

О.П. Самовол, доктор с.-г. наук,
П.Ю. Монтвід, канд. біологічних наук,
В.П. Мирошніченко, науковий співробітник,
О.М. Черкаський, мол. науковий співробітник,
Т.М. Замицька, ст. лаборант
Інститут овочівництва і баштанництва НААН

ГІБРИДИЗАЦІЯ МІЖ ІНКОНГРУЕНТНИМИ ВИДАМИ ТОМАТА ЯК ПОЧАТКОВИЙ ЕТАП ІНТРОГРЕСИВНОЇ СЕЛЕКЦІЇ

*Наведено результати морфологічної, цитологічної та біохімічної оцінок, створеного на основі культури in vitro гібрида F₁ томата між культурним видом *L. esculentum* (мутантна форма з 9 маркованими хромосомами) і диким видом *L. chilense*. Намічено на перспективу напрям з напрацювання теоретичних основ для успішного вирішення практичних завдань інтрогресивної селекції томата.*

Ключові слова: інтрогресія, селекція, томат, незрілі зародки, кількісні ознаки, мейоз, хіازми.

Вступ. На сьогодні є особливо очевидно, що створити конкурентні сорти і гібриди F₁ овочевих видів рослин без нових методологічних підходів і ефективних методів не тільки важко, а деяких культур навіть неможливо. Основна причина – бідність генетичного потенціалу культурних генофондів, що включає, в основному, дві головні позиції: відсутність генів стійкості до основних хвороб, шкідників і екстремальних факторам середовища; низький вміст у продуктивній частині рослини біологічно цінних компонентів [10]. Виходячи з цього, в нашому інституті при створенні вихідного матеріалу (зокрема томату) широко використовують метод міжвидової гібридизації. Цей метод в перспективі дозволить забезпечити створення нових сортів і гібридів F₁ на основі зародкової плазми еволюційно віддалених і, особливо, висококонгруентних батьківських форм томата.

Як відомо, до таких форм належать представники комплексу перуанського томата (вид *L. peruvianum* Mill. та його різновидності

© Самовол О.П., Монтвід П.Ю., Мирошніченко В.П., Черкаський О.М., Замицька Т.М., 2010.

L. peruvianum var. *dentatum* Dun. і *L. peruvianum* var. *humifusum* C. H. Mill.) і дикорослий, зеленоплідний вид *L. chilense* Dun., що зростає з просуванням ареалу на південь. Цей вид в таксономічному плані ближче за все знаходиться до різновиду *L. peruvianum* var. *dentatum* Dum. Проте відсутність сумісності *L. chilense* Dun. з представниками перуанського комплексу (Rick, Lamm, 1955; цит. за Жученко, 1973) [1] дозволяє говорити про те, що він є самостійною видовою таксономічною одиницею. В той же час даний вид нерідко проявляє односторонню сумісність з *L. esculentum* Mill., на відміну від зеленоплідних форм перуанського комплексу.

Відносно гарна схрещуваність з представниками *L. esculentum* Mill. обумовлює особливий статус *L. chilense* Dun. в програмах інтрогресивної селекції, так як цей вид є геноносієм стійкості до вірусу табачної мозаїки (BTM) – гени **Tm**, **Tm-2**, **Tm-2²**, огіркової мозаїки (ізолюваний штам 113A) – ген **Cmr** [7], *Fusarium oxysporum* f. *lucopersici* – ген **I**, *Verticillium alboatrum* – ген **Ve** [1]. Крім того, в плодах рослин *L. chilense* Dun. синтезується великий вміст аскорбінової кислоти (до 72 мг/100г сирієї речовини), кислот, що титруються (до 0,94%) і сумарного пектину (водорозчинний та протопектин, відповідно 69,0 та 252 мг/100г) [2].

Таким чином, використання в селекційному процесі зародкової плазми *L. chilense* Dun. дозволить інтрогресувати в геноми майбутніх сортів і гібридів F₁ гени біотичної стійкості, коадаптивні блоки генів абіотичної стійкості (довготривалий період засухи характерний для ареалу даного виду), гени, що контролюють синтез високого вмісту в плодах біологічно цінних компонентів, а також вирішити ряд важливих теоретичних питань для інтрогресивної селекції.

