

ЕКОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 635.64:581.1:576.3

В.К. Мусіяка¹, В.К. Яворська¹, І.П. Григорюк¹, Л.В. Желтоножська²,
В.М. Ковбасенко³

¹ Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

0322 Київ, вул. Васильківська, 31/17

² Національний аграрний університет

03041 Київ-41, вул. Героїв Оборони, 15

³ Київська дослідна станція Інституту овочівництва та баштанництва УААН

87520 Київська обл., Фастівський р-н, с. Борова

ОСОБЛИВОСТІ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ГІБРИДНОГО ТОМАТУ ВЕРЛЮКА

культури тканин, томати, корені, листя

Метод культури тканин і органів має велике значення для розширення можливостей процесів регенерації клітин і тканин, зокрема за організації раціональної системи виробництва гібридного насіннєвого матеріалу овочевих культур, особливо в селекції на гетерозис томагу [1–5]. Цим шляхом можна розмножувати генетично цінні рідкісні рослини, гетерозисні гібриди F_1 , а також малонасіннєві, стерильні та партенокарпічні генотипи [6, 7]. Бутенко [2] вважає, що в основі мікроклонального розмноження лежить автономність та тотипотентність кожної рослиної клітини. Інші автори [5, 10, 11] стверджують, що тотипотентність притаманна лише меристомоїдним клітинам. Останні містяться в центрах поділу клітин — апікальних та інтеркалярних меристемах, в клітинах зародку, камбію, у первинних калюсних структурах [5, 8, 10]. Саме з цих клітин, найлегше індукувати органогенез. Тому нами здійснена робота з відпрацювання методу одержання рослин гібридного томагу F_1 з первинних експлантів — справжніх листків та сім'ядолей.

Матеріал та методика досліджень

Об'єктом дослідження був гетерозисний гібрид томагу F_1 Верлюка, вирощування якого відбувається в плівкових неопалюваних весняно-літніх теплицях. Пророщували насіння на розведеному в два рази поживному середовищі Мурасіге і Скуга [9] з додаванням вітамінів за Уайтом [12], сахарози, але без регуляторів росту. Морфогенний калюс отримували на експлантах зі справжніх та сім'ядольних листків. Для укорінення пагонів рослин їх перекосили на ризогенне середовище, до складу якого входили макроелементи (концентрації розведені у два рази) та мікроелементи за Мурасіге і Скугом [9], вітаміни за Уайтом [12], 2% сахарози і 0.6% агару. Одержані рослини вирощували в теплиці.

Результати досліджень та їх обговорення

Вивчення стерилізуючих речовин (0,1% сулема, 25%-ний розчин комерційного препарату "Білізні", що містить активний хлор та суміші етилового спирту з перекисом водню у співвідношенні 1:1) показало, що всі зазначені стерилізуючі речовини можна використовувати для знезараження насіння томагу, проте найбільш доступним і найменш токсичним є розчин

“Білизни”. Останній забезпечує достатню стерилізацію насіння (90–95%) і майже не впливає на його схожість, у той час як розчин сулеми за 100%-ної стерильності значно (на 20–25%) погіршує цей показник. Після стерилізації насіння томату висаджували в колби на агаризоване середовище і переносили в термостат без освітлення, в якому витримували за температури $+24\pm 1^{\circ}\text{C}$ та 70%-ній вологості, після чого колби переносили в світлову термальну кімнату з фотоперіодом 16 год. Через 6–8 днів з насіння з’являлися проростки, з яких формувалися рослини, які в подальшому використовувалися як вихідний матеріал для вивчення калюсо- та морфогенезу в культурі тканин томату.

Дослідами встановлено, що найкращий морфогенний калюс дають експланти із справжніх та сім’ядольних листків (рис. 1).



Рис. 1. Калюсна культура томату Верліюка на 18–21-й день культивування

Для прискорення процесів регенерації рослин з первинних калюсів застосовували поживне середовище Мурасіге і Скуга з різним вмістом регуляторів росту (табл. 1).

Таблиця 1

Співвідношення регуляторів росту рослин при калюсогенезі гібридного томату F₁ Верліюка

Варіанти середовища	Регулятори росту рослин, мг/л			
	Кінетин	БАМ	ЮК	НОК
I	8,0	0	8,0	0
II	4,0	0	4,0	0
III	0	0,5	0	0,5
IV	0	0,5	0	2,5

Пробірки з висадженими на поживне середовище експлантами витримували в термостаті без освітлення за температури $+26^{\circ}\text{C}$ та вологості 70%. Через сім діб спостерігали за змінами, які відбуваються з експлантами. Слід зазначити, що майже всі вони втратили зелене забарвлення, частина деформувалась, а на деяких з’явився незначних розмірів калюс. На 14–18 добу облікували експланти, на яких утворився калюс. Виявилося, що сегменти листків і сім’ядолей утворили його на I і II варіантах середовища, у той час як на III і IV варіантах середовища експланти втратили зелене забарвлення і деформувалися. Незначне калюсоутворення відзначене на середовищі III варіанту, а на IV — калюс був повністю відсутній. Проте зазначимо, що у цих варіантах деформовані експланти були вкриті надто тонкими коренями.

