

ПОДОЛАННЯ СТЕРИЛЬНОСТІ МІЖВИДОВИХ ГІБРИДІВ ТЮТЮНУ, СТІЙКИХ ДО ВІРУСУ БРОНЗОВОСТІ ТОМАТІВ

Щербатенко І.С., Гордєйчик О.І., Олещенко Л.Т.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
вул. академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

Досліджена можливість використання соматональної мінливості для подолання стерильності міжвидових гібридів тютюну, стійких до вірусу бронзовості томатів.

*Встановлено, що фертильні вірусостійкі гібриди можна отримати шляхом регенерації соматоклонів із листового калусу стерильних гібридів, гібридизації відібраних на стійкість соматоклонів сприйнятливих сортів зі стійкими дикими видами, схрещування частково фертильних соматоклонів міжвидових гібридів між собою та отримання рослин із стерильного насіння міжвидових гібридів на живильних середовищах *in vitro*.*

Ключові слова: *вірус бронзовості томатів, тютюн, вірусостійкість, соматональна мінливість, міжвидові гібриди, фертильність, стерильність, клітинна інженерія*

У селекції рослин на стійкість до фітопатогенних мікроорганізмів та вірусів широко використовується соматональна мінливість [1-9]. Вона спонтанно виникає в культурах рослинних клітин і призводить до змін каріотипу (плоїдності), хромосомних перебудов (делецій, інсерцій, інверсій, транслокацій), точкових ядерних і цитоплазматичних мутацій, епігенетичних ефектів (змін рівнів експресії генів), активації транспозонів, ампліфікацій нуклеотидних послідовностей тощо [10-16].

Широкий спектр мінливості соматоклонів [11, 12], очевидно, включає також і високу мінливість за ознаками міжвидової несумісності та стерильності гібридів. Зважаючи на це, нами досліджувалась можливість використання соматональної мінливості для подолання стерильності гібридів тютюну зі стійкими до вірусу бронзовості томатів (ВБТ) дикими видами *Nicotiana*.

Матеріали і методи. В досліджах використовували суворий штам вірусу бронзовості томатів (ВБТ), відібраний з полів Кримської дослідної станції тютюнництва; сприйнятливі до ВБТ сорти *N. tabacum*: Американ 3, Американ 3ж, Американ 5, Американ

5ж, Американ 19, Американ 307, Імунний 580, Крупнолистий БЗ та гібрид Американ 5 х Американ 19; стійкі до ВБТ дикі види тютюну – *