

В.П. Мірошніченко, науковий співробітник
Інститут овочівництва і баштанництва УААН

**МОЖЛИВОСТІ КЛОНАЛЬНОГО
МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ
МУТАНТНИХ ЗРАЗКІВ ТОМАТА
В КУЛЬТУРІ ІЗОЛЬОВАНИХ ТКАНИН**

У результаті вивчення різних способів розмноження в умовах in vitro зразків томата з мутантними генами доведено ефективність мікроживцювання як найбільш стабільного та регенерації з експлантів гіпокотилу як найбільш результативного біотехнологічних методів збереження та розмноження мутантних генотипів.

Вступ. Томат (*Lycopersicon esculentum* Mill.) за посівними площами є лідером серед овочевих рослин не лише в Україні, але й у більшості країн світу. Селекція сортів і гібридів томата ведеться у всьому світі протягом тривалого часу.

Сучасні вимоги до сортів та гібридів томата на пристосованість до механізованого збору врожаю, стійкість проти хвороб, підвищений вміст біологічно-цінних компонентів у плодах (великий вміст сухої речовини, цукрів, лікопіну, β -каротину, аскорбінової кислоти), товарний зовнішній вигляд (форма, колір, відсутність зеленої плями), високу транспортабельність та ін. потребують більш активного залучення у селекційний процес усіх новітніх методів і досягнень селекції, у тому числі мутантного генофонду [1].

Томат є класичним прикладом культурної рослини, у формуванні якої велике значення мав мутаційний процес. Для еволюції виду характерні спонтанні мутації. У монографії Кузьоменського О.В. [2] наведено перелік 614 мутантних генів за списками Центру генетичних ресурсів томата (TGRC), значна кількість яких має велику практичну цінність для селекції.

Лабораторія селекції пасльонових культур ЮБ УААН протягом останніх років постійно збільшувала власну колекцію зразків томата з мутантними генами, отримуючи їх з різних джерел. Частина одержаних генотипів мала низьку схожість насіння, тому що навіть за умовами

© Мірошніченко В.П., 2009.

збереження у генетичних банках схожість його з різних причин поступово знижується [3]. У поєднанні з невеликою кількістю насіння це створювало проблеми при збереженні і розмноженні рідкісних зразків, проте їх можливо подолати за допомогою біотехнологічних методів.

Матеріали і методи. Дослідження із збереження і розмноження *in vitro* цінного селекційного матеріалу було проведено нами у 2006-2007 роках. З лабораторії селекції пасльонових культур було передано до лабораторії біотехнології мінімальну кількість насіння (по 1-2 насінини) п'ятнадцяти зразків томата Національного Генбанку США, що містили в собі мутантні гени.

Для одержання проростків насіння в стерильних умовах було розміщено у флаконах з агаризованим безгормональним живильним середовищем за прописом Мурасиге-Скуга [4].

Розмноження зразків, що дали сходи, здійснювали способами мікроживцювання і індукції органогенезу з експлантів сім'ядольних листків, гіпокотилів, коріння, а також експлантів типу «дзьоб фламінго» [5] та колеоптилів (генотип LA 2499).

Результати і обговорення. У першому році досліджень 9 з 15 зразків, або 60 % усіх генотипів в умовах *in vitro* дали сходи. Звільнення насіння, що не проросло, від насінневої оболонки сприяло ініціюванню росту зародку зразка LA 1016, але нормальної рослини не одержано. Дані з ефективності використання різних видів експлантів на прикладі семи генотипів з кращими показниками мікророзмноження наведено в таблиці 1.

Нашими дослідженнями доведено, що індукція органогенезу в культурі гіпокотилів дозволяє отримувати від 8 до 48 адвентивних пагонів (пробіркових рослин) з однієї насінини томата; коефіцієнт розмноження (відношення кількості одержаних регенерантів до кількості первинних експлантів) при цьому складає від 1,6 до 9,8.

