

ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ У СТВОРЕННІ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ ДЛЯ СЕЛЕКЦІЇ ОРГАНІЧНИХ СОРТІВ ТОМАТА

Висока різноманітність органічних систем виробництва сільськогосподарської продукції виникла через значні відмінності у ґрунтово-кліматичних умовах, системах сівозміни, використаних агротехнологічних прийомах. Всі ці різні системи об'єднує необхідність забезпечити прибутковість, яка реалізується шляхом створення оптимальних умов для реалізації потенційних можливостей генотипу для отримання високої урожайності і якості продукції. Важливим елементом будь-якої технології є сорт. Проведеними дослідженнями встановлено [1], що на теперішній час у світі районованими є лише декілька сортів, спеціально створених для енергоощадних і органічних систем землеробства. 95 % сортів сільськогосподарських культур, які використовуються у виробництві органічної продукції і були створені для інтенсивних технологій виробництва. І хоча значна частина ознак, насамперед таких як урожайність і стійкість до хвороб є однаково важливою для всіх технологій, але селекційні пріоритети при створенні сортів для виробництва овочевої продукції можуть бути різними. Це відбувається насамперед через той факт, що недоліки сортів створених для традиційних технологій виробництва можливо компенсувати за рахунок добрив, хімічних систем заходів хвороби із бур'янами, хворобами і шкідниками, застосування яких не є можливим за органічних систем. Тому необхідно проводити корекцію селекційних програм з напрямку подальшого застосування нових генотипів у різних технологіях.

Сорти придатні для виробництва органічної продукції повинні характеризуватись наступними ознаками: урожайністю, стійкістю до біотичних і абіотичних стресів, якістю свіжої і переробленої продукції, високими смаковими характеристиками. Деякі з вище наведених ознак не є обов'язковими, але їх наявність (наприклад, конкурентоздатність рослин з бур'янами) при їх використанні за органічних технологій спроможні значно підвищити комерційну привабливість таких сортів. Встановлено також, що окремі характеристики сортів, придатних для інтенсивних технологій вирощування можуть мати негатив-

ні побічні ефекти за вирощування в органічних системах. Так, наприклад, в останні десятиріччя підвищення врожайності більшості комерційних сортів і гібридів томата відбулося за рахунок використання мутантних генотипів – носіїв генів карликовості. Використання генотипів з такими ознаками призвело до зменшення габітусу рослин та розміру їх кореневої системи. Крім того, такі генотипи за рахунок підвищеного біосинтезу здатні краще засвоювати добрива і забезпечують високі показники врожайності за інтенсивних технологій їх вирощування. Але при використанні таких генотипів в органічних системах виробництва вони мають суттєві недоліки. Через невисоку розвиненість кореневої системи такі генотипи недостатньо добре конкурують з бур'янами і більше уражуються хворобами, потерпають від абіотичних стресів.

Враховуючи тривалість традиційного селекційного процесу, при створенні сортів, придатних для вирощування органічної продукції, необхідно спрямувати селекційні дослідження у напрямку гібридизації перспективних для даних технологій вирощування форм. Розширення генетичної різноманітності націлене головним чином на пошук прийомів, які дозволять створити генотипи з високими параметрами продуктивності, якості органічної продукції, особливо в контексті вирішення проблем пов'язаних з глобальними змінами клімату [2–3].

В останні п'ять років спостерігається високий відсоток (17–49 %) ураження рослин томату бактеріальними і вірусними хворобами у відкритому і захищеному ґрунті, що призводить до істотних втрат врожаю. В органічних системах втрати врожаю від цих захворювань можуть збільшитись у декілька разів, тому що використання фунгіцидів і антибіотиків (окрім препаратів що містять сірку або мідь) заборонено.

