

## АНАЛІЗ ВПЛИВУ РІЗНИХ КОМБІНАЦІЙ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ ПАГОНІВ ЦІННИХ СОРТІВ *LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL. В УМОВАХ *IN VITRO*

Томат (*Lycopersicon esculentum* Mill.) є другою за рівнем споживання сільськогосподарською культурою по всьому світі (після картоплі) [1], яка має високу смакову та харчову цінність. На території України томати займають провідне місце серед овочевих культур за експортом та вирощуванням у закритому ґрунті [2]. Однак суттєвою проблемою, пов'язаною з їх вирощуванням, є висока вразливість цієї культури бактеріальними та грибними хворобами, які можуть завдати 30–80 % втрати врожаю [3]. Тому створення нових ефективних підходів до боротьби із цими хворобами є важливим питанням на сьогоднішній день. Одним із можливих шляхів вирішення окресленого питання є підвищення стійкості рослинного організму до патогенів. Використання методів класичної селекції дозволяє шляхом схрещувань із дикими близькоспорідними видами переносити гени стійкості до певного патогена у геноми культурних сортів томатів [2]. Однак ця резистентність із часом долається фітопатогенами внаслідок їхньої здатності швидко еволюціонувати [4]. Перспективним підходом до підвищення здатності рослинного організму протистояти зараженню бактеріальними та грибними шкідниками є використання сучасних методів генетичної інженерії для перенесення генів стійкості до геномів цінних сортів рослин [5, 6].

Хоча минуло вже 30 років з часу публікації першого протоколу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації томатів, цей метод досі пов'язаний із певними складностями, основною серед яких є низька частота перенесення цільових генів у геном цієї рослини [7]. Серед факторів, що впливають на ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації томатів важливіми є особливості генотипу, тип експланта та фітогормональний склад живильного середовища [8, 9]. Тому метою нашої роботи було удосконалення наявних методів культивування та індукції регенерації рослин томатів в умовах *in vitro*. Для проведення дослідження було обра-

но 2 сорти *L. esculentum* – Money Maker (як модельний сорт, для якого розроблено протокол *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації [7]) та український сорт Лагідний, для якого на сьогоднішній день не розроблено ефективних методик отримання регенерантів у культурі *in vitro*, а також генетичної трансформації [8]. Обидва сорти є промислово цінними, однак чутливими до фітопатогенів. Нами було досліджено регенераційний потенціал 3 видів експлантів (сім'ядольні листки, листкові диски та гіпокотилі) під впливом 6 різних комбінацій ауксину та цитокинінів у складі базового живильного середовища на основі МС (Мурашіге-Скуга) [10]. На основі проведеного аналізу було обрано живильне середовище, доповнене фітогормонами, якому властива найвища частота регенерації *L. esculentum* сортів Money Maker та Лагідний в культурі *in vitro*. Це середовище для регенерації буде використано в подальших дослідженнях із генетичного удосконалення таких сортів томатів шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації.

### Матеріали і методи

Введення в культуру *in vitro* сортів томатів *L. esculentum*. Для отримання стерильного рослинного матеріалу насіння томатів стерилізували 2–3 хв у 70 %-му етанолі та 15 хв у 5 %-му водному розчині гіпохлориту натрію (NaOCl). Після цього насіння відмивали стерильною дистильованою водою 3 рази по 10 хв та висаджували його на тверде живильне середовище Мурашіге-Скуга (МС) [10], що містило базові мінеральні солі МС (4,3 г/л), 30 г/л сахарози та 8 г/л агару (рН 5,7). Насіння пророщували протягом 2 тижнів за температури 24°C при 16-годинному фотоперіоді у скляних чашках Петрі (d=9 см) до утворення проростків висотою 1–1,5 см. Проростки переносили у стерильні скляні циліндричні ємності із базовим живильним середовищем МС, адаптованим для культивування томатів (МСТ0),