Мета. На основі схрещувань між інконгруентними видами отримати гібрид F₁ - (♀ Мо 638 x ♂ *L. chilense*), виростити і розмножити рослини через культуру *in vitro*, провести цитологічну і морфобіологічну оцінки й визначити подальший напрямок досліджень на основі використання популяції, що розщеплюється.

Матеріали і методи. Дослідження проводили в інституті овочівництва і баштанництва в 2007 – 2009 рр. в секторі прикладної генетики і лабораторії біотехнології. Схрещування проводили між двома інконгруентними видами [♀ - культурний томат (багато-маркерна мутантна форма Мо 638 з 9 маркованими хромосомами наступними генами: **y**, **r**, **mc**, **c**, **gs**, **gf**, **u**, **t**, **a**, – розшифрування фенотипового прояву генів див. Жученка, 1973 [1]) ; ♂ - еволюційно віддалена від культур-

ного томата дикорослий, зелеплідний вид *L. chilense* Dun.].

Приготування робочих розчинів для культуральних робіт із зародками гібриду проводили згідно методичних вказівок (Murashige, Skoog, 1962) [9]. Перед введенням гібридних зародків в стерильну культуру плоди томата поверхнево стерилізували [6]. Ідентифікацію гібридних рослин здійснювали на стадії гіпокотилія (за проявом на ньому антоціанового забарвлення, котре в материнської форми знаходиться в рецесивному стані – ген *a*) і на – перших справжніх листках (по формуванню нормальних, розсічених листків. У материнської форми проявляється картопляний тип листка, котрий контролюється рецесивним геном *c*). Враховуючи можливість пошкоджень паростків, їх пересаджували у пробірки з безгормональним середовищем (МС) на період розвитку коріння довжиною до 15 мм. При довжині стебла 60-100 мм і наявності не менше 5 справжніх листків пробіркові рослини розмножували мікроклонуванням і знову занурювали в безгормональне середовище (МС). Перед адаптацією мікроклонованих гібридних рослин живильне середовище зливали, а пробірки на 15 хвилин заповнювали водою з метою промивання коріння від його рештків.

Відмиті регенеранти занурювали в розчин системного фунгіциду і по 1 шт. висаджували в горщики зі штучним субстратом легкого складу та високою аерацією (на основі коко – ґрунту, котрий забезпечив приживлення рослин до 100%). Для успішної адаптації, вологість повітря підтримували на рівні 85%, температуру – 20-25 °С та освітленість 5000 – 10000 лк.

Вирощування розсади регенерантів з горщиків до пересадки в ґрунт проводили впродовж 40-55 днів.

Цитологічну оцінку гібридних рослин F₁ – (Мо 638 x *L. chilense* Dun.) та вихідних форм здійснювали згідно методики Жученко та ін. (1980). Морфо-біологічну оцінку проводили з використанням «Методических указаний по изучению и поддержанию мировой коллекции овощных пасленовых растений» [5]. Біохімічну оцінку плодів гібридних рослин проводили в акредитованому секторі аналітичних вимірювань ІОБ УААН згідно стандартизованих методів. Цифрові дані обробляли статистичними методами [4].

Результати досліджень. Неоднократна спроба отримати гібрид F₁ – (Мо 638 x *L. chilense* Dun.) на основі дорощування в культурі *in vitro* 20-денних недорозвинених зародків не дала позитивного ефекту. Тоді як в одному із зрілих плодів, серед великої кількості мікроскопічних, недозрілих зародків, був знайдений достатньо великого розміру

(біля 5 мм в діаметрі) зародок з недозрілим ендоспермом. Даний зародок помістили в умови *in vitro*, що дозволило нам не тільки виростити нормально розвинену рослину, але, після розмноження живцями, вдалося збільшити кількість їх до 10 штук. Після акліматизації міжвидові гібридні рослини були висаджені в теплицю. В період дозрівання плодів, рослини вказаного гібриду проявили індетермінантний тип куща, досягаючи при цьому висоти до 2 – 2,57 м. Вони характеризуються підвищеною кількістю додаткових пагонів (від 5 до 10); стебло гладке, без опушення.

Листки прості, світло-зелені, розсіченість проміжна, довжина від 25 до 30 см ($x = 27$ см), ширина – 14 до 15 см ($x = 14,7$ см). Листки з прилистками, котрі розташовані у основи прикріплення до стебла, є долі і долечки, що характерно для ♂ чоловічого компонента схрещування. Облиствленість середня, комплексна стійкість висока.