Найбільш складною проблемою в овочівництві томата у захищеному ґрунті є боротьба з ураженням рослин вірусом томатної мозаїки (ToMV), тому що цей вірус дуже стабільний і легко розповсюджується в умовах захищеного ґрунту. Показано, що загально прийняті прийоми

обробки насіння для інактивації вірусної інфекції не дали позитивного результату, тому що значна кількість вірусу томатної мозаїки локалізується у ендоспермі. Вирішення цієї складної проблеми можливо за рахунок залучення у селекційний процес генетичних джерел стійкості до цієї інфекції – генів стійкості.

Зростаючий дефіцит генетичного різноманіття і, як наслідок, зниження адаптивності сучасних сортів і гібридів, їх стійкості проти біотичних, абіотичних і антропогенних стресів призводить до необхідності більш активного включення в селекційний процес нових джерел зародкової плазми з більш вираженою генетичною дивергенцією – диких і напівкультурних видів. Так, *Solanum habrochaites* є носієм гена *Tm1*, який забезпечує стійкість до найбільш поширених штамів вірусу ToMV, альтернаріозу, септоріозу, вертицильозного в'янення, фузаріозу, кладоспоріозу.

Також останніми дослідженнями доведено наявність в генотипі *Solanum habrochaites* генів *Ph-2* та *Ph-3*, які обумовлюють стійкість до фітофторозу, збудником якого є *Phytophthora infestans*. Інший дикий вид томата *Solanum pimpinellifolium* містить гени стійкості до чорної бактеріальної плямистості, фузаріозного в'янення, кладоспоріозу, вірусу тобачної мозаїки. Дикі і напівкультурні види томату можуть бути джерелом стійкості до вірусної, бактеріальної і грибною інфекції. Вони є також джерелом цінних біохімічних ознак, так як вони характеризуються високим вмістом у плодах аскорбінової кислоти, розчинних цукрів, бета каротина, вітамінів. Такі ознаки є особливо цінними при створенні генотипів для виробництва органічної продукції, так як її споживачі хочуть отримувати поживну і корисну для здоров'я овочеву продукцію. Залучення до схрещувань зародкової плазми диких і напівдиких видів відкриває великі можливості для збільшення різноманіття вихідних селекційних форм овочевих культур з цінними ознаками. Механізми несумісності і прийоми її подолання при міжвидових схрещуваннях рослин є вже досить добре вивченими. Одним з ефективних методів подолання цих бар'єрів є застосування біотехнологічних методів вирощування незрілих зародків віддалених гібридних форм у культурі *in vitro*. Метою досліджень було оцінити перспективи застосування клітинних технологій *in vitro* для створення та розмноження вихідного матеріалу томата для селекції органічних сортів.

Матеріали і методи

Дослідження проводили протягом 2012–2014 рр. Роботи з ізолюваною культурою проводили згідно стандартизованих методик [5, 6]. В асептичну культуру було введено по 3–6 насінин 2 гібридних комбінацій: *Solanum lycopersicum* (Mo 638) x *Solanum pimpinellifolium*; *Solanum lycopersicum* (Mo 638) x *Solanum habrochaites*. Ці насінини були висаджені на безгормональне середовище Мурасиге-Скуга (MS).

В якості материнської форми у схрещуваннях використовували мутантну форму томата *Solanum lycopersicum* Mo 638, яка характеризується рядом маркерних фенотипічних ознак: детермінантний тип рослини, картопляний листок, відсутність антоціанового забарвлення (гени *sp*, *c*, *a*). Батьківські форми мали контрастні фенотипові ознаки: індетермінантний тип рослини, звичайну форму листка, антоціанове забарвлення стебла.

З метою підвищення рекомбіногенної здатності даного матеріалу насіння усіх гібридів піддавали попередній обробці г-променями в дозах 7 та 15 кР; контрольний варіант – без обробки.

Отримані в культурі *in vitro* проростки розмножували живцюванням на рідкому безгормональному середовищі MS за стандартних умов освітлення та температурного режиму. Тривалість пасажу 30 діб. Після 4-го та 12-го пасажу пробіркові рослини адаптували до нестерильних умов. Адаптовані горшкові рослини вирощувались в умовах скляної теплиці без опалення.

