

## ІНДУКЦІЯ УТВОРЕННЯ КАЛЮСНИХ КЛІТИН КУЛЬТУРОЮ ПОМІДОРА (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL.) В УМОВАХ *IN* *VITRO*

**Ю.Ф. АВЕТИСЯН**, аспірантка\*

**Ю.В. КОЛОМІЄЦЬ**, кандидат біологічних наук

Наведено особливості індукції калюсогенезу культури помідора (*Lycopersicon esculentum* Mill.) залежно від мінерального складу живильного середовища, сорту та вихідного експлантата. Запропоновано умови та живильні середовища для індукції калюсоутворення різних експлантів 10 генотипів томата.

**Ключові слова:** помідор, калюсогенез, живильне середовище, експлантат, *in vitro*.

В Україні помідор (*Lycopersicon esculentum* Mill.) культивується з давніх часів і вже в XIX столітті набув широкого розповсюдження на всій її території.

Його вирощують на площах від 140 до 170 тис. га. Урожайність за регіонами коливається від 15,0 до 60,0-90,0 т/га [5]. Лідером за виробництвом помідорної продукції в Україні традиційно вважають Херсонську область, в якій зосереджено найбільші посівні площі (у 2010 р. з 15,9 тис. га було зібрано 385,6 тис. т помідорів) [7].

Перешкодою на шляху отримання високих та якісних урожаїв культури є хвороби, серед яких особливе місце посідають бактеріальні хвороби [2].

На території України виявлено збудники бактеріального раку помідора (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), чорної бактеріальної плямистості (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), бактеріальної

\*Науковий керівник – кандидат біологічних наук Ю.В.Коломієць

крапчастості (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) та бактеріального в'янення (*Ralstonia solanacearu*) [11]. Втрати від цих захворювань залежать від кліматичних умов і стійкості сорту проти стресових чинників і можуть становити до 100% всього врожаю [8].

Впровадження нових стійких сортів у виробництво може вирішити цю проблему. Селекціонери для отримання нових сортів використовують агробактеріальну трансформацію, ефективність якої залишається на низькому рівні [23], а можливість появи химерних-рослин ускладнює роботу з трансформантами [9]. Крім того встановлено, що гени стійкості швидко долаються фітопатогенами [12].

Тому, розробка методів підвищення стійкості рослин помідорів проти фітопатогенів та їх захисних механізмів є актуальними напрямками біотехнології, а метод культури клітин та тканин – незамінним її інструментом.

Нині запропоновано багато живильних середовищ для одержання калюсних ліній та рослин-регенерантів помідора (табл. 1).

### ***1. Живильні середовища для дедиференціації різних типів експлантів асептичних рослин помідора***

Регулятори росту, мг/л					Вперше запропоновано
БАП	НОК	ІОК	2,4-Д	Кін	
0,2					Pongtongka et al. [19]
2,5		0,2			Selvi D. and Khader M. [22]
	1			1,5	Chandel G. and Katiyar S. [14]
2		0,2			Kurtz et al. [18]
		16		4	Vnuchkova V. [24]
	1			0,1	Venkatachalam et al. [23]
1	1				Zhang Wei [25]
		8,0		4,0	Коломієць Ю.В., Демчук Т.Л [3]
5	2	2		4	Chaudhry Z. [15]
2	2	2			Chaudhry Z. [15]
	1			2,5	Ali Akbar Ehsanpour et al.[13]
3		2,5			Ruma Devi et al.[21]
0,5			0,1		Iyad Qassar et al. [17]

На процес калюсогенезу впливають видові і сортові особливості, умови вирощування та тип експлантанта. А склад живильного середовища може

прискорювати, сповільнювати або зовсім пригнічувати дедиференціацію окремих генотипів. Тому, не кожна біотехнологічна схема може успішно застосовуватись в роботі з різними генотипами помідора [1, 25].