Виявлено індивідуальну реакцію зразків на спосіб вегетативного розмноження. У двох з дев'яти генотипів найбільш ефективним виявилось використання для мікророзмноження культивування на індукційних середовищах сім'ядольних листків – у генотипа LA 3006 з 2 експлантів сім'ядольних листків одержано 9 адвентивних пагонів, а у зразка LA 0052 з 1 експланта – 13 регенерантів.

Середня кількість регенерантів складала у варіанті з використанням сім'ядольного листка 3,3, гіпокотилу – 13,4 і коливалась у різ-

них генотипів відповідно від 1 до 13 та від 2 до 48 штук адвентивних пагонів на один каллос.

1. – Залежність коефіцієнту розмноження від типу експланту при розмноження цінних зразків томата *in vitro*, 2006 р.

Генотип	Тип експланту					
	Сім'ядольний лист	Гіпокотиль	Колеоптіль	Корінь	«дзьоб фламінго»	Живцювання
LA 3006	4,5	1,6	0	0	-	2
LA 0052	6,5	0,4	-	0	-	6
LA 2499	0	2,25	0	-	4	2
LA 3615	1	0	-	-	-	2
LA 2366	0	9,8	-	0	-	2
LA 1664	0	0	-	-	-	3
LA 0759	0	4,5	-	0	-	2
Середнє	1,7	2,65	0	0	0,6	2,7

Використання для мікророзмноження експлантів колеоптилів та кореня виявилось неефективним. Застосування в одиничному випадку експланту типу «дзьоб фламінго» виявило перспективність такого прийому - одержано 4 регенеранта генотипу LA 2499. Слід відмітити, що одержані таким шляхом регенеранти мають вищі темпи росту, ніж регенеранти з сім'ядольних листків. Це ми пояснюємо меншим травмуванням паростка при одержанні такого експланту і наявністю кореневої системи. Проте стабільні результати у розмноженні дає лише прийом мікроживцювання. У всіх зразків, що вивчались, з одного проростка цим шляхом одержано мінімум дві пробіркових рослини.

Дослідження з відновлення колекції мутантних форм томата, одержаних з Національного Генофонду США, розпочаті у 2006 році, у 2007 році було продовжено вивченням регенераційного потенціалу одержаних в процесі розмноження окремих зразків морфогенних каллосів. Каллуси для запобігання соматональному варіюванню і збереження генетичної стабільності культивували на безгормональному середовищі Мурасиге-Скуга. Необхідність депонування і вивчення регенераційного потенціалу каллосу обумовлювалась мінімальною кількістю насіння зразків НГФ США – 1-2 штук, і, в наслідок цього, можливістю загибелі одержаних рослин від випадкових причин.

Збереження морфогенних властивостей у процесі тривалого депонування було притаманне лише каллосам, отриманим з гіпокотилів проростків трьох формозразків: LA 0052 (гени bi, j, wt), LA 2366 (гени j,

gs, ds, pox), LA 0759 (гени lg, pe, vi, t). Дані із здатності до проліферації та регенераційної спроможності калюсу означених генотипів наведено в таблиці 2.

2. – Профілераційна і регенеративна здатність депонованого калюсу мутантних генотипів томата, 2007 р.

Генотип	Висаджено калюсів, шт.	Морфогенних калюсів		Середній об'єм морфогенного калюсу, мм ³	Одержано адвентивних пагонів, шт.	
		Шт.	% від висаджених		Всього	На 1 калюс
LA 0052	4	1	25	125	4	4
LA 2366	28	7	25	786	23	3,3
LA 0759	4	1	25	256	3	3
НІР ₀₅				198,6		

За результатами наших досліджень, у всіх трьох генотипів, що вивчались, чверть усіх висаджених калюсів виявилась морфогенною – 25%. Також майже однаковою була кількість адвентивних пагонів, одержаних з одного морфогенного калюсу – 3-4 штуки. Вона практично не корелювала з проліфераційною здатністю калюсу: середній об'єм калюсу у різних генотипів коливався у 3-6 разів і у зразка LA 2366 (786) істотно перевищував відповідні значення для двох інших генотипів.

Отже, у томата саме калюсогенна активність визначає вихід регенерантів при репродукуванні рослин через калюс.