Результати та обговорення

Насіння гібридної комбінації *Solanum lycopersicum* Mo 638 x *Solanum pimpinellifolium* проросло в ізолюваній культурі на сьому добу. Неопромінене насіння гібрида *Solanum lycopersicum* Mo 638 x *Solanum habrochaites* проросло лише на п'ятнадцяту добу, опромінене в дозі 7 кР та 15 кР – на 74–79 добу. Це можна пояснити низькою життєздатністю гібридного насіння, зумовленою філогенетичною віддаленістю батьківських форм. Крім того, на нашу думку на схожість насіння вплинуло попереднє г-опромінення. Отримані проростки були цілком нормальними і за фенотипом були подібними до диких батьківських форм, що підтверджує гібридне походження даних рослин.

Попереднє опромінення донорського матеріалу, тривалість культивування, а також випадкові відмінності в умовах культивування (ступеня освітленості, температури) призвели до проявів фенотипових відмінностей у пробіркових

рослин. З метою визначення впливу ізолюваної культури на розвиток рослин-регенерантів була досліджена динаміка змін основних параметрів, таких як кількість листків, висота рослини, довжина кореня, а також коефіцієнтів їх варіації протягом 12 пасажів.

Обробка γ -випромінюванням призводила до істотного пригнічення росту пагонів і кореневої системи рослин-регенерантів гібридної комбінації *Solanum lycopersicum* Мо 638 х *Solanum habrochaites*. Найбільшу пригнічуючу дію протягом періоду культивування *in vitro* на розвиток рослин-регенерантів спричиняла обробка дозою 7 кР.

Результати досліджень показали, що кількісні показники пробіркових рослин поступово знижувались з кожним субкультивуванням до 4–8 пасажу включно. Зокрема, мінімальна висота рослини для обох досліджуваних гібридних комбінацій визначена у шостому – десятому пасажі (рис. 1), довжина кореня – у шостому (рис. 2), кількість листків – у десятому (рис. 3). Максимальні показники були характерні для другого пасажу. У 10–12-му пасажі спостерігалось поступове підвищення кількісних показників рослин-регенерантів. На нашу думку це пов'язано із завершенням адаптації рослин до умов культивування та відмиранням нежиттєздатних соматоклонів.

Різниця за варіантами обробки γ -променями знаходиться в межах похибки досліду. Проте, слід відмітити, що опромінення дозою 7 кР призводило до помітного пригнічення росту пагонів і кореневої системи рослин-регенерантів гібридної комбінації *Solanum lycopersicum* Мо 638 х *Solanum habrochaites*.

Досліджена мінливість кількісних параметрів рослин міжвидових гібридів томата F1 в ізолюваній культурі. Встановлено, що найбільш варіабельною ознакою в культурі *in vitro* у комбінації *Solanum lycopersicum* (Мо 638) х *Solanum pimpinellifolium* є висота пробіркових рослин значення. Середнє значення коефіцієнта варіації даного параметра рослин-регенерантів становить 28,0 %. У гібридної комбінації *Solanum lycopersicum* Мо 638 х *Solanum habrochaites* спостерігали протилежну реакцію – в усіх варіантах досліду коефіцієнт варіації довжини пагону пробіркових рослин не перевищує 10 %, тобто є низьким.

Найбільш стабільною ознакою є кількість листків на пагоні. Коефіцієнт варіації цієї озна-

ки за весь період досліджень у жодного зразка не перевищував 1,5 % (низький).

Культивування *in vitro* сприяло поступовому збільшенню коефіцієнтів варіації кількісних ознак у досліджених гібридних комбінацій до четвертого – восьмого пасажів. У наступних пасажах відбувалось різке зниження і стабілізація коефіцієнтів варіації всіх досліджуваних ознак, що, на нашу думку, також пов'язано із завершенням адаптації рослинного матеріалу до умов культивування. Винятком є контрольний варіант гібрида *Solanum lycopersicum* Мо 638 х *Solanum habrochaites* – у нього стабільне зростання варіабельності довжини кореня з кожним пасажем.

Визначена середня кількість аномально розвинутих рослин (хлорозних, вітрифікованих, з укороченими пагонами і підвищеною кількістю листків), які теоретично могли бути як проявом реакції на умови культивування, так і результатом соматоклональної мінливості. У першому пасажі всі рослини-регенеранти мали нормальний фенотип. Протягом подальшого культивування спостерігалось поступове збільшення кількості аномальних регенерантів досліджених зразків. Найбільша їх кількість виділилась у восьмому пасажі (28,8 % в середньому по всім зразкам). Під час наступних субкультивувань (9–12-й пасаж) частота їх появи почала поступово знижуватись.

Встановлено, що у гібридної комбінації *Solanum lycopersicum* (Мо 638) х *Solanum pimpinellifolium* середня кількість аномальних рослин, що виникала за період депонування, збільшувалась зі збільшенням дози опромінення насіння. У варіанті без обробки зафіксовано до 10 % аномальних регенерантів від загальної кількості висаджених, у варіанті з дозою 7 кР – 16 %, а у варіанті з дозою 15 кР – 22 %. У комбінації *Solanum lycopersicum* Мо 638 х *Solanum habrochaites* спостерігали що істотних відмінностей за варіантами не виявлено. Кількість аномальних рослин даної гібридної комбінації за весь період культивування становила 11,4 %.

Адаповані до нестерильних умов гібридні рослини після чотирьох та дванадцяти пасажів культивування відповідно висаджували у скляній теплиці. Істотної різниці за візуальною оцінкою фенотипічних ознак рослин, які вирощувались із насіння традиційним методом, і рослинами, культивованими *in vitro*, не виявлено. Виключення становить дещо знижена опушеність адаптованих рослин комбінації *Solanum lycopersicum* Мо 638 х *Solanum habrochaites*. Це свідчить про

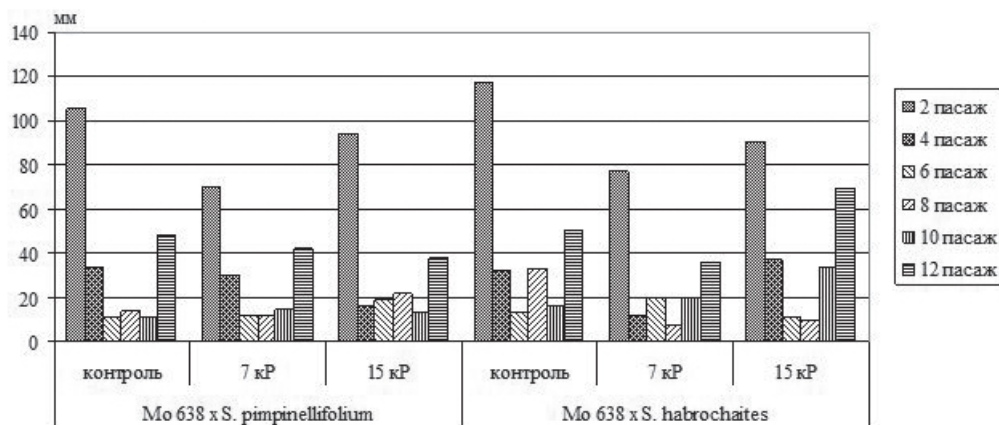


Рис. 1. Зміна середньої висоти рослин-регенерантів міжвидових гібридів томата F_1 за пасажами

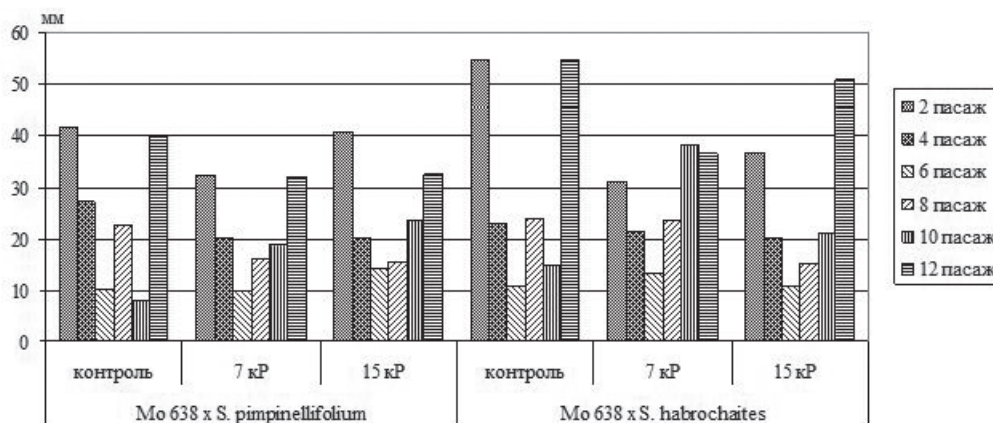


Рис. 2. Зміна середньої довжини кореня рослин-регенерантів міжвидових гібридів томата F_1 за пасажами

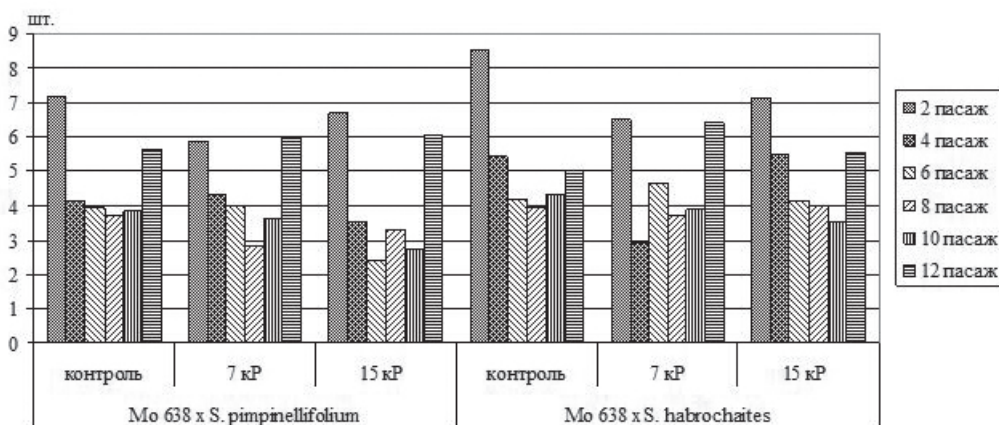


Рис. 3. Зміна середньої кількості листків рослин-регенерантів міжвидових гібридів томата F_1 за пасажами

стабільність гібридів томата F_1 при тривалому культивуванні в умовах *in vitro*.

Підвищення середніх значень біометричних показників пробіркових рослин та стабілізація

рівню їх варіабельності, що спостерігались у 10–12 пасажі пов'язані, на нашу думку, із завершенням адаптації рослин до умов культивування та елімінацією нежиттєздатних соматклонів.

Висновки

Доведено що використання клонального мікророзмноження дозволяє отримати віддалені гібриди томата із мінімальної кількості насіння впродовж року для їх застосування в селекції сортів для органічного виробництва овочів. За рахунок використання культури ізольованих клітин *in vitro* створюються умови для стабільного депонування колекції віддалених гібридів

томата з виникненням мінімальної кількості аномальних пробіркових рослин протягом тривалого часу. Виявлено що депонування в ізольованій культурі на безгормональному середовищі MS не призводить до появи рослин з новими ознаками, проте сприяє підвищенню варіабельності морфологічних параметрів пробіркових рослин віддалених гібридів томата F₁.

ЛІТЕРАТУРА

1. Lammerts van Bueren E., Jones S., Tamm L., Murphy K. The need to breed crop varieties suitable for organic farming, using wheat, tomato and broccoli as examples: A review // *NJAS – Wageningen Journal of Life Sciences*. – 2011. – 58. – P. 193–205.
2. Murphy K., Campbell K., Lyon S. Evidence of varietal adaptation to organic farming systems // *Field Crops Research*. – 2007. – 102. – P. 172–177.
3. Wolfe A., Baresel J., Desclaux D. Developments in breeding cereals for organic agriculture // *Euphytica*. – 2008. – 143. – P. 323–346.
4. Dordas C. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture // A review, *Agronomy for Sustainable Development*. – 2008. – 28. – P. 33–46.
5. Мірошніченко В.П., Івченко Т.В., Самовол О.П. Методичні рекомендації з одержання і розмноження в культурі *in vitro* рослин міжвидових гібридів томата. – Мерефа: ІОБ УААН, 2010. – 11 с.
6. Івченко Т.В., Віцєня Т.І., Баштан Н.О., Кондратенко С.І., Корнієнко С.І. Методичні рекомендації по застосуванню культури ізольованих тканин в селекції овочевих рослин. – Мерефа: ІОБ НААН, 2013. – 48 с.

IVCHENKO T., KORNIENKO S., GOROVA T., MIROSHNICHENKO T., GURIN M.

Institute of Vegetables and Melon Growing National Academy of Agricultural Science of Ukraine, Ukraine, 62478, Kharkov rg., v. Selektsiyne, Institutskaya str., 1, e-mail:tanivchenko@ukr.net

USING OF BIOTECHNOLOGICAL METHODS IN THE SOURCE MATERIAL CREATING FOR BREEDING OF ORGANIC VARIETIES OF TOMATO

Aims of the research were justification of need to create the initial source for breeding tomato varieties suitable for growing in organic and energy-saving technologies and assessment of the prospects of *in vitro* cell technologies using for the creation and reproduction of the source material for organic tomato varieties breeding. **Methods.** In studies were used methods of tissue culture - embryo culture and clonal micropropagation; statistical methods – to analyze the reliability of the results of research. **Results.** Expanding the genetic diversity is aimed mainly on using of interspecific hybrids *S. lycopersicum* (Mo 638) x *S. pimpinellifolium* and *S. lycopersicum* (Mo 638) x *S. habrochaites*, which are sources of genetic resistance to the most harmful viral, bacterial and fungal diseases in breeding work. It was found that the quantitative features of plants-regenerants gradually decreasing with each passage to the 8th one during the depositing *in vitro*. In particular, the minimum height of plants of both studied hybrids defined in the sixth – tenth passage, the length of the root – in the sixth one, the number of leaves – in the tenth one. The maximum indexes of plants were observed in the second passage. In the 10–12 th passages a gradual increase of plants-regenerants quantitative parameters was observed. It was probably associated with the completion of plants adaptation to the culture conditions and the demise of non-viable somaclones. The difference between the variants of interspecific hybrids seeds r-rays treatment is omissible. But it was observed that 7 Gr dose of seeds irradiation inhibited the shoots and root system growth of plants-regenerants of hybrid combination *S. lycopersicum* (Mo 638) x *S. habrochaites*. **Conclusions.** It was proved that the using of clonal micropropagation allows you to get interspecific tomato hybrids with the minimum number of seeds throughout the year for their use in breeding of varieties for organic vegetable production. By *in vitro* cell culture using the conditions for stable deposition of tomato interspecific hybrids collections with the emergence of a minimum number of abnormal plants-regenerants during a long time are created. It was found that the cultivation *in vitro* in hormoneless MS medium does not lead to the appearance of plants with novel features, but improves the variability of morphological parameters of interspecific tomato hybrid plants F₁.

Keywords: interspecific hybridization, cloning micropropagation, evaluation, organic technology.