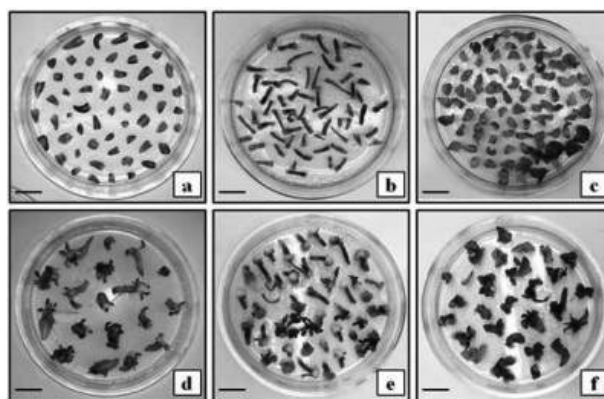
до складу якого входило 4,3 мг/л макро- та мікро-солей МС, 100 мг/л міо-інозиту, 0,5 мг/л нікотинової кислоти, 0,5 мг/л піридоксину, 1 мг/л тіаміну, 2 мг/л гліцину, 30 г/л сахарози, 8 г/л агару, рН 5,7. Рослини томатів розмножували мікроклонально. Для цього в асептичних умовах за допомогою скальпеля ізолювали ділянки стебла, що містили пазушні бруньки, та переносили експланти у стерильні ємності зі свіжим середовищем МС. Процес повторювали кожні 4–5 тижнів у міру видовження пагонів.

Дослідження впливу різних факторів на регенерацію *L. esculentum in vitro*. Було проаналізовано регенераційний потенціал 3 типів експлантів: сім'ядольні листки та гіпокотилі 2-тижневих проростків і листові диски стерильних рослин, які вирощували в умовах *in vitro*. Рослинний матеріал ізолювали за використання стерильного леза, відокремлюючи сім'ядольні листки від проростка та розрізаючи кожен сім'ядольний листок на 2–3 частини таким чином, щоб експланти мали розмір 2–3 мм. Так само від пагонів за допомогою стерильного леза відокремлювали верхівкову меристему і прикореневу частину і розрізали сам експлант на 2 частини так, щоб ділянки гіпокотилі мали розмір 5–10 мм. Листкові диски ізолювали із стерильних рослин томатів, які вирощували в умовах *in vitro*. За допомогою леза із листових дисків видаляли черешок та центральну жилку, розрізали листок на декілька частин, які мали розмір 5 мм. Всі типи експлантів переносили у стерильні скляні чашки Петрі діаметром 9 см на живильне середовище МС із додаванням фітогормонів. Було досліджено вплив 6 різних комбінацій ауксину (індолил-3-оцтової кислоти, ІОК) та цитокинінів (зеатину (Зеа) та ббензиламінопурина (БАП)) в різних концентраціях у складі живильного середовища МСТ0 на частоту та інтенсивність регенерації рослин томатів. Зокрема, було використано такі комбінації регуляторів росту рослин у складі середовища МСТ0: 1 мг/л ІОК, 1 мг/л Зеа (МСТ1) [11, 12]; 0,1 мг/л ІОК, 1 мг/л Зеа (МСТ2) [13]; 0,1 мг/л ІОК, 2 мг/л Зеа (МСТ3) [7, 9], 0,1 мг/л ІОК, 3 мг/л БАП (МСТ4) [14]; 0,5 мг/л ІОК, 2 мг/л БАП (МСТ5) [15]; 0,5 мг/л ІОК, 0,5 мг/л БАП (МСТ6) [15]. Рослинний матеріал пересаджували на свіже середовище кожні 2 тижні в міру збільшення розмірів експлантів. Ефекти впливу фітогормонів оцінювали через місяць після початку експерименту за значенням частоти регенерації, яку обрахову-

вали як співвідношення кількості експлантів із регенерантами до загальної кількості висаджених експлантів. Статистичну обробку даних проводили за використання критерію Ст'юдента для 5 %-го рівня значущості.

### Результати та обговорення

Нами було досліджено вплив різних концентрацій та комбінацій фітогормонів на регенераційну здатність різних типів експлантів томатів сортів Money Maker та Лагідний. Культивування експлантів цих сортів томатів на різних середовищах МСТ, доповнених регуляторами росту рослин у різних концентраціях, тривало 35 днів. Як контрольні зразки у дослідженні було використано сім'ядольні листки, гіпокотилі та листові диски томатів, культивовані на безгормональному середовищі МСТ0. Після 5 тижнів культивування на цьому середовищі на жодному із досліджених типів експлантів не спостерігали регенерацію пагонів або утворення коренів, лише відбувалося збільшення розмірів експлантів приблизно вдвічі та утворення білого калюсу (рис. 1 а-с). У результаті було виявлено, що найбільша частота регенерації (76 %) для сорту Money Maker характерна для гіпокотилів на живильному середовищі МСТ1 (рис. 1 е; 2). Цей результат підтверджують інші дослідження, спрямовані на підбір умов для ефективної регенерації