**Метою нашого дослідження** було опрацювання і удосконалення наявних методик індукції калусоутворення, а також дослідження впливу складу живильного середовища та орієнтації експланта на ріст культури.

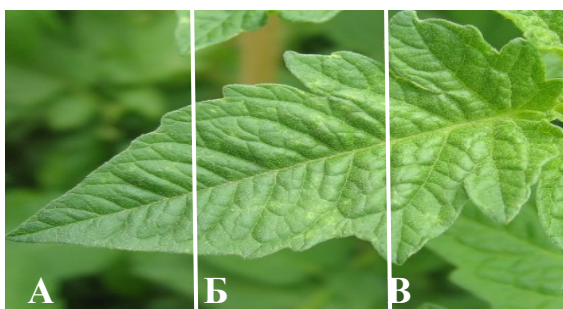
**Матеріали і методи досліджень.** Об'єктами досліджень слугували генотипи 10 сортів помідора, занесених до Державного реєстру сортів рослин, придатних до поширення в Україні, а саме: Санька, Кременчужський, Гібрид Тарасенко, Малинове віконте, Іришка, Ріо Фуего, Пето, Флора, Самсон та Лагідний.

Для одержання стерильного рослинного матеріалу насіння стерилізували 15%-ним розчином  $H_2O_2$  15 хв і культивували на живильному середовищі за прописом Мурашіге та Скуга (МС) [20]. Для отримання калусних клітин використовували живильне середовище МС з регуляторами росту: нафтилоцтовою (НОК), 2,4-дихлорфенілоцтовою кислотою (2,4-Д) та 6-бензиламінопурином (БАП) (табл.2):

## ***2. Живильні середовища для отримання калусної культури рослин помідора***

Живильне середовище	Регулятори росту, мг/л		
	БАП	НОК	2,4-Д
К1	1	0,5	-
К2	0,5	-	1,5
К3	0,5	1	-
К4	1	-	0,2
К5	1	1	-
К6	0,4	-	-

Для отримання калусної культури як експлантати використовували листові пластинки площею 0,5-1,0  $cm^2$  та сегменти стебла, вирощені в стерильних умовах. Листок ділили на три зони (рис. 1).



*Рис. 1 Зони експлантатів листка помідора*

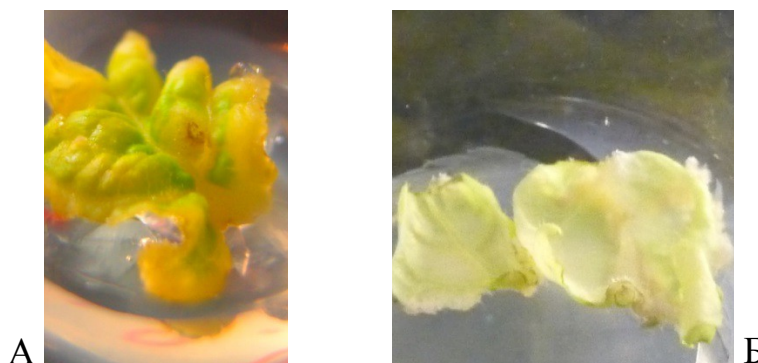
*А – базальна, Б – середня, В - апікальна*

Калюсна тканина в природних умовах формується за особливих умов (переважно за травм і пошкоджень зовнішніх покривів) [1]. Тому, для збільшення рівня проліферації калюсу на поверхні експлантатів здійснювали додаткові насічки.

Для дослідження впливу орієнтації експлантата на частоту калюсоутворення листові пластинки помідора розташовували абаксіальним нижньою частиною листка, зверненою до основи пагона та адаксіальним верхньою частиною листка [4] боком. Експлантати вирощували за температури  $25\pm 2^\circ\text{C}$  в темряві протягом 10-14 діб. Після утворення первинного калюса культивування продовжували за температури  $24\pm 2^\circ\text{C}$  та вологості 70 %, освітлення 2 клк і 16-годинного фотоперіоду. Приготування живильних середовищ, стерилізацію насіння, введення в культуру, вирощування асептичних рослин та пасажування калюсних тканин виконували за загальноприйнятими методиками [1, 6]. Частоту індукції калюсогенезу визначали як відношення кількості експлантатів, що утворили калюс, до початкової їх кількості.

