранителните среди и балансирането на отделните съставки в зависимост от нуждите на култивиране на семената е основният фактор за въвеждане в култура *in vitro* (Атанасов, 1988; Murashige, 1962; Butcher, 1977; Bienkowska 1982; Bunu 2007).

Целта на това изследване е да се проследи стерилизацията и развитието на семената на различни представители на зърнено-бобови култури (грах, нахут и бурчак) при *in vitro* условия и последващото им изпитване с растителни хормони, добавени към хранителната среда.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Така приготвените семена (по 10 семена от грах-сорт „Теди“; бурчак-сорт „Родопи“ и една местна форма нахут) се поставят в стъклени колби и се промиват обилно под течаща вода за 1 час, след което се добавя детергент (няколко капки веро) и отново се оставя под течаща вода за половин час. Като стерилизиращ агент е изпитан 10-процентен разтвор на калциев хипохлорид за 20 минути. Стерилизацията е последвана от трикратно промиване със стерилна дестилирана вода и подсушаване на стерилна филтърна хартия. След това се потапят в 90% спирт за 10 секунди и отново се промиват трикратно в стерилна дестилирана вода и се подсушават на стерилна филтърна хартия. Така стерилизираните експлантите се култивират върху хранителна среда – Murashige & Skoog (1962), без добавени растежни регулатори. Като въглехидратен източник е използвана захароза (30 g/l), а за втвърдител - агар (7.0 g/l) с рН на средата 5,6. Регулирането ѝ е извършено с 1N КОН преди автоклавиране. Стерилизацията се извършва за 20 min при 120°C и налягане 0,9 atm. Стерилизацията на експлантите се провежда при стерилни условия в ламинар-бокс.

Отглеждането на експлантите в етапите на изпитване се осъществи в камера с температурен режим 22 –25°C и фотопериод 16 часа тъмнина и 8 часа светлина с осветление 3000 lx.

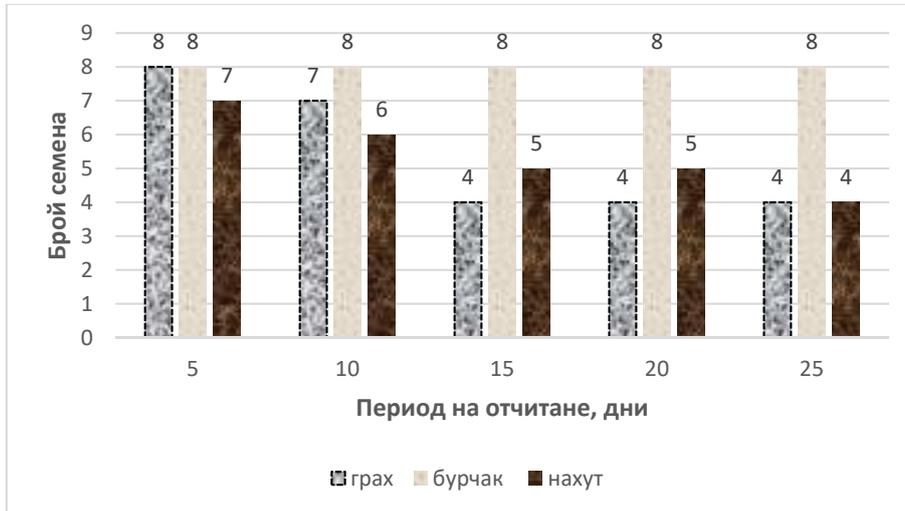
Развитието на експлантите е характеризирано чрез отчетените развити, неразвити и инфектирани експлантите спрямо броя на заложените растителни материали.

РЕЗУЛТАТИ

От направеното проучване става ясно, че трите изследвани вида (от грах-сорт „Теди“; бурчак-сорт „Родопи“ и една местна форма нахут) имат различни изисквания към експозицията и стерилизиращия агент. Особено открояваща към стерилизиращия агент е местна форма нахут. В настоящото проучване се стремим да се получи чиста култура от трите изследвани вида и на по-късен етап да се проследи влиянието на хормоните, добавени в хранителната среда, и след адаптиране в естествената среда да се проследи развитието на растенията. Биотехнологичните подходи за култивиране на стопанско значими видове позволява да се изучи морфо-физиологията, биологичната активност и изменчивостта на вида в *in vitro* условия.