**Рис. 1.** Результати впливу живильних середовищ із додаванням 1 мг/л Зеа, 1 мг/л ІОК, а також 3 мг/л БАП, 0,1 мг/л ІОК на регенерацію пагонів на різних типах експлантів *L. esculentum* сорту Money Maker в умовах *in vitro*: а, д – сім'ядольні листки, б, е – гіпокотилі, с, ф – листові диски, а, б, с – експланти на безгормональному середовищі МСТ0, д, е – експланти на середовищі МСТ1, ф – експланти на середовищі МСТ4. Культивування всіх типів експлантів проводили протягом 5 тижнів. Масштабна позначка 1 см

*in vitro* томатів сорту Money Maker [11, 12], у цих роботах частота регенерації досягала значення 69 % для гіпокотилів. Трохи нижчу частоту регенерації демонстрували сім'ядольні листки при культивуванні на середовищі аналогічного складу – 73 % в присутності 1 мг/л ІОК та 1 мг/л Зеа (рис. 2 d; 3).

Загалом для сім'ядольних листків томатів сорту Money Maker частота регенерації складала відповідно 73, 26, 36, 24, 21 та 0,5 % на живильних середовищах МСТ1, МСТ2, МСТ3, МСТ4, МСТ5, МСТ6 (рис. 2). Для гіпокотилів томатів Money Maker частота регенерації складала 76, 60, 17, 67, 38 та 20 % на середовищах МСТ1, МСТ2, МСТ3, МСТ4, МСТ5, МСТ6 відповідно (рис. 2). У попередніх дослідженнях із генетичної трансформації томатів сорту Money Maker, за використання селективних середовищ, які містили концентрацію фітогормонів, аналогічну до середовища МСТ2 (1 мг/л Зеа та 0,1 мг/л ІОК), частота регенерації становила 4,2 % [13] – очевидно, що це значення значно нижче, ніж отримане у нашому дослідженні. За застосування селективних середовищ, доповнених фітогормонами у концентрації, що відповідають середовищу МСТ3 (2 мг/л Зеа, 0,1 мг/л ІОК), частота *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації томатів сорту Money Maker була вищою, ніж у тих випадках, коли використовували комбінацію фітогормонів 1 мг/л Зеа та 0,1 мг/л ІОК у складі селективного середовища, і становила відповідно 9 % та 10,6 % [7, 9]. Для листових дисків частота регенерації була нижчою порівняно з такими значеннями для гіпокотилів та сім'ядольних листків. Максимальна частота регенерації для листових дисків становила 18 % при культивуванні на середовищі МСТ4 з додаванням 0,1 мг/л ІОК та 3 мг/л БАП (рис. 1 f). Цей результат відрізняється від отриманого у попередніх дослідженнях за використання такої ж концентрації фітогормонів та типів експлантів [13] – у цій роботі частота регенерації листових дисків томатів Money Maker становила 67,3 %. В іншій роботі зазначені значення частоти регенерації гіпокотилів та сім'ядольних листків становлять, відповідно, 70 % та 68 % за використання комбінації фітогормонів, що співпадала із такою у середовищах МСТ5 та МСТ6 (0,5 мг/л ІОК, 2 мг/л БАП та 0,5 мг/л ІОК, 0,5 мг/л БАП) [15]. Ці значення є вищими, ніж отримані у проведеному дослідженні, але у роботі [15] було використано інший сорт томатів – Hezuo 908. Така різниця частоти регенерації різних сортів томату на живильних