**Результати досліджень та їх аналіз.** Після 6-7 діб культивування на середовищах К1, К2, К3, К4, К5 і К6 (див. табл. 2) за температури  $25\pm 2^\circ\text{C}$  в темряві, процес утворення калюсних клітин помідора починався з часткового набрякання ізольованих експлантатів та незначної деформації різної інтенсивності листових пластинок.

У місцях з додатковими нарізами і на краях листкової пластини забарвлення змінювалось із зеленого на темно-жовте (рис. 2,А). На 7-10-ту добу з дня перенесення на середовище для культивування експлантати утворювали калюсні тканини і культивування продовжували за температури  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , освітлення 2 клк, 16-годинного фотоперіоду і відносній вологості повітря 70 %.



**Рис. 2 Стан листкових експлантатів рослин помідора**

***А – абаксіальний, Б – адаксіальний бік (6-та доба культивування на середовищі K4)***

Інтенсивність калюсоутворення залежала від складу живильного середовища, генотипу і експлантата та його розміщення на поверхні твердого живильного середовища. Так, інтенсивність утворення калюсних клітин орієнтованих нижнім боком листкових експлантатів помідора для різних генотипів була в 2,5-4,5 раза нижчою, ніж верхнім (рис. 3, А і Б).

**А**

## Б

***Рис. 3. Дія регуляторів росту на частоту калюсогенезу на абаксіальному (А) та адаксіальному (Б) боці листкових експлантатів рослин помідора в культурі in vitro***

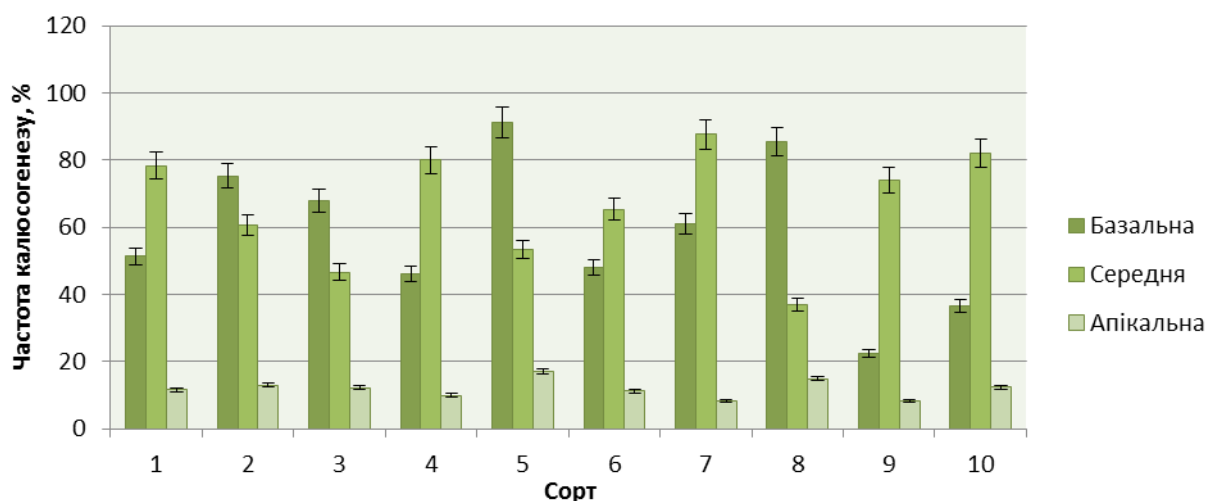
***1 – Санька, 2 – Кременчужський, 3 – Гібрид Тарасенко, 4 – Малинове віконте, 5 – Іришка, 6 – Ріо Фуего, 7 – Пето, 8 – Мобіл, 9 – Самсон, 10 – Лагідний***

