



ОСОБЕННОСТИ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОБИРОЧНЫХ РАСТЕНИЙ ОТДАЛЕННЫХ ГИБРИДОВ ТОМАТА

Мирошниченко Т.Н. – м.н.с. лаб. биотехнологии, генетических ресурсов
и теоретических основ селекции, аспирант

Ивченко Т.В. – кандидат с.-х. наук, зав. лаб. биотехнологии, генетических ресурсов
и теоретических основ селекции

Самовол А.П. – доктор с.-х. наук, в.н.с. лаб. биотехнологии, генетических ресурсов
и теоретических основ селекции

Институт овощеводства и бахчеводства НААН Украины

Украина, 62478, Харьковская обл., Харьковский р-н, г. Мерефа, п/о Селекционное, ул. Овощеводов, 1

Тел.: +8 (057) 748-91-91, факс: +8 (057) 748-91-91, e-mail: ovoch.iob@gmail.com

Исследованы особенности изменения морфологических параметров пробирочных растений отдаленных гибридов F₁ томата при длительном культивировании в условиях in vitro. Депонирование на протяжении 12 пассажей на безгормональной среде MS не приводит к появлению соматоклональных вариантов, но способствует повышению коэффициентов вариации признаков растений-регенерантов.

Ключевые слова: томат, отдаленная гибридизация, культура in vitro

Введение

Отдаленная гибридизация – одно из наиболее перспективных и популярных направлений современной селекции томата. Скрещивание культурного томата с дикорастущими видами существенно расширяет спектр генотипической изменчивости данной культуры. Дикие виды и полукультурные разновидности растений являются наиболее богатыми генетическими

источниками устойчивости к абиотическим и биотическим факторам среды. В частности, дикие и полукультурные виды томата играют исключительную роль в селекции как доноры устойчивости к основным патогенам: вирусным, бактериальным, грибковым заболеваниям, нематодам, некоторым вредителям [3, 5, 9, 11].

Рядом исследователей из межвидовых популяций были выделены пер-

спективные генетически разнокачественные селекционные линии с комплексом хозяйственно ценных признаков: раннеспелость в сочетании с холодоустойчивостью и продуктивностью, хорошая завязываемость плодов в стрессовых условиях и высокие показатели биохимического состава плодов, и созданы новые сорта томата [2, 11].

Преградой для получения межвидовых гибридов томата являются

природные барьеры несовместимости геномов диких видов и культурных сортов [1, 8, 9, 12]. Часто гибель гибридных зародышей является результатом отсутствия эндосперма либо его аномального развития. В таких случаях перспективно выращивание гибридных зародышей на искусственных питательных средах с добавлением необходимых трофических компонентов, которые *in planta* содержатся в эндосперме в условиях нормального его развития [1, 9, 12]. Методика выращивания зародышей межвидовых гибридов томата в культуре *in vitro* оказалась успешной для комбинаций *L. esculentum* x *L. hirsutum*; *L. esculentum* x *S. pennellii*; *L. esculentum* x *L. minutum* и др., что позволяет сохранять маложизнеспособные рекомбинантные генотипы с ценными комбинациями генов [1, 12]. Применение методов биотехнологии позволяет не только преодолеть барьеры несовместимости при отдаленных скрещиваниях, размножать гибридные растения в необходимых количествах и доращивать их до репродуктивной фазы, но и использовать данный материал при проведении селекционно-генетических исследований.

С точки зрения сохранения генетических ресурсов значительный интерес вызывает возможность длительного депонирования ценного селекционного материала томата в культуре *in vitro*. Из литературных источников [3, 10] известно, что соматическая изменчивость у томата начинает проявляться, как правило, после 10-12 пассажей на искусственных питательных средах. Поэтому целью исследований являлась оценка влияния культивирования *in vitro* на морфологические параметры растений отдаленных гибридов томата.

Материалы и методы

Исследования проводили на протяжении 2012-2014 годов на базе лаборатории биотехнологии, генетических ресурсов и теоретических

основ селекции Института овощеводства и бахчеводства НААН Украины. Работы в изолированной культуре выполняли в соответствии со стандартизированными методиками [6, 7]. В 2012 году в стерильную культуру на агаризованную безгормональную среду Мурасиге-Скуга (MS) вводили по 3-6 семян 4-х гибридных комбинаций: *L. esculentum* Mill. (Mo 638) x *L. esculentum* var. *cerasiforme*; *L. esculentum* Mill. (Mo 638) x *L. esculentum* var. *pimpinellifolium*; *L. esculentum* Mill. (Mo 638) x *L. minutum*; *L. esculentum* Mill. (Mo 638) x *L. hirsutum* var. *glabratum*.

Контроль интрогрессии при межвидовой гибридизации значительно облегчается за счет использования форм томата с мутантными генами, поскольку большинство из них являются маркерными и идентифицируются визуально на фенотипическом уровне [4]. Поэтому в качестве материнской формы во всех комбинациях скрещиваний использовали мутантную форму томата *L. esculentum* Mo 638, которая характеризуется рядом маркерных фенотипических признаков (гении *v*, *u*, *gs*, *c*, *a*). Отцовские формы имели контрастные доминантно проявляющиеся фенотипические признаки: индетерминантный тип куста, обычная форма листа, антоциановая окраска вегетативных органов. Растениям *L. hirsutum* присуща высокая степень опушенности.

С целью усиления способности к рекомбиногенезу данного материала для проведения дальнейших селекционно-генетических исследований семена гибридов F₁ предварительно обрабатывали γ-лучами в дозах 7 и 15 кР; контрольный вариант – без обработки.

Полученные проростки размножали черенкованием на жидкой безгормональной среде MS при стандартных условиях освещения и температурного режима. Продолжительность пассажа 30 суток. После 4-го та 12-го пассажа пробирочные растения адаптировали к нестерильным условиям.



Результаты и обсуждение.

Семена гибридных комбинаций Mo 638 x var. *pimpinellifolium*, Mo 638 x var. *pimpinellifolium*, Mo 638 x *L. minutum* проросли в изолированной культуре на пятые – седьмые сутки. В то время как семена гибрида Mo 638 x *L. hirsutum* var. *glabratum* проросли через пятнадцать суток, а облученные в дозах 7 кР и 15 кР – только через 74 – 79 суток культивирования. Это можно пояснить тем, что *L. hirsutum* var. *glabratum* является наиболее филогенетически отдаленным от культурного томата из использованных в исследовании диких видов. Таким образом, полученные в этой комбинации гибридные семена были наименее жизнеспособными. Кроме того, на наш взгляд, на всхожесть семян повлияло предварительное γ-облучение. Несмотря на это, полученные проростки были вполне нормальными и фенотипически не отличались между собой.

Растения из семян всех гибридных комбинаций имели фенотип отцовских форм, что подтверждает гибридное происхождение данных растений.

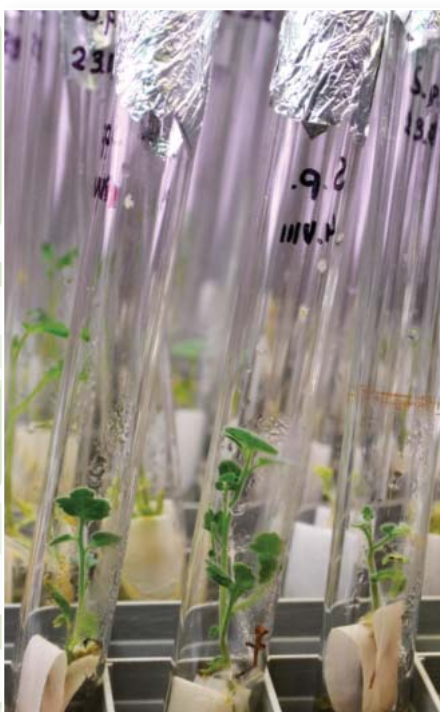
На безгормональной среде MS из микрочеренков развивались полно-



Пробирочные растения межвидовых гибридов *L. esculentum* Mill. (Мо 638) x *L. minutum*



Депонирование пробирочных растений межвидовых гибридов томата в культуре *in vitro* Каллусогенез из семядольных эксплантов отдаленных гибридов томата



Пробирочные растения межвидовых гибридов *L. esculentum* Mill. (Мо 638) x *L. minutum*

ценные растения. Коэффициенты размножения в первом пассаже составляли от 1,3 (Мо 638 x var. *cerasiforme*) до 3,8 (Мо 638 x var. *pimpinellifolium*). Основные показатели развития пробирочных растений приведены в таблице 1.

На развитии эксплантов в изолированной культуре достаточно ярко про-



Плоды томата межвидовых гибридов *L. esculentum* Mill. (Мо 638) x *L. esculentum* var. *pimpinellifolium*

явилось воздействие γ -облучения семян, которое приводило к существенному угнетению роста побегов, снижению среднего количества листьев у гибридной комбинации Мо 638 x *L. hirsutum* var. *glabratum* и снижению интенсивности корнеобразования у всех остальных исследованных гиб-

ридных комбинаций. На количество жизнеспособных эксплантов, по результатам дисперсионного анализа экспериментальных данных, облучение семян существенно не повлияло. Однако, наименьшее их количество, вполне закономерно получили из семян в варианте с наивысшей дозой облучения (15 кР). У комбинаций Мо 638 x var. *pimpinellifolium* и Мо 638 x *L. hirsutum* var. *glabratum* в первом пассаже отмечена тенденция к уменьшению количества жизнеспособных эксплантов с повышением дозы γ -облучения семян.

Тенденции, которые проявились в первом пассаже, сохраняются до четвертого пассажа включительно. Наиболее угнетающее действие на рост и развитие пробирочных растений всех гибридных комбинаций на протяжении 4 пассажей культивирования *in vitro* оказала обработка дозой 7 кР.

Предварительное облучение донорского материала, культуральные условия (состав питательной среды), продолжительность культивирования, а также случайные различия в условиях культивирования (степень освещенно-

сти, температура) приводят к проявлению фенотипических отличий у пробирочных растений и соматической изменчивости. С целью определения влияния изолированной культуры на развитие растений-регенерантов была исследована динамика изменений их основных количественных параметров, таких как количество листьев, высота растения, длина корня, а также коэффициентов их вариации на протяжении 12 пассажей.

Результаты исследований показали, что количественные показатели пробирочных растений постепенно снижались с каждым субкультивированием до 4-8-го пассажа включительно. Так, минимальная средняя высота растения у гибрида Мо 638 x *L. hirsutum* var. *glabratum* определена в восьмом пассаже (рис. 1), длина корня – в шестом (рис. 2), количество листьев – в десятом (рис. 3). Различия по вариантам γ -облучения находятся в пределах ошибки опыта.

Динамика изменений изучаемых показателей у других гибридных комбинаций аналогична выше приведен-

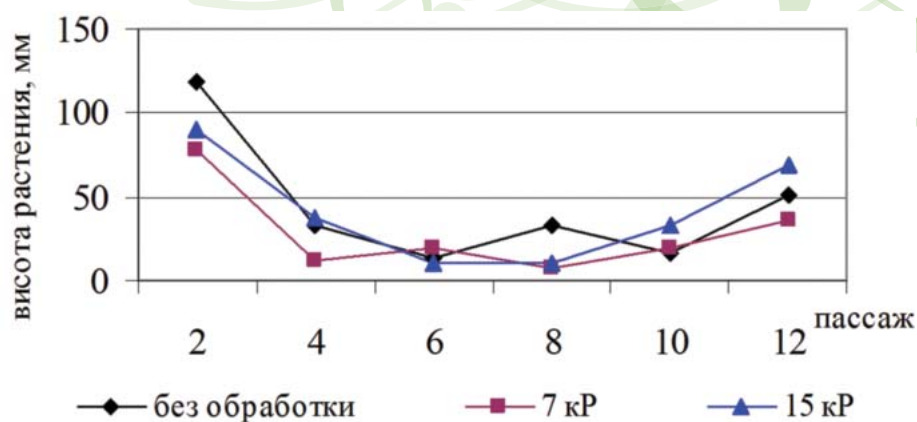


Рис. 1. Динамика изменений средней высоты растений-регенерантов гибрида F1 томата Мо 638 x *L. hirsutum* var. *glabratum* на протяжении 12 пассажей

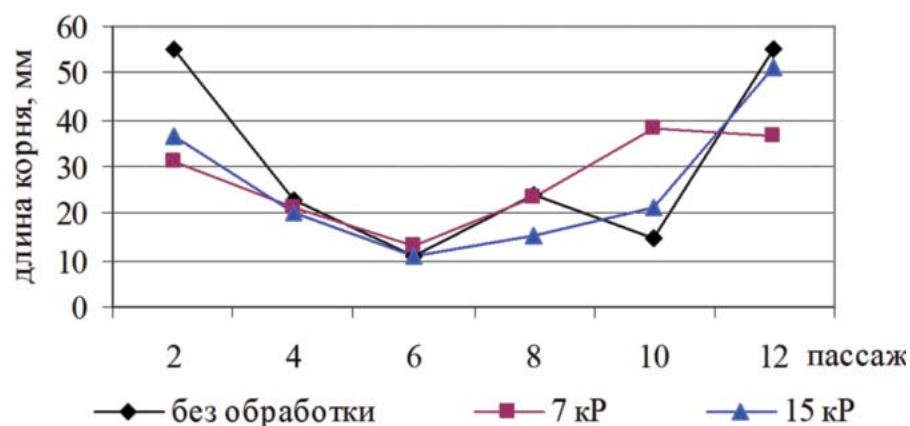


Рис. 2. Динамика изменений средней длины корня растений-регенерантов гибрида F1 томата Мо 638 x *L. hirsutum* var. *glabratum* на протяжении 12 пассажей

1. Параметры признаков растений отдаленных гибридов томата в первом пассаже, 2012 год

Комбинация скрещивания	Доза γ -облучения	Жизнеспособные экспланты, %	Высота растения, мм	Длина корня, мм	Количество листьев, шт.
Мо 638 x <i>L. esculentum</i> var. <i>cerasiforme</i>	без обработки	74,4	54,2 $\pm$ 4,4	50,0 $\pm$ 5,8	5,9 $\pm$ 1,2
	7 кР	81,6	33,3 $\pm$ 1,3	40,7 $\pm$ 5,3	7,0 $\pm$ 2,4
	15 кР	50,0	40,1 $\pm$ 2,2	30,1 $\pm$ 3,8	5,5 $\pm$ 1,0
Мо 638 x <i>L. esculentum</i> var. <i>pimpinellifolium</i>	без обработки	62,5	105,4 $\pm$ 6,4	41,6 $\pm$ 3,9	7,2 $\pm$ 2,5
	7 кР	60,0	70,7 $\pm$ 4,4	32,3 $\pm$ 2,5	5,9 $\pm$ 2,0
	15 кР	53,3	94,0 $\pm$ 5,6	40,7 $\pm$ 4,8	6,6 $\pm$ 2,0
Мо 638 x <i>L. minutum</i>	без обработки	94,0	61,3 $\pm$ 4,7	43,0 $\pm$ 5,7	5,8 $\pm$ 1,4
	7 кР	93,3	48,2 $\pm$ 3,5	33,8 $\pm$ 2,6	6,4 $\pm$ 1,5
	15 кР	90,0	82,5 $\pm$ 7,8	42,5 $\pm$ 4,7	6,8 $\pm$ 1,5
Мо 638 x <i>L. hirsutum</i> var. <i>glabratum</i>	без обработки	73,3	117,4 $\pm$ 10,7	55,0 $\pm$ 5,0	8,6 $\pm$ 2,0
	7 кР	55,0	20,0 $\pm$ 2,6	31,0 $\pm$ 3,0	3,1 $\pm$ 1,0
	15 кР	63,3	24,3 $\pm$ 3,3	31,0 $\pm$ 2,8	2,9 $\pm$ 1,2
HCP05		14,1	41,2	10,6	2,7

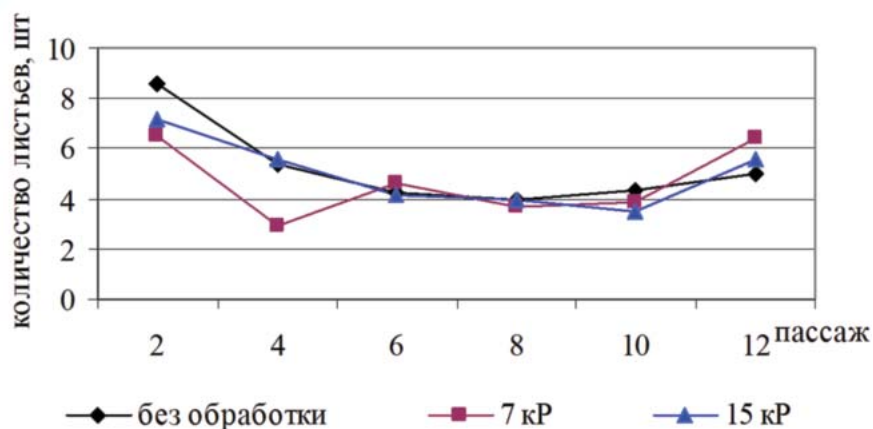


Рис. 3. Динамика изменений среднего количества листьев растений-регенерантов гибрида F_1 томата Mo 638 x *L. hirsutum* var. *glabratum* на протяжении 12 пассажей

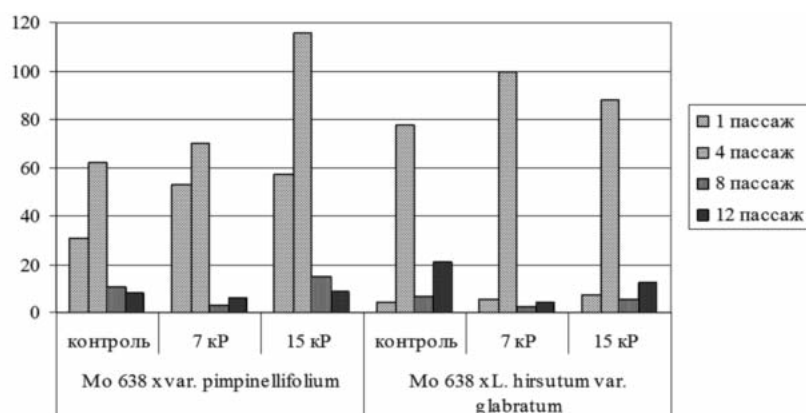


Рис. 4. Изменение коэффициентов вариации высоты пробирочных растений отдаленных гибридов F_1 томата на протяжении 12 пассажей

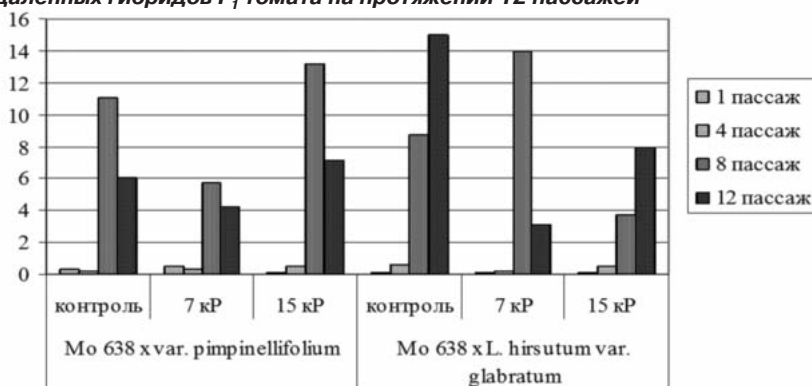


Рис. 5. Изменение коэффициентов вариации длины корня пробирочных растений отдаленных гибридов F_1 томата на протяжении 12 пассажей

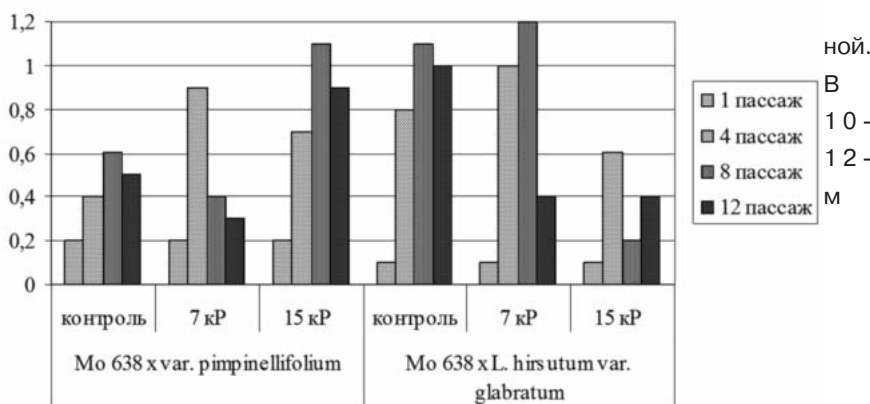


Рис. 6. Изменение коэффициентов вариации среднего количества листьев у пробирочных растений отдаленных гибридов F_1 томата на протяжении 12 пассажей

пассажах наблюдалось постепенное повышение количественных показателей растений-регенерантов.

Определено, что наиболее вариабельным признаком в культуре *in vitro* является высота пробирочных растений. Значения коэффициента вариации данного параметра в первом пассаже в комбинациях скрещивания Mo 638 x var. *cerasiforme*, Mo 638 x var. *pimpinellifolium*, Mo 638 x *L. minutum* приняли изменчивый характер – от 30,7% (Mo 638 x var. *cerasiforme*, 15 кР) до 66,9 % (Mo 638 x var. *cerasiforme*, 7 кР). В том числе и комбинация Mo 638 x *L. hirsutum* var. *glabratum*, у которой во всех вариантах опыта коэффициент вариации высоты растения не превышает 10%. По всем вариантам опыта за 12 пассажей средний коэффициент вариации данного признака составил 32,4%. Наиболее стабильным признаком является количество листьев на побеге. Коэффициент вариации этого признака за весь период исследований не превышал 1,5 %.

Наивысшие коэффициенты вариации всех исследуемых признаков были характерны для комбинации Mo 638 x var. *pimpinellifolium*, что свидетельствует о чувствительности растений данной гибридной комбинации к условиям изолированной культуры. Самые низкие – для комбинации Mo 638 x *L. hirsutum* var. *glabratum*, что говорит о стабильности и однородности проявления признаков растений данной гибридной комбинации в условиях *in vitro*.

Культивирование *in vitro* способствовало постепенному увеличению коэффициентов вариации количественных признаков у всех исследованных гибридных комбинаций до 4-8 пассажей. Наивысшие показатели коэффициентов вариации признака высоты растения наблюдались в четвертом пассаже (рис. 4), длины корня и количества листьев – в восьмом (рис. 5, 6).

В последующих пассажах происходило резкое снижение и постепенная стабилизация пределов изменчивости всех исследуемых признаков, что, по нашему мнению, связано с заверше-

2. Влияние продолжительности культивирования *in vitro* на стабильность фенотипических признаков отдаленных гибридов томата F_1

Комбинация скрещивания	Доза γ -облучения	Аномальные растения, %				
		1 пассаж	4 пассаж	8 пассаж	12 пассаж	среднее
Мо 638 x var. <i>cerasiforme</i>	без обработки	0	20,0	35,7	20	18,9
	7 кР	0	33,3	42,8	16,7	23,2
	15 кР	0	25,0	44	18,2	21,8
Мо 638 x var. <i>pimpinellifolium</i>	без обработки	0	10,5	23,1	5,4	9,8
	7 кР	0	23,1	30,0	10,9	16,0
	15 кР	0	28,6	40,0	19,9	22,1
Мо 638 x <i>L. minutum</i>	без обработки	0	8,3	20	7,2	8,9
	7 кР	0	42,9	26,7	12,7	20,6
	15 кР	0	20,0	40,0	12,7	18,2
Мо 638 x <i>L. hirsutum</i> var. <i>glabratum</i>	без обработки	0	11,8	33,3	11,3	14,1
	7 кР	0	5,6	33,3	12,7	12,9
	15 кР	0	8,0	13,3	7,1	7,1
среднее		0	17,6	28,9	11,1	13,7

ем адаптации растительного материала к условиям культивирования.

Исключением является контрольный вариант гибрида с *L. hirsutum* var. *glabratum* – у него наблюдалось стабильное увеличение вариативности признаков с каждым пассажем.

С целью исследования воздействия длительности депонирования *in vitro* на изменчивость фенотипических признаков регенерантов, определено среднее количество аномально развитых растений (хлорозных, витрифицированных, с укороченными междоузлиями и высокой облиственностью), которые теоретически могли быть как проявлением индивидуальной реакции на условия культивирования, так и соматической изменчивости (табл. 2).

В первом пассаже все растения-регенеранты имели нормальный фенотип, отличия наблюдались только между гибридными комбинациями. В процессе культивирования наблюдалось постепенное увеличение количества аномальных регенерантов.

Наибольшее их количество выдвинулось в восьмом пассаже (28,9 % в среднем по всем образцам). Во время последующих субкультивирований (9-12-й пассаж) частота их появления начала постепенно снижаться.

Установлено, что у трех из исследованных гибридных комбинаций (Мо 638 x var. *pimpinellifolium*, Мо 638 x var. *pimpinellifolium*, Мо 638 x *L. minutum*) среднее количество аномальных растений, возникающих в процессе депонирования, возрастало с увеличением дозы облучения семян. В частности, у комбинации Мо 638 x var. *pimpinellifolium* в варианте без обработки зафиксировано до 10 % аномальных регенерантов от общего количества, в варианте с дозой 7 кР – 16%, а в варианте с дозой 15 кР – 22 %. У комбинации Мо 638 x *L. hirsutum* var. *glabratum* наблюдается обратная зависимость. В целом, максимальный процент аномальных растений за весь период культивирования был характерен для комбинации Мо 638 x var. *cerasiforme* (21,3 %), минимальный –



THE PARTICULARITIES OF PROLONGED CULTIVATION OF PLANTS-REGENERANTS OF TOMATO INTERSPECIFIC HYBRIDS

Miroshnichenko T.N.,
Ivchenko T.V., Samovol A.P.

Institute of Vegetables
and Melons of Ukraine
62478, Ukraine, Kharkiv region, St.
Institutskaja 1, village
Selectsionnoe, tel. (8057) 748-91-91
E-mail: ovoch.iob@gmail.com

Summary. The particularities of the changes of the morphological parameters of plants-regenerants of tomato hybrids F₁ during prolonged cultivation in conditions of *in vitro* have been studied. The cultivation during 12 passages in hormoneless MS medium does not lead to somaclonal variants, but act to raise the increasing of coefficient of variability of plants-regenerants features.

Keywords: tomato, distant hybridization, *in vitro* culture

для комбинации Мо 638 x *L. hirsutum* var. *glabratum* (11,4 %).

Повышение средних значений биометрических показателей пробирочных растений, стабилизация уровня их изменчивости и снижение частоты появления аномальных растений, которые наблюдались в 10-12 пассажах, по нашему мнению, связаны с завершением адаптации растений к условиям культивирования и элиминацией нежизнеспособных мутантов и соматолонов.

Следует отметить, что во всех экспериментах реакция гибридов культурного томата с *L. hirsutum* var. *glabratum* отличалась от поведения растений-регенерантов других комбинаций. Причиной этого могли быть, как было указано выше, более значительное филогенетическое расстояние между данной дикорослой формой и видом *L. esculentum* Mill., чем у других использованных видов и разновидностей, а также индивидуальная норма реакции каждой гибридной комбинации к γ -облучению.

В 2013 и 2014 годах адаптированные к нестерильным условиям гибридные растения высаживали в стеклянной теплице. Существенных различий при визуальной оценке фенотипа растений, которые выращивались из семян тради-

ционным рассадным способом, и растениями, культивированными *in vitro*, не выявлено. Исключение составляет несколько пониженная опушенность адаптированных растений комбинации Мо 638 x *L. hirsutum* var. *glabratum*. Это свидетельствует о стабильности гибридов томата поколения F₁ при длительном культивировании в условиях *in vitro*. В дальнейшем планируется изучение изменчивости количественных признаков данных гибридов в поколении F₂ и использование их в селекционно-генетических исследованиях.

Выводы

Методом клонального микроразмножения можно размножать ценные отдаленные гибриды на протяжении всего года. Это позволяет стабильно поддерживать коллекцию отдаленных гибридов томата с возникновением минимального количества аномальных растений продолжительное время. Депонирование в изолированной культуре на протяжении 12 пассажей на безгормональной среде MS не приводит к появлению растений с новыми признаками, однако способствует повышению вариабельности морфологических параметров пробирочных растений отдаленных гибридов томата F₁.

Литература

1. Банникова В.П. Межвидовая несовместимость у растений / В.П. Банникова – К.: Наук. Думка, 1986. – 232 с.
2. Бочарникова Н. И. Особенности формирования генетической изменчивости в роде *Lycopersicon Tourn.* и её значение для селекции / Н. И. Бочарникова / автореф. дис. д-ра с.-х. н. – М.: 2007. – 294 с.
3. Жук И.П., Кравченко Р.В. Регенерация *in vitro* соматолонов томата и отбор резистентных к вирусу табачной мозаики / И.П. Жук, Р.В. Кравченко // Доклады Российской академии с.-х. наук. – 2002. - № 5. – С. 18-20.
4. Куземенский А.В. Селекционно-генетические исследования мутантных форм томата. / А.В. Куземенский. – Харьков, 2004. – 392 с.
5. Лях В. А. Изменение состава и спектра расщепляющихся популяций при воздействии различными факторами на пыльцу межвидовых гибридов F₁ томатов / В. А. Лях / автореф. дис. канд. биол. н. – Кишинев: 1984. – 150 с.
6. Мірошніченко В.П. Методичні рекомендації з одержання і розмноження в культурі *in vitro* рослин міжвидових гібридів томата / В.П. Мірошніченко, Т.В. Івченко, О.П. Самовол – Мерефа: ІОБ УААН, 2010. – 11 с.
7. Мірошніченко В.П., Сергієнко О.Ф., Івченко Т.В. та ін. Методика досліджень в культурі ізолюваних тканин овочевих рослин. / В.П. Мірошніченко, О.Ф. Сергієнко, Т.В. Івченко [та ін.] – Мерефа: ІОБ УААН, 2004. – 25 с.
8. Навасардян Е. М. Особенности проявления несовместимости между *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* и типичными самосовместимыми видами томата / Е. М. Навасардян / автореф. дис. канд. биол. н. – Эчмиадзин: 1984. – 133 с.
9. Сиволап Ю.М. Геном растения и проблемы генной инженерии / Ю.М. Сиволап // С.-х. биология. – 1984. - № 5. – С. 99-107.
10. Скаукрофт У. Р. Соматоклональная изменчивость: миф о клональном единообразии // Мобильность генома растений. – М.: Агропромиздат, 1990. – С. 228 – 260.
11. Цэрэну Л. А., Ганя А. И. Коллекция рода *Lycopersicon (Tourn.)* Mill. и возможности ее использования в селекции томата / Л. А. Цэрэну., А. И. Ганя // Овочівництво і баштанництво, УААН. – 2005. - № 51. – с. 50-63.
12. Weaver M.L. Plant cell transformation for quality improvement in vegetable crops / M.L. Weaver // World biotech. report. – 1986. – 2, № 7. – Р. 23-29.