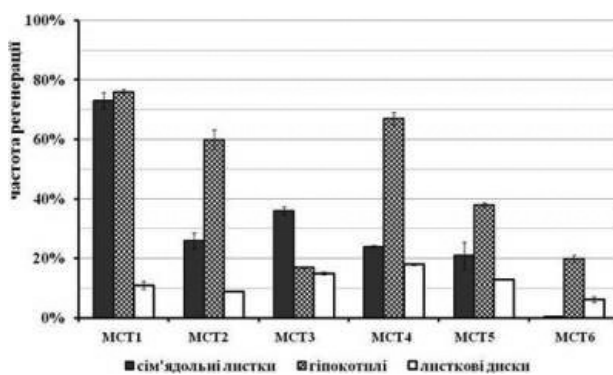


Рис. 2. Частота регенерації різних типів експлантів томату сорту Money Maker

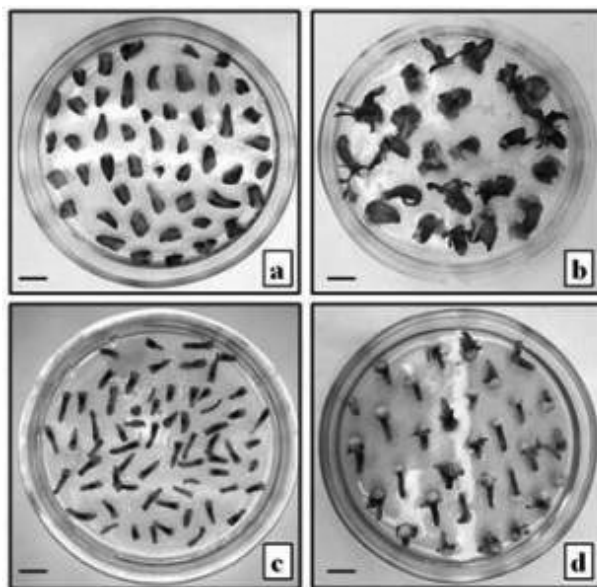
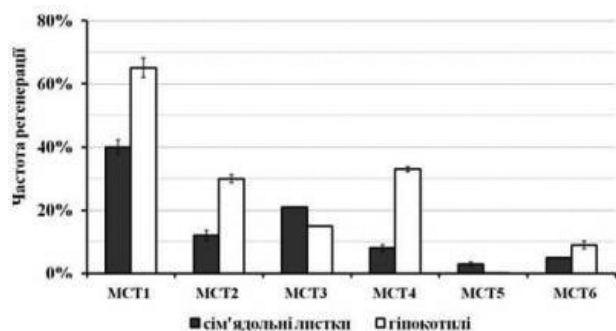


Рис. 3. Результати впливу 1 мг/л Зеа та 1 мг/л ІОК у складі живильного середовища МСТ1 на регенерацію пагонів на різних типах експлантів *L. esculentum* сорту Лагідний в умовах *in vitro*: а, б – сім'ядольні листки, с, д – гіпокотилі, а, с – експланти на безгормональному середовищі МСТ0, б, д – експланти на середовищі МСТ1. Культивування всіх типів експлантів проводили протягом 5 тижнів. Масштабна позначка 1 см

середовища однакового складу може бути пояснена іншими лабораторними умовами культивування цих сортів.

Для сім'ядольних листків та гіпокотилів томату сорту Лагідний частота регенерації після 35 днів культивування була дещо меншою порівняно із сортом Money Maker, і за використання комбінації фітогормонів 1 мг/л ІОК та 1 мг/л Зеа її максимальний показник складав відповідно 40 % та 65 % (рис. 3 б, д; 4).

Загалом же частота регенерації сім'ядольних листків томату сорту Лагідний складала 40,



**Рис. 4.** Частота регенерації різних типів експлантів томату сорту Лагідний

12, 21, 8, 3, 5 % на середовищах МСТ1, МСТ2, МСТ3, МСТ4, МСТ5, МСТ6 (рис. 4). Для гіпокотилів томату сорту Лагідний частота регенерації складала 65, 30, 15, 33, 0,1 та 0,9 % на середовищах МСТ1, МСТ2, МСТ3, МСТ4, МСТ5, МСТ6 відповідно (рис. 4).