Експериментально встановлено оптимальне співвідношення між кінетином і ЮК (8:8 і 4:4 мг/л відповідно), за якого з калюсної маси під час перенесення її в світлову термальну кімнату вже на 4–5 добу починають з’являтися рослини-регенеранти гібриду томату F₁ Верліюка. Цьому передувала поява зелених і фіолетових зон. Зелені ділянки в подальшому давали початок пагонам, а фіолетові — кореням (рис. 2). Через 2–3 тижні в усіх пробірках з’являються по кілька рослин-регенерантів (табл. 2, рис. 3), частина з яких мала добре розвинені стебла і кореневу систему, а деякі — лише стебло. Такі пагони переносили на

поживне середовище для укорінення, а згодом — для дорощування (рис. 4). Після адаптації такі рослини-регенеранти набували нормальної форми і висаджувалися в субстрат (рис. 5).



Рис. 2. Поява пагонів в морфогенному калусі при перенесенні в світлову термальну кімнату



Рис. 3. Рослини-регенеранти томату Верліока



Рис. 4. Рослини-регенеранти томату Верліока, перенесені на середовище для укорінення та дорощування



Рис. 5. Рослини-регенеранти томату Верліока перед висадкою в субстрат

Отже, за однакового співвідношення штокінінів та ауксинів у поживному середовищі калус, який утворювався на експлантах справжніх листків та сім'ядолей, під час перенесення в умови освітлення регенерував рослини без пересадки його на морфогенне середовище.

Досліди з отримання рослин-регенерантів гібридного томату F₁ Верліока здійснювали у два строки — у березні-квітні і в червні-липні. Калус на експлантах справжніх листків і сім'ядолей утворювався на I і II поживному середовищі (табл. 2), проте вихід рослин-регенерантів у літній період зменщувався у 8–33 рази порівняно з весняним. Пагони, на яких відбулось утворення корінців, переносили на ризогенне середовище, де їхню появу спостерідали на 3–4 день, а через два тижні рослини-регенеранти вже мали добре сформоване

стебло та розвинену кореневу систему. Одержані таким чином рослини висаджували в субстрат, адаптували їх до нестерильних умов, а після укорінення в керамічних посудинах переносили до теплиці.

Таблиця 2

Морфогенез у культурі калюсних тканин гібридного томату F₁ Верліюка

Варіанти дослідів	Характеристика калюсу з:			
	листка	сім'ядолі	листка	сім'ядолі
	4-5 доба		14-18 доба	
I	Калюс твердий, компактний, із зеленими ділянками	Калюс твердий, компактний, із зеленими ділянками	Калюс твердий, повністю зелений, мас по 6-8 рослин	Калюс твердий, повністю зелений, мас по 6-8 рослин
II	Калюс твердий, компактний, із зеленими ділянками	Калюс твердий, компактний, із зеленими ділянками	Калюс твердий, повністю зелений, мас по 6-7 рослин	Калюс твердий, повністю зелений, мас по 5-6 рослин

Примітка. *** з моменту перенесення в світлову термальну кімнату

Під час вегетації робились морфологічні та фітопатогенні обстеження і обліки біометричних та важливих господарських показників. Відмічено, що за господарсько-біологічними ознаками рослини-регенеранти гібриду томату Верліюка не відрізнялись від рослин, вирощених з насіння. Аналогічні результати спостерігались і на сортах томату Світанок, Факел, Боян і ін. Зазначимо також, що рослини-регенеранти, отримані з експлантів сім'ядольних листків, не відрізнялись від регенерантів, одержаних з експлантів справжніх листків. Це свідчить про те, що рослини-регенеранти томату можна одержувати як з меристем, так і з сім'ядольних та справжніх листків.

Висновки

У результаті здійснених експериментів запропонована технологія мікроклонального розмноження гетерозисного гібриду F₁ Верліюка, що дає можливість з однієї 14-18 денної рослини (використовуючи експланти лише сім'ядольних листків) отримати 20-30 повноцінних рослин-регенерантів томату.

