

Т.М. Мірошниченко, аспірант
Т.В. Івченко, кандидат с.-г. наук
Інститут овочівництва і баштанництва НААН

РОЗМНОЖЕННЯ СТЕРИЛЬНИХ ФОРМ ТОМАТА ДЛЯ ГЕТЕРОЗИСНОЇ СЕЛЕКЦІЇ ЗА ДОПОМОГОЮ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ

*Проведено дослідження трьох режимів стерилізації первинних експлантатів чотирьох стерильних форм томата, та вивчення процесів калюсогенезу, морфогенезу та регенерації експлантатів у наступних пасажах. Під час вирощування рослин покоління R_0 в тепличних умовах підтверджено наявність ознаки ФЧС у зразка 99/11. Зроблено висновок щодо необхідності подальших досліджень з метою створення ефективної біотехнологічної системи для розмноження стерильних форм томата в культурі *in vitro*.*

Ключові слова: томат, стерильні форми, функціональна чоловіча стерильність, клональне мікророзмноження, стерилізація експлантатів.

Вступ. Одним із пріоритетних напрямів сучасної селекції томата як для відкритого, так і для закритого ґрунту є створення гетерозисних гібридів F_1 . Переваги гібридної селекції загальновідомі: скорочення селекційного процесу майже вдвічі, можливість досить легко вирішити питання поєднання в одному генотипі комплексної стійкості до біотичних та абіотичних факторів середовища та господарсько-цінних ознак (урожайності, скоростиглості, якості плодів тощо) [1, 2].

На сьогоднішній день в усьому світі спостерігається тенденція до переведення гібридного насінництва на стерильну основу. Це дозволяє значно спростити технологію отримання гібридного насіння і знизити його вартість, насамперед за рахунок скорочення витрат ручної праці.

У рослин томата відомо декілька типів стерильності,
© Мірошниченко Т.М., Івченко Т.В., 2013.

зумовлених генами *ms*, *sl*, *ps* [2, 3]: лонгостілія, функціональна чоловіча стерильність (ФЧС), пилоквова генетична стерильність, тичинкова стерильність, безтичинковість квіток.

На думку переважної більшості дослідників, найбільш перспективною і придатною для масового виробництва гібридного насіння є ФЧС, зумовлена геном *ps* [2, 3, 6].

Істотною перешкодою на шляху застосування стерильних форм томата у виробництві є складність їх збереження і відтворення. Одним із найбільш перспективних способів збереження і розмноження стерильних рослин є мікроклональне розмноження у культурі *in vitro*. Застосування біотехнологічних методів дозволяє клонувати окремі рослини з комплексом необхідних ознак і підтримувати їх у культурі *in vitro* в необхідній кількості протягом тривалого часу, зберегти унікальні зразки, які інколи виділяються в ході селекційного процесу.

Незважаючи на те, що томат (*Lycopersicon esculentum* Mill.) є одним з найбільш детально досліджених видів, який легко культивується у стерильній культурі, способи клонального мікророзмноження саме стерильних форм томата, а також методики стерилізації вегетативних органів у науковій літературі описані фрагментарно. Тому метою наших досліджень була розробка біотехнології розмноження стерильних форм томата, зокрема визначення ефективного режиму стерилізації первинних експлантатів та добір репродуктивної системи.

Матеріали і методи. Дослідження проведено впродовж 2012 – 2013 років. Методичною основою експериментальної роботи слугувала стандартизована методика [4].

Для розмноження в культурі *in vitro* введено апекси та пазушні бруньки рослин двох зразків томата з генетичною пилоквою стерильністю (53 і 73) та двох – з ФЧС (91/2, 99/11), виділених доктором с.-г. наук Самоволом О.П. Рослинний матеріал уведено в стерильну культуру в серпні 2012 р. у 4 прийоми, з інтервалами у 7 днів.

Стерилізували експлантати занурюючи їх у 70 % етиловий спирт на 5 с та 25% розчин гіпохлориту натрію – на 15, 18 і 20 хв., потім 5-кратно промивали стерильною дистильованою водою.

У якості базового використано поживне середовище Мурасіге-Скуга (MS) безгормональне та з додаванням фітогормонів: 1) ГК₃ у концентрації 0,1 мг/л; 2) 6-БАП і НО₂К у концентраціях 1 мг/л. Калюси у віці 35 діб висаджували на індукційне середовище

БІ-2 (модифіковане середовище MS з додаванням 4 мг/л 6-БАП і 2 мг/л ІОцК) для ініціації морфогенезу. Розмножували рослини-регенеранти мікроживцюванням на рідкому безгормональному середовищі MS.

Умови культивування: температура – 23-25°C, фотоперіод – 16 год. освітлення та 8 год. темноти, освітлення – 2 тис. лк, тривалість пасажу 35 – 40 діб. Обліки проводили через 30 діб після депонування первинних експлантів. Адаптацію рослин-регенерантів до нестерильних умов здійснювали за стандартизованою методикою [4].