Листкові експлантати, розміщені адаксіальним боком втрачали пігментацію (див. рис. 2, Б), але набрякання і утворення калюсних клітин залежно від використаного живильного середовища та генотипу коливалося в межах 7,0-32,7% (рис. 3, Б). Мінімальну частоту калюсоутворення абаксіально розміщених листкових експлантатів спостерігали у сорту Ріо Фуего К2 (6-10%), максимальну – у сорту Санька К4 (93-96%).

Відомо, що з абаксіального (зовнішнього) боку на поверхні епідермісу знаходиться захисний шар кутикули, який виконує роль захисного бар'єру проникності води та інших сполук [16]. Визначальним моментом перетворення будь-якої клітини рослини на калюсну є дія регуляторів росту [6], які проникають крізь покриви і спричиняють експресію генів, що знаходяться в неактивному стані. Тому можна припустити, що високий рівень калюсогенезу абаксіально розташованих експлантатів пов'язаний із зменшенням опору тканинних покривів для сприйняття ауксинів.

За умов поєднання в живильному середовищі БАП 1 мг/л і 2,4-Д 0,2 мг/л (К4) спостерігали найбільшу частоту калюсогенезу, рівень якої також залежав від генотипу експлантату: Санька (93-96 %), Кременчугський (78-81%), Гібрид Тарасенко (70-73%), Малинове віконте (80-85%), Іришка (94-95%), Ріо Фуего (85-90%), Пето (73-78%), Мобіл (74-79%), Самсон (88-95 %), Лагідний (93 %) (див. рис. 3, А).

Для визначення ефективності калюсогенезу на середовищі К4 листкових експлантатів, відбирали три його частини (див. рис.2). Так, відсоток проліферації залежав від фрагмента листка (рис. 4) і для сортів помідорів набував мінімального значення за умов використання його апікальної частини.



**Рис. 4 Залежність калюсоутворення різних генотипів рослин помідора від використаного фрагмента листкової пластинки**

*1 – Санька, 2 – Кременчугський, 3 – Гібрид Тарасенко, 4 – Малинове віконте, 5 – Іришка, 6 – Ріо Фуего, 7 – Пето, 8 – Мобіл, 9 – Самсон, 10 – Лагідний*

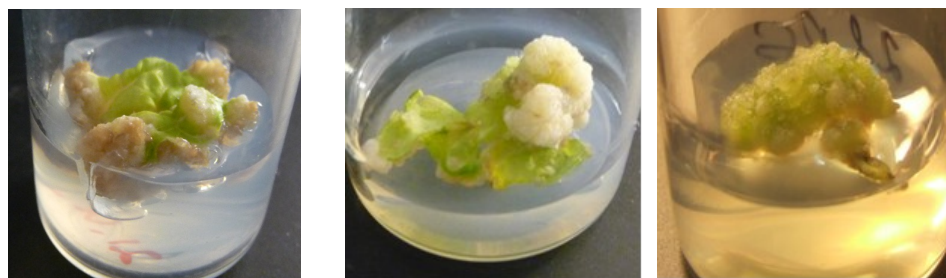
З'ясовано, що для сортів помідора Санька, Ріо Фуего, Пето, Малинове віконте, Самсон і Лагідний можна рекомендувати культивування середньої, а для сортів Кременчугський, Гібрид Тарасенко, Іришка та Мобіл – базальної частини листкової пластини.

З'ясовано, що з сегментів стебла помідора калюс формувався на 10-15-ту добу культивування. Водночас на всіх варіантах живильного середовища в умовах термостату (без освітлення) частота калюсоутворення була низькою.