Китиці вильчаті, довжиною від 24 до 26 см ($x = 25,3$ см), без приквітників. Квітки типові для чоловічої форми, віночок п'ятипелюстковий, ярко-жовтий, розмах пелюстків віночка від 2,7 до 3,3 см ($x = 3,1$ см), довжина тичинкової колонки до 1 см, простежується висока ступінь прояву гетеростилії (маточка виступає від 1 до 1,5 см). Згідно наших досліджень, незалежно від ярусу квітки, фертильність пилку була високою (на рівні 85-90%). І це при тому, що в даний період (червень та початок серпня) в теплиці відмічали дуже високі температури вдень (до +55 °C), при яких хоча і рідко, зав'язуваність плодів практично не простежували. На наш погляд, це одне з біологічних пристосувань цього виду, котре сформувалося в процесі еволюції до різко змінюваних кліматичних умов і, частково, до довготривалої посухи, характерної для батьківщини *L. chilense* Dun. При зниженні температури, особливо в ночі, цвітіння гібридних рослин і зав'язування плодів різко посилилось, що дало можливість вільно фіксувати бутони розміром 1,6-2 мм у розчині Карнуа для цитологічної оцінки.

Цитологічні параметри мейозу. Перегляд тимчасових препаратів із давлених пиляків показав, що у міжвидового гібриду F₁ (Mo 638 x *L. chilense* Dun.) в профазі мейозу (на відміну від вихідних компонентів схрещування) проявляється ряд особливостей – знижується кількість відкритих та кільцевих бівалентів, частота хізм на мейоцит, з'являються уніваленти, що може свідчити про утворення інверсій чи транслокацій між гомологічними хромосомами [11], простежується

зворотна вертикальна залежність між ярусом розташування бутонів і кількістю унівалентів, спостерігаються хромосомні асоціації – три- й тетраваленти, збільшується (в 2-7 разів) частота порушень мейозу, що обумовлюється як негомологічністю окремих локусів хромосом вихідних компонентів схрещування [1], так і, як ми вже відмічали, високими денними температурами (до +55 °C).

Слід також відмітити, що наявність градієнту з частоти інтерстиціальних хіазм і порушень мейозу узгоджується з даними, одержаними для іншого виду пасльонових рослин – баклажана [8].

Плоди почали інтенсивно зав'язуватись в період з кінця червня до початку серпня в кількості від 14 до 20 плодів на одній китиці (\bar{x} = 16,3 см). Поверхність плоду матова, без опушення, помітний прояв макрокаліксу (чашолистки переростають дозрілі плоди, ген *mc*). Індекс форми плоду (h/d) від 1,3/1,3 до 1,8/1,5 (\bar{x} = 1,1). Середня маса плоду на рівні 4,6 г. Довжина вегетаційного періоду 130 днів. Згідно раніше проведених досліджень [12], дикий вид *L. chilense* Dun. накопичує в плодах більше 107,6 мг/100г сирої речовини аскорбінової кислоти. На жаль в 2009 році цей показник в лабораторії масових аналізів не визначали, що не дозволило встановити долю інтрогресії вітаміну С в геном гібриду. В той же час інші, не менш важливі, біологічні компоненти в плодах гібрида F_1 – (\varnothing Мо 638 x *L. chilense* Dun) накопичуються в значних кількостях: сухої речовини на рівні 7,6%, загального цукру – 6,0%, кислот, що титруються – 0,96%.

Насіння. При оцінці наявності в 20 нормально розвинених і дозрілих плодах виявлено, що зустрічається їх мала кількість, до 3 штук (\bar{x} = 1,6 шт. на 1 плід).

Перспективи. Замість загальних висновків слід відмітити, що в подальшому на основі оцінки розщеплюваних міжвидових гібридних популяцій планується:

- одержати набір перспективних ізоляцій з новим комплексом селекційно-цінних кількісних і якісних ознак, користуючись тим, що в геном рослин культурного томата інтрогредовані від дикорослого виду *L. chilense* Dun. гени біотичної стійкості, коадаптовані блоки генів абіотичної стійкості, гени високого вмісту біологічно цінних компонентів в плодах. Цьому також може сприяти той факт, що дія генів, яка здійснює контроль кількісних ознак, частіше всього носить адитивний характер, тобто це той випадок, коли сумується ефект кожного із генів, створюючи при цьому якісно нову генотипову мінливість;

- провести на основі маркерного аналізу перший етап картування господарсько-цінних кількісних ознак, користуючись тим, що в цій комбінації використовуються гени, які маркують ділянки ДНК 9 хромосом томата;
- визначити частоту кросинговеру, рівень рекомбінації і «квазізчеплення» за 9 із 12 хромосом томата та їх зв'язок з цитологічними параметрами мейозу;
- спланувати проведення ряду інших генетичних, фізіологічних, біотехнологічних і селекційних досліджень.