Стерильність пилку рослин томата покоління R₀ визначали ацетокарміновим методом [5].

Результати досліджень. Схему мікроклонального розмноження стерильних зразків томата можна розділити на наступні етапи: 1) введення в культуру *in vitro* донорського матеріалу (добір і стерилізація первинних експлантів); 2) індукція регенерації; 3) розмноження рослин-регенерантів мікроживцюванням; 4) адаптація рослин-регенерантів до нестерильних умов; 5) висаджування адаптованих рослин у теплиці. Ця схема співпадає з класичною схемою мікророзмноження будь-якої рослини, за виключенням етапу укорінення рослин-регенерантів – у томата цей процес не потребує додаткової стимуляції.

Успішність першого етапу значною мірою залежить від обраного режиму стерилізації. У 2012 р. нами досліджено 3 режими стерилізації первинних експлантів з використанням 70% етилового спирту та 25% водного розчину гіпохлориту натрію у якості основної стерилізуючої речовини. Як видно із даних, наведених в таблиці 1, найбільш ефективною виявилась обробка протягом 18 хв., яка дозволила отримати 26,5% життєздатних стерильних експлантів. Обробка гіпохлоритом натрію протягом 15 хв. є недостатньою і дозволяє зберегти лише 25 % експлантів.

Експозиція 20 хв. виявилась абсолютно неприйнятною, оскільки для стерилізації експлантів з високим рівнем контамінації вона була недостатньою, а для відносно чистого матеріалу – занадто жорсткою. В результаті, усі експлантати загинули (табл.1).

1. – Залежність життєздатності експлантатів томата від тривалості обробки гіпохлоритом натрію (2012 р.)

Режим стерилізації		Показник	Генотип				% життєздатних експлантатів
			53	73	91/2	99/11	
1	15 хв.	Висаджено експлантатів, шт.	7	7	3	3	25,0
		Життєздатних експлантатів, шт.	1	1	2	1	
2	18 хв.	Висаджено експлантатів, шт.	7	8	5	14	26,5
		Життєздатних експлантатів, шт.	4	1	2	2	
3	20 хв.	Висаджено експлантатів, шт.	7	27	9	6	0,0
		Життєздатних експлантатів, шт.	0	0	0	0	

В цілому, з усіх варіантів досліду 48,5 % експлантатів загинуло від внутрішньої інфекції, що говорить про низьку ефективність використання гіпохлориту натрію для стерилізації вегетативних органів томата.

Результати досліду свідчать, що ефективність стерилізації експлантатів залежить від строків їх добору (табл. 2). Так, із експлантатів, уведених у культуру *in vitro* 01.08.12, в середньому за всіма генотипами життєздатними були 32,2 %, а уведених 15.08.12 – лише 8,4 %.

2. – Життєздатність експлантатів в залежності від строків введення в культуру *in vitro*, % (2012 р.)

Генотип	Дата введення в культуру <i>in vitro</i>				Середнє
	01.08.12	08.08.12	15.08.12	22.08.12	
53	14,3	57,1	14,0	0	23,8
73	14,3	12,5	0	0	4,8
91/2	66,7	60,0	19,4	0	29,4
99/11	33,3	14,2	0	0	13,0
Середнє	32,2	35,9	8,4	0	19,1

Зниження кількості життєздатних експлантатів пов'язане з накопиченням у рослинах внутрішніх бактеріальних інфекцій, а також з переходом рослин у фазу закінчення вегетації.

В середньому найвищий відсоток вдало введених у стерильну культуру експлантатів характерний для зразка № 91/2 (29,4%), найнижчий – для №73 (4,8 %) (табл.2). Різниця між генотипами, окрім впливу випадкових факторів, пов'язана з різним рівнем контамінації рослин-донорів бактеріальними та вірусними інфекціями, різним ступенем опушеності експлантатів тощо.

Після введення експлантатів у культуру було проведено вивчення процесів калюсогенезу, морфогенезу та регенерації експлантатів у наступних пасажах. Експлантати, висаджені на безгормональне середовище MS не розвивалися і згодом загинули. Причиною цього, на нашу думку, був дефіцит ендотелогенного гормонального живлення експлантатів і, як наслідок, пригнічення коренеутворення. На середовищах з додаванням ГК і 6-БАП та НОцК спостерігався калюсогенез. Усереднені дані для всіх досліджених генотипів, які характеризують інтенсивність процесів калюсогенезу і морфогенезу досліджених експлантатів, приведено в таблиці 3.

3. – Інтенсивність калюсогенезу і морфогенезу в різних генотипів стерильних форм томата (2012 – 2013 рр.)