## Висновки

У результаті проведеної роботи було підібрано найбільш сприятливі умови для високої регенерації в умовах *in vitro* цінних сортів томату (*Lycopersicon esculentum*) – Money Maker та Лагідний. Було виявлено, що для отримання високих значень частоти регенерації (65–76 %) експлантів (гіпокотилів та сім'ядольних листків) найоптимальнішим поєднанням концентрацій регуляторів росту була комбінація 1 мг/л індоліл-3-оцтової кислоти та 1 мг/л зеатину. Результати проведеного дослідження будуть використані в подальшій роботі з підвищення стійкості взятих нами сортів *L. esculentum* до фітопатогенів за використання методів генетичної інженерії.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Genetics, Genomics and Breeding of Crop Plants // Ed. by Liedl B., Labate J., Stommel J., Slade A., Kole Ch. – CRC Press, 2013. – 480 p.
2. Новак І.М. Аналіз стану та перспектив розвитку зовнішньоекономічної торгівлі овочами закритого ґрунту у світі // Вісн. Харк. нац. техн. ун-ту сільськогосподарства. Сер. «Економічні науки». – Харків: ХНТУСГ, 2011. – Вип. 113. – 505 с.
3. Скрипник Н.В. Структура популяції збудника фітофторозу томатів [Електронний ресурс] // Захист і карантин рослин. – 2012. – Вип. 58. – С. 214–219. – Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zikr\\_2012\\_58\\_25](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zikr_2012_58_25).
4. McDonald B., Linde C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance // An. Rev. of Phytopath. – 2002. – 40. – P. 349–379.
5. Owen W., Zamir K. Genetic engineering for increasing fungal and bacterial disease resistance in crop plants // GM Crops. – 2010. – 1, N 4. – P. 199–206.
6. Yemets A., Tanasienko I., Krasylenko Yu., Blume Ya. Plant-based biopharming of recombinant human lactoferrin // Cell Biol. Int. – 2014. – 38. – P. 989–1002.
7. Jeroen S., Damm B., Melchers L., Hoekema A. Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*) // Plant Cell Rep. – 1993. – 12. – P. 644–647.
8. Аветисян Ю.Ф., Коломієць Ю.В. Індукція утворення калюсних клітин культурою помідора (*Lycopersicon esculentum* Mill.) в умовах *in vitro* [Електронний ресурс] // Наук. доп. Нац. унів. біорес. і природокор. Укр. – 2013. – 5. – Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Nd\\_2013\\_5\\_4](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Nd_2013_5_4).
9. Frary A., Earle E. An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato // Plant Cell Rep. – 1996. – 16. – P. 235–240.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – 15. – P. 473–497.
11. Muhammad K., Muhammad U., Muhammad L. Facile plant regeneration from tomato leaves induced with spectinomycin // Pak. J. Bot. – 2006. – 38, N 4. – P. 947–952.
12. Chaudhry Z., Abbas S., Yasmin A., Rashid H. Tissue culture studies in tomato (*Lycopersicon esculentum*) var. MoneyMaker // Pak. J. Bot. – 2010. – 42, N 1. – P. 155–163.
13. Brıza J., Pavingerová D., Přikrylová P., Gazdová J., Vlasák J., Niedermeierová H. Use of phosphomannose isomerase-based selection system for *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato and potato // Biol. Plant. – 2008. – 52, N 3. – P. 453–461.
14. Shah S., Ali S., Jan S., Din J., Ali G. Callus induction, *in vitro* shoot regeneration and hairy root formation by the assessment of various plant growth regulators in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) // J. Anim. Plant Sci. – 2015. – 25, N 2. – P. 528–538.
15. Sheng S., Xiu-Ping K., Xiao-Juan X., Xiao-Yong X., Jiao Ch., Shao-Wen Zh. Guo-Ming X. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Hezuo 908) with improved efficiency // Biotech. Biotechnol. Equip. – 2015. – 29, N 5. – P. 861–868.

**BUZIASHVILI A.YU., YEMETS A.I.**

*Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine,  
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: flora16.92@mail.ru*

**ANALYSIS OF INFLUENCE OF DIFFERENT GROWTH REGULATOR'S COMBINATIONS ON PLANTLETS REGENERATION *IN VITRO* OF VALUABLE *LYCOPERSICON ESCULENTUM* VARIETIES**

**Aim.** Cultivation of tomatoes *Lycopersicon esculentum* Mill. is usually associated with a high risk of fungal and bacterial infection which can cause 30–80 % yield loss. Genetic engineering methods are widely used to cope with this problem. The efficiency of plant genetic engineering methods is closely related with a suitable *in vitro* cultivation conditions. In this article the methods for effective plant regeneration of valuable tomato varieties (Money Maker and Lahidny) are proposed. **Methods.** Using modified MS medium supplemented with the plant growth regulators the regeneration efficiency of different explant types was compared. **Results.** The highest regeneration frequency was observed on the explants cultivated on the MS medium containing 1 mg/l of indole-3-acetic acid and 1 mg/l zeatin. Hypocotyl and cotyledon regeneration frequency of Money Maker 2-week-old seedlings was 73 and 76 % after cultivation during 5 weeks, and for Lahidny cultivar regeneration level was 40 and 65 % after 4 weeks of cultivation. **Conclusions.** Further studies on genetic transformation of tomato cultivars should be conducted with the use of regeneration medium containing 1 mg/l of indole-3-acetic acid and 1 mg/l of zeatin because of the high regeneration level (65–76 %) shown for this combination of plant growth regulators.

**Keywords:** fungal pathogens, *Lycopersicon esculentum* Mill., *in vitro* culture, growth regulators, regeneration frequency.