При стерилизираните семена от грах сорт „Теди“, пренесени в хранителна среда на Murashige & Skoog (1962) без добавени хормони, се отчита степента на замърсеност на всеки 5 дни. В началния период на отчитане (5th ден) се наблюдава, че по-голямата част от семената на граха са оцелели след стерилизацията. Замърсяването на този ранен етап вероятно се дължи на по-ниската концентрация на стерилизиращия агент. При

второто отчитане на опита не се наблюдава промяна при въведените семената в контролирани условия. На 15-тия ден от залагане на опита се наблюдава по-голям процент на замърсяване. След този период няма промяна в стерилизацията на семената (снимка 1, фигура 1). За по-ефективна стерилизация се налага да се изпитат нови стерилизиращи агенти във варираща концентрация.



Фигура 1. Брой преживели семена от грах, бурчак и нахут през различни периоди на отчитане



Снимка 1. Семе грах при *in vitro* условия

При бурчак сорт „Родопи“ се наблюдава по-различна тенденция при стерилизация на семената в сравнение с грах сорт „Теди“. За целия период на отчитане се наблюдава 80% на преживяемост на семената. От трите опита за въвеждане в контролирани условия при бурчака се наблюдава много добро въздействие на използваните стерилизиращи агенти (снимка 2, фигура 1). Това най-вероятно се дължи на добре подбраната концентрация на стерилизиращия агент и хранителна среда. При бъдеща работа с този растителен вид ще използваме 10-процентен разтвор на калциев хипохлорид за 20 минути за максимална стерилизация на семената.



Снимка 2. Семе бурчак при *in vitro* условия

При нахута се наблюдава по-различна реакция към стерилизационната процедура в сравнение с предишните два вида. Още на първото отчитане имаме 30% замърсени семена. Причината най-вероятно е ниската концентрация на използване на стерилизиращия агент. При следващите отчитания процентът на замърсяване достига 60%, което налага при следващи въвеждания *in vitro* да се промени стерилизационната процедура. Възможно е да се използват други стерилизиращи агенти (снимка 3, фигура 1), за да очакваме по-добри резултати при въвеждане на вида в контролирани условия.



Снимка 3. Семе нахут при *in vitro* условия

ИЗВОДИ

В началния период на отчитане голямата част от семената на граха оцеляват след стерилизацията. На 15^{-тия} ден от залагане на опита се увеличава процентът на замърсяване. След този период няма промяна в стерилизацията на семената от грах. Налага се да се използват други стерилизиращи агенти във вариращи концентрации.

Използването на 10-процентен разтвор на калциев хипохлорид за 20 минути е с много добри резултати при въвеждане на бурчака в контролирани условия на растеж и развитие.

При първото отчитане имаме 30% замърсени нахутени семена. При следващите отчитания процентът на замърсяване достига 60%, което налага при следващи въвеждания *in vitro* да се промени стерилизационната процедура и да се търсят други стерилизиращи агенти.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атанасов А., 1988. Биотехнология в растениевъдството. Земиздат. София.
2. Ангелова С, Стоилова Цв. 2009. Национална колекция от зърнено-бобови култури. Земеделие плюс. 5: 10-12.
3. Петрова С., 2015. Подържане, оценка и използване на растителни генетични ресурси от нахут (*Cicer arietinum* L.). Дисертация.
4. Попов Ат, К. Павлов, П. Попов, 1957. Растениевъдство – Учебник, 335-343.
5. Bienkowska- Monchak-Zastosowanie, 1982. kultur *in vitro* w uparamie i hodowli poslin, DWRIL, Warszawa, 172.
6. Bunu E., S. R. Turner, M. Panaia and K. Dixon, 2007. The contribution of *in vitro* technology and cryogenetic storage to conservation of indigenons plants, *In vitro* cell and Developmental Biology, 16.
7. Butcher A. 1977. Plant cell tissue and organ cultures, Berlin, Springer verlag, 668.
8. Gehlor H., K Dimesh, R. Choudhary, S. Joshi and N. Sankhla, 2003. *In vitro* studies of chickpea seedlings effect of salt on growth and antioxidant activity, Vancouver airport conference, 119. Lanza M, Bella M, Barbagallo D, Fasone V, Finocchiaro L, Priolo L. 2003. Effect of partially or totally replacing soybean meal and maize by chickpeas (*Cicer arietinum* L.) in lamb diets: growth performances, carcass and meat quality. Anim. Res. 52 (3): 263-270.
9. Murashige T., F. Skoog, 1962. Arevised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant*, 497.