При повторному вирощуванні стеблових експлантатів (за температури  $24\pm 2^\circ\text{C}$ , ВВП 70%, освітлення 2 клк і 16-годинного фотоперіоду) індукція калюсогенезу для різних варіантів зростала у 2-5 разів. З аналізу кількості стеблових експлантатів помідора, що утворили калюс, можна дійти висновку, що для повнішого утворення та проліферації калюсних клітин найефективнішим є додавання до живильного середовища 0,4 мг/мл БАП (середовище К6). За цих умов на 5-6-ту добу нами зафіксовано збільшення розмірів експлантату та часткову втрату ним пігментації, а початок проліферації рослинних тканин реєстрували на 10-12-ту добу залежно від генотипу.

Частота калюсогенезу на середовищі К6 була такою: Санька – 91-93 %, Кременчугський – 74-77 %, Гібрид Тарасенко – 80 %, Малинове віконте – 86-90 %, Іришка – 92-96 %, Ріо Фуего – 83-87 %, Пето 71-75 %, Мобіл 92-95 %, Самсон 92-94 %, Лагідний 91 %.

У серії експериментів нами вивчено вплив фітогормонів на тип утворених калюсних клітин культури помідора. Виявилось, що отримані на шести варіантах калюси були морфологічно неоднорідними. Так, з листкових експлантатів на середовищі К1, К2 і К5 формувалася темно-коричневий і напівщільний калюс, а К2 – спостерігали швидке накопичення фенолів та старіння культури. На середовищі К3 утворювався темно-жовтий напівщільний калюс (див. рис. 5, А), К4 – пухкий, злегка оводнений пастельного кольору, що легко розпадався на окремі шматочки (див. рис. 5, Б), К6 (культивування експлантів здійснювали на світлі) – пухкий, світло-зеленого кольору (див. рис. 5, В).



А

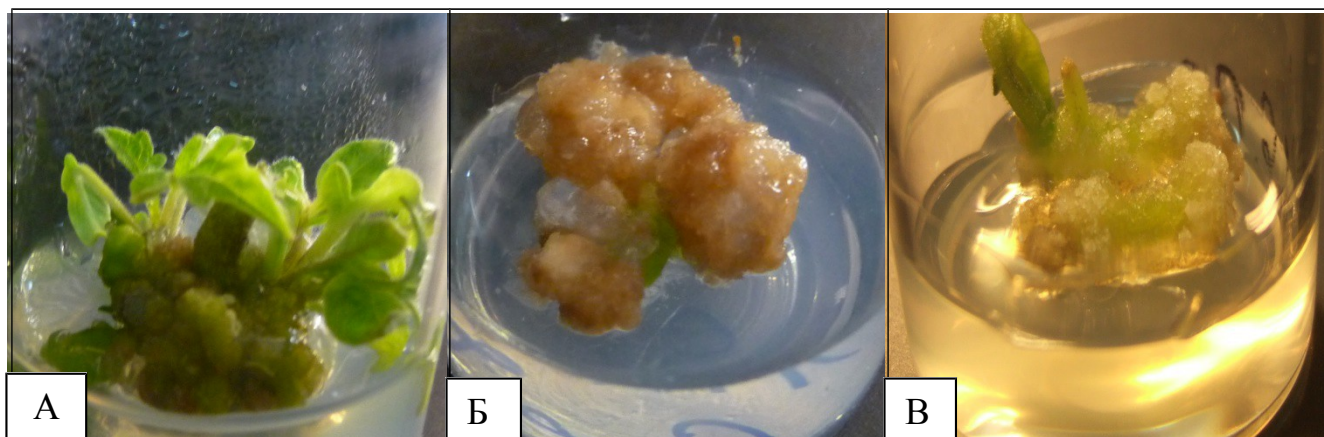
Б

В

**Рис. 5. Типи калюсних тканин рослин помідора (А – К3, Б – К4, В – К6)**



Залежно від середовища з сегментів стебла утворювалось три типи калюсних тканин: К1, К3, К4 і К5 – щільний світло-зелений з подальшим формуванням меристематичних ділянок та пагоноутворенням (див. рис. 6, А), К2 – темнокоричневий, що швидко втрачав життєздатність (див. рис. 6, Б), К6 – молочний, злегка оводнений напівпухкий, який за тривалого культивування утворював меристематичні зони з пагоноутворенням (див. рис. 6, В).