Швидкість росту відокремлених від калюсу адвентивних пагонів залежала від генотипу (табл. 3.).

Довжина адвентивного пагону зразка LA 0759 (9,0) через 30 діб культивування істотно перевищувала довжину пагону інших генотипів, кількість справжніх листків цього ж зразка істотно перевищувала цей показник у зразка LA 2366. Розвиток кореневої системи у адвентивних пагонів зразка LA 2366 був помітно уповільненим у порівнянні з іншими генотипами. Темпи розвитку мікроживців різних генотипів менш різнились між собою. Найбільшими темпами росту пагона визначився зразок LA 0052, кількість справжніх листків і індекс розвитку кореневої системи у всіх зразків практично не відрізнялись. Слід

відмітити, що рослини з найбільшою довжиною стебла були найменш вразливими при переводі в умови *ex vitro*, і саме з пробіркових рослинот генотипу LA 0052 одержана горщикова розсада, що була передана селекціонерам.

3. – Біометричні характеристики адвентивних пагонів, одержаних з калюсу мутантних генотипів томата, та мікро живців з них (обліки через 30 діб після висадки), 2007 р..

Генотип	Адвентивні пагони			Мікроживці		
	Довжина пагону, мм	Кількість справжніх листків, шт.	Індекс розвитку кореневої системи, балл	Довжина пагону, мм	Кількість справжніх листків, шт.	Індекс розвитку кореневої системи, балл
LA 0052	4,0	3,1	3,5	18,0	5,5	3,5
LA 2366	4,3	2,1	0,3	11,6	5,3	3,5
LA 0759	9,0	6,0	3,3	10,0	6,0	3,0
НІР ₀₅	4,8	4,1		7,2	2,8	

Таким чином, культура гіпокотильного калюсу за безпечує необхідну для селекційної роботи кількість рослин навіть при наявності 1-2 насінин.

Висновки.

1. Культура *in vitro* дозволяє з вірогідністю 60% отримати пробіркові рослини мутантних генотипів томата за гранично малою кількістю насіння невизначеної схожості.

2. Найвищий регенераційний потенціал притаманний морфогенному калюсу, отриманому з гіпокотилів проростків насіння.

3. Мікроживцювання з використанням безгормонального живильного середовища Мурасиге-Скуга дозволяє отримувати стабільні результати з розмноження томата *in vitro*.

Бібліографія.

1. Куземенский А.В. Основные результаты селекционно-генетических исследований мутантных форм томата// Овочівництво і баштанництво. – 2005, № 51. – С.15 -24.

2. Куземенский А.В. Селекционно-генетические исследования мутантных форм томата. - Харьков, 2004. – 392 с.

3. Івченко Т.В., Кондратенко С.І., Шабетя О.М. Використання біотехнологічних методів для відновлення схожості насіння овочевих рослин // Овочівництво і баштанництво. – 2005, № 50. – С.151 -157.

4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962, № 15. – P. 473-497.

5. Pozueta-Romero J, Houlne G. et all. Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for *Agrobacterium*-mediated transformation // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – vol. 67, № 2. – 2001. – P. 173-180.

Мирошниченко В.П., ВОЗМОЖНОСТИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ МУТАНТНЫХ ОБРАЗЦОВ ТОМАТА В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ТКАНЕЙ

В результате изучения разных способов размножения в условиях *in vitro* образцов томата с мутантными генами доказано эффективность микроклонирования как наиболее стабильного и регенерации с эксплантов гипокотыля как наиболее результативного биотехнологических методов хранения и размножения мутантных генотипов.

V.P. Miroshnicbenko. POSSIBILITIES OF CLONAL MICROREPRODUCTION OF TOMATO MUTANT SAMPLES IN CULTURE OF ISOLATED TISSUES.

In the result of different methods of investigation of tomato samples with mutant genes reproduction under conditions *in vitro* there is proved the efficiency of micrografting as the most standard and regeneration of hypocotyl from explants as the most resultative biotechnological methods for preservation and reproduction of mutant genotypes.