Гено-тип	1 пасаж		2 пасаж		3 пасаж	
	Середній об'єм калюсу, мм ³	% морфогенезу	Середній об'єм калюсу, мм ³	% морфогенезу	Середній об'єм калюсу, мм ³	% морфогенезу
53	83,2±7,9	0,0	140,8±5,2	0,0	229,3±21,6	25,0
73	123,0±2,5	0,0	240,0±10,1	0,0	154,7±10,0	0,0
91/2	1023,3±99,4	0,0	297,5±5,3	0,0	253,3±11,5	46,7
99/11	554,0±11,1	0,0	465,7±21,2	10,0	496,3±40,3	40,0

Середній об'єм калюсу зразка № 53 збільшувався з кожним пасажем. Середній об'єм калюсу зразків № 73 та 99/11 протягом трьох пасажів залишався приблизно на одному рівні. Для генотипа 91/2 найвищі показники калюсогенезу визначено протягом першо-

го пасажу. При подальшому культивуванні середній об'єм каллосу зменшився втричі. Це можна пояснити звиканням каллосної тканини до фітогормонального складу живильного середовища, а також активізацією процесу морфогенезу.

Морфогенез у каллосній тканині генотипу 99/11 спостерігався вже у другому пасажі, генотипів 53 та 91/2 – у третьому. Найвищий процент морфогенезу визначено у генотипу 91/2 – 46,7 %, найнижчий – у генотипу 53 – 25,0 %. У генотипу 73 морфогенез протягом трьох пасажів не спостерігався.

Після другого пасажу було отримано адвентивні пагони та рослини-регенеранти 50 % досліджуваних генотипів (зразки 91/2 та 99/11). Пробіркові рослини були розмножені методом мікроживцювання та висаджено у квітні 2013р. у торф'яні таблетки для адаптації до нестерильних умов.

При вирощуванні рослин покоління R₀ в тепличних умовах аналіз підтвердив наявність ознаки ФЧС у зразка 99/11. Даний генотип залучено до подальших селекційно-генетичних досліджень.

Висновки. Найбільш ефективним із досліджених режимів стерилізації є обробка донорського матеріалу 25% гіпохлоритом натрію протягом 18 хв., яка дозволила отримати 26,5% життєздатних стерильних експлантатів.

Існує необхідність удосконалення методик ранньої ідентифікації стерильних форм томата, що дозволить своєчасно вводити в стерильну культуру цінні для селекції зразки, а також подальших досліджень з розробки методики добору і стерилізації експлантатів та створення ефективної біотехнологічної системи для розмноження стерильних форм томата в культурі *in vitro*.

Бібліографія.

1. Генетические основы селекции растений. Частная генетика растений / Под ред. А.В. Кильчевского, Л.В. Хотылевой. – Минск : Беларуская навука, 2010. – 579 с.

2. Кильчевский А.В. Добродькин М.М. и др. Результаты изучения гетерозисных гибридов томата, созданных при участии фертильных и стерильных форм / А.В. Кильчевский, М.М. Добродькин, И.Г. Пугачева, А.М. Добродькин, А.В. Исаков // Овощеводство : сборн. научн. трудов – Минск, 2010. – Т. 17. – С. 264-272.

3. Куземенский А.В. Селекционно-генетические исследования мутантных форм помидора. / А.В. Куземенский. – Харьков, 2004. – 392 с.

4. Мірошніченко В.П., Сергієнко О.Ф., Івченко Т.В. та ін. Методика досліджень в культурі ізольованих тканин овочевих рослин. / В.П. Мірошніченко, О.Ф. Сергієнко, Т.В. Івченко [та ін.] – Мерефа : ІОБ УААН, 2004. – 25 с.

5. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. / З.П. Паушева – М.: Колос, -1970. – 255 с.

6. Харченко В. А. Создание гетерозисных гибридов F_1 томата для открытого грунта на основе функциональной мужской стерильности/ Автореф. дис. канд. с.-х. наук. – М. : 2000. – 22 с.

Т.М. Мирошніченко, Т.В. Івченко

Размножение стерильных форм томата для гетерозисной селекции с помощью биотехнологических методов.

Резюме. Проведены исследования трех режимов стерилизации первичных эксплантов четырех стерильных форм томата и изучение процессов каллусогенеза, морфогенеза и регенерации эксплантов в последующих пассажах. Во время выращивания растений поколения R_0 в тепличных условиях подтверждено наличие признака ФМС у образца 99/11. Сделан вывод о необходимости дальнейших исследований с целью создания эффективной биотехнологической системы для размножения стерильных форм томата в культуре *in vitro*.

T.M. Miroshnichenko, T.V. Ivchenko

The reproduction of sterile forms of tomato for heterosis breeding using biotechnology techniques.

Summary. Three sterilization modes of primary explants of tomato sterile forms were investigated and the processes of callusogenesis, morphogenesis and regeneration of explants in subsequent passages were studied. During the grow plants of R_0 generation in greenhouses conditions have confirmed the presence of the characteristic of FMS in the sample 99/11. It was concluded that further research is need to create an effective biotechnological system for propagation sterile forms of tomato *in vitro*.