**Рис. 6 Типи калюсних тканин з стеблових експлантатів рослин помідора (А – К1, К3, К4 і К5, Б – К2, В – К6)**

З результатів досліджень випливає, що абаксіальне розташування листкової пластинки помідора на живильному середовищі забезпечило в 2,5 – 3 рази більшу частоту калюсоутворення, ніж адаксіальне.

Для індукції калюсоутворення листковими експлантатами рослин помідора рекомендовано живильне середовище К4 (МС + 1,0 мг/л БАП + 0,2 мг/л 2,4-Д) і культивування за температури  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  в темряві протягом 10-14 діб. Після утворення первинного калюса культивування необхідно продовжувати за температури  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ , ВВП 70 %, освітлення 2 клк і 16-годинного фотоперіоду. Для стеблових експлантатів – середовище К6 (МС+0,4 мг/л БАП) і культивування за температури  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ , ВВП 70 %, освітленні 2 клк, 16-годинного фотоперіоду.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология / Бутенко Р. Г. – М.: Наука, 1986. – 286 с.
2. Гвоздяк Р.І., Єтіологія масового захворювання томатів у господарствах України / С.А. Мороз, Л.М. Яковлева, Є.П. Черненко // Мікробіол. журн. – 2009. – Т. 71. – № 5. – С. 33–40.
3. Коломієць Ю.В. Регенерація виду *Lycopersicum esculentum* Mill. через культуру калюсної тканини. Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наукових праць НАН України, НАМН України, Укр. товариство генетиків та селекціонерів ім. М.І. Вавилова / редкол.: В.А. Кунах (голов. ред.). / Ю. В. Коломієць, Т.Л. Демчук. – К.: Логос, 2011. – Т.11. – С. 301–305.
4. Коровкин О.А. Анатомия и морфология высших растений: словарь терминов / О.А. Коровкин. – М.: Дрофа, 2007. – 268 с.
5. Кравченко В.А. Помідор: селекція, насінництво, технології / В.А. Кравченко, О.В. Прилипка. – К.: Аграр. наука, 2007. – 424 с.
6. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин: теорія і практика / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. – К.: Наук. думка, 2005. – 269 с.
7. Люта Ю.О. Технологія отримання насіння нових сортів томата промислового типу для Півдня / Ю.О. Люта // Проблеми інноваційно-інвестиційного розвитку. – 2012. – №4. – С. 190-193.
9. Хоанг Тхи Жан. Изучение химерных растений *Brassica Napus* L. при генетической трансформации : автореф. дис. на соискание уч. степ. канд. биол. наук : спец. 03.01.06 „Биотехнология (в том числе бионанотехнологии”) и 03.01.05 „Физиология и биохимия растений” / Хоанг Тхи Жан. – Москва, 2011. – 22 с.
10. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин: Монографія / [Гвоздяк Р. І., Пасічник Л. А., Яковлева Л. М. та ін.]; за ред. В. П. Патики. – К.: ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2011. – 444 с.
11. Черненко Є.П. Бактеріальні хвороби томату і біологічне обґрунтування заходів обмеження їхнього розвитку : автореф. дис. на здобуття

наук. ст. канд. біол. наук : спец. 06.01.11 «Фітопатологія» / Є.П. Черненко. – К., 2009. – 18 с.

12. Яруллина Л.Г. Механизмы индуцирования устойчивости пшеницы к грибным патогенам : автореф. дис. на стиск. уч. степ. док. биол. наук : спец. 03.00.12 „Физиология и биохимия растений” / Л.Г. Ярулина. – Уфа, 2006. – 21 с.

13. Ehsanpour A. Callus production and plant regeneration of two tomato cultivars (*Lycopersicon esculentum* Mill) / A. Ehsanpour // National Biotechnology Congress. – 2005. – №15. – P. 24-29.

14. Chandel G. Organogenesis and somatic embryogenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) / G. Chandel, S. Katiyar // Adv. Plant Sci. – 2000. – № 13. – P. 11-17.

15. Chaudhry Z. Tissue culture studies in tomato (*Lycopersicon Esculentum*) / Z. Chaudhry, S. Abbas, A. Yasmin // Var. Money Market Pak. J. Bot. – 2010. – № 42 (1). – P. 155-163.

16. Holloway P. The chemical constitution of plant cutins. In: Cutler, DF, Alvin, KL and Price, CE The Plant Cuticle / P. Holloway // Academic Press. – 1982. – P. 45-85.

17. Application of random amplified polymorphic analysis for the detection genetic variation in tomato (*Lycopersicon Esculentum* Mill.) / I. Qassar, S. Narmeen, R. Ahmad, M. [et al.] // Academic Press. – 2011. – № 14 (1). – P. 122-133.

18. Kurtz S. Genotypic differences in morphogenic capacity of cultured leaf explants of tomato / S. Kurtz, R. Lineberger // J. Am. Soc. Hort. Sci. – 1983. – № 108. – P. 710-714.

19. Tomato propagation by tissue culture / P. Pongtongkam, P. Ratisoontorn, S. Suputtitada, S. [et al.] // Kasetsart. – 1993. – № 27. – P. 269-277.

20. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol Plant. – 1962. – № 15. – 473-476.

21. Ruma D. Effect of growth regulators on in vitro morphogenic response of tomato / D. Ruma // Indian Journal of Biotechnology. – 2008. – № 7. – P. 526-530.
22. Selvi D. In vitro morphogenetic capacity of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) / D. Selvi, M. Khader // South Indian Hort. – 1993. – № 41. – P.251-258.
23. High frequency plantlet regeneration from hypocotyl explants of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) via organogenesis / P. Venkatachalam, N. Geetha, P. Priya, [et al.] // Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol. – 2000. – № 1. – P. 95-100.
24. Vnuchkova V. Development of a method for obtaining regenerate tomato plants under tissue culture conditions / V. Vnuchkova // Fiziol. Rast. – 1977. – № 24. – P. 1094-1100.
25. Zhang W. Factors affecting regeneration of tomato cotyledons, bioscience methods / W. Zhang, H. Leiping, Z. Hui // Pak. J. Bot. – 2012. – № 4. – P. 27-33.

**ИНДУКЦИЯ ОБРАЗОВАНИЯ КАЛУСНЫХ КЛЕТОК КУЛЬТУРОЙ  
ТОМАТА (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL.) В УСЛОВИЯХ *IN*  
*VITRO***

***АВETИСЯН Ю.Ф., КОЛОМИЕЦ Ю.В.***

Приведены особенности индукции калюсогенеза культурой помідора *Lycopersicon esculentum* Mill. в зависимости от минерального состава питательной среды, сорта и исходного эксплантата. Предложенные условия и питательные среды для индукции калюсообразования различных эксплантантов 10 сортов помидора.

**Ключевые слова:** помидор, калюсообразование, питательная среда, эксплантаты, *in vitro*.

**STUDYING OF THE PROCESS OF THE FORMATION OF CALLUS'S  
CELLS *LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL. CULTURED *IN VITRO***

***AVETYSIAN J.F., KOLOMIETS J.V.***

The peculiarities callus production culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) depending on the composition of the culture medium, genotype, explants type. The proposed conditions and culture media for inducing callus production different explants 10 genotype of tomato.

***Keywords:*** *tomato, callus production, medium, explants, in vitro.*