Бібліографія.

1. Жученко А. А. Генетика томатов / Жученко А. А. – Кишинев: Штиинца, 1973. – 663с.
2. Дикие виды и полукультурные разновидности томатов и использование их в селекции / [Жученко А. А., Глушенко Е. Я., Андрищенко В. К. и др.]. – Кишинев: «Карта Молдовеняскэ», 1974.– 138с.
3. Индуцирование хромосомных перестроек и локализация генов, контролирующих некоторые признаки в геноме томатов / Жученко А. А., Грати В. Г., Андрищенко В. К.[та ін.] // Изв. АН Молдовской ССР.– Сер. биол. и хим. Наук. – 1980.– № 4.– С. 24 – 30
4. Лакин Г. Ф. Биометрия / Лакин Г. Ф.– М.: Высшая школа, 1990.– 352с.
5. Методические указания по изучению и поддержанию мировой коллекции овощных пасленовых культур (томаты, перцы, баклажаны). – Ленинград, 1977.– 34с.
6. Методика досліджень в культурі ізольованих тканин овочевих рослин / [Мірошніченко В. П., Сергієнко О. Ф., Івченко Т. В. та ін.]. – Мерефа: ІОБ УААН, 2004. – 25 с.
7. Monogenia Stocks Listed – TGC Rep.– № 49. – 1999.
8. Монтвід П. Ю. Компенсаційний розподіл хіазм в межах репродуктивної системи гібридів F₁ *Solanum melongena* L. / П. Ю. Монтвід // Вісник Харківського аграрного університету. Сер. Біологія.– 2006.– Вип. 2.– С. 61 – 65.
9. Murashige I. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / I. Murashige, F. A. Skoog // Physil. Plant.– 1962.– V. 15.– P. 473 – 497.
10. Самовол О. П. Генетичний потенціал видів роду *Capsicum* L. і *Lucopersicon* Tourn. та шляхи розширення спектра доступної для селекції генотипової мінливості: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня

д-ра с.-г. наук: спец. 03. 00. 15 «Генетика» / О. П.Самовол. – Київ. – 2004. – 35 с.

11. Смирнов В. Г. Цитогенетика / Смирнов В. Г. – М.: Наука, 1991. – 247с.

12. Черкасский А. М. Межвидовая гибридизация как метод возможного обогащения плодов сортов и гибридов томата биологически ценными компонентами / А. М. Черкасский, А. П. Самовол // Збір. тез наук. допов. молодих учених. – ІОБ УААН. – 2009. – С. 31 – 32.

А.П. Самовол, П.Ю. Монтвид, В.П. Мирошніченко, А.М. Черкасский, Т.Н. Замыцкая. Гибридизация между инконгруэнтными видами томата как начальный этап к интрогрессивной селекции.

Резюме. Приведены результаты морфобиологической, цитологической и биохимической оценок, созданного на основе культуры *in vitro* гибрида F₁ томата между культурным видом *L. esculentum* Mill.(мутантна форма с 9 маркированными хромосомами) и диким видом *L. chilense* Dun. Намечено на перспективу направление по разработке теоретических основ для успешного решения практических задач интрогрессивной селекции томата.

A. P. Samovol, P. Yu. Montvid, V. P. Miroshnichenko, A. M. Cherkasskij, T. N. Zamytskaya. Hybridization between incongruent tomato varieties as the initial stage to the introgressive selection.

Summary. The results of morphobiological, cytological and biochemical estimations of the tomato hybrid F₁, which had been created on the basis of the culture *in vitro*, between culture variety *L. esculentum* Mill. (mutant form with 9 marking chromosomes) and the wild variety *L. chilense* Dun, are given. The direction on the working out of theoretical foundations for successful decision of practical tasks of introgressive tomato selection have been outlined in prospect.