ЛІТЕРАТУРА

1. Артамонов В.И. Биотехнология — агропромышленному комплексу. — М.: Наука, 1989. — 286 с.
2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. — М.: Наука, 1964. — 272 с.
3. Внучкова В.А. Разработка метода получения растений-регенерантов томата в условиях культуры ткани // Физиол. растений. — 1977. — Т. 21, № 5. — С. 1094-1100.
4. Внучкова В.А. Методические указания по культуре тканей томатов. — М.: ВАСХНИЛ, 1985. — 16 с.
5. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В. В. Технология микроклонального размножения растений. — Киев: Наук. думка, 1992. — 232 с.
6. Коппель Л.А., Бутенко Р.Г., Клональное микроразмножение мутантной линии томата с низким выходом семян // Докл. ВАСХНИЛ. — 1991. — № 10. — С. 9-12.
7. Кравченко В.А. Виробництво ранніх помідорів. — Київ: Урожай, 1992. — 208 с.
8. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды. — М.: Мир, 1989. — 411 с.
9. Murashige T., Skoog P. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. plant. — 1962. — Vol. 15, № 3. — P. 473-497.
10. Reinert J., Jeoman M.M. Plant cell and tissue culture. — Berlin-New York, 1982. — 83 p.
11. Torres K. Tissue culture techniques for herbicultural crops. — New York, 1989. — 285 p.
12. White Ph.R. Potentially unlimited growth of excised root tips in a liquid medium // Plant Physiol. — 1934. — Vol. 9. — P. 585-600.

V.K. Musiyaka, V.K. Yavorskaya, I.P. Grygoryuk, L.V. Zheltonozhskaya, V.M. Kovbasenko
**THE PECULIARITY OF MICROKLONAL REPRODUCTION OF TOMATO
 VERLIOKA'S HYBRID**

Conditions of tomato seed sterilization were recommended that guarantee almost complete absence of infection and do not suppress their germination power. Callus formation on explants of Verlioka heterosis hybrid F_1 and dependence of morphogenic processes in primary calli on plant growth regulators and season were investigated. Regenerated plants were obtained from primary calli (leaf and cotyledon explants) and their absolute identity to plants, obtained from seeds was experimentally confirmed.

Надійшло 10.11.2000

УДК 637.146.34

В.Г. Юкало, М.М. Дольна, Б.Л. Луговий

Тернопільський державний технічний університет імені Івана Пулюя
 46001 Тернопіль, вул. Руська, 56

**ДОСЛІДЖЕННЯ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ШТАМІВ
LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. *LACTIS* BIOVAR. *DIACETYLACTIONIS***

лактококи, протеоліз, казеїн

Сучасні дані про будову та властивості білків молока, зокрема α_s -, β - та κ -казеїнів дозволяють розглядати їх як попередників фізіологічно-активних пептидів, що утворюються у протеолітичних реакціях. Такі пептиди впливають на діяльність різних фізіологічних функцій організму [1, 4, 5]. Основну роль у ферментативному розщепленні молочних білків, а також формуванні властивого для них смаку і запаху в процесі виробництва кисломолочних продуктів відіграють молочнокислі бактерії, зокрема, ароматоутворюючі коки *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (далі *L. lactis* biovar. *diacetylactis*).

Метою цієї роботи був відбір протеолітично-активних штамів лактококів різновиду *L. lactis* biovar. *diacetylactis* та характеристика їх фізіологічних властивостей для використання відібраних штамів у вивченні процесу протеолізу молочних білків.

Матеріал і методика досліджень

Здійснювали дослідження 10-ти штамів *L. lactis* biovar. *diacetylactis*: Id1, Id2, Id3, Id4, Id5, Id6, Id7, Id8, Id9, Id10, які використовуються в молочній промисловості. Нарощення клітинної біомаси бактерій, дослідження їх кислотоутворюючої активності, стійкості до різних концентрацій хлориду натрію, антибіотиків, фагорезистентність та визначення протеолітичної активності лактококів робили як описано в [2].

Результати досліджень та їх обговорення

Розвиток бактеріофагів на клітинах молочнокислих бактерій призводить до лізису бактеріальних клітин, внаслідок чого закваска втрачає свою активність. Тому для заквасок потрібно підбирати фагорезистентні культури бактерій. Результати вивчення фагостійкості штамів *L. lactis* biovar. *diacetylactis* показують, що 7 досліджуваних штамів є чутливими до бактеріофагів (табл. 1), а штами Id1, Id4, Id7 є стійкими до всіх використаних фагів.

Присутність у молоці антибіотиків призводить до затримки чи повного пригнічення розвитку молочнокислих бактерій. Антибіотики потрапляють у молоко з крові тварин, які піддаються лікуванню (найчастіше від маститу), а також на час введення їх у корми. Тому в процесі виробництва кисломолочних продуктів у складі заквасок доцільно використовувати такі штами мікроорганізмів, які були б стійкими до залишкових концентрацій антибіотиків, що можуть міститися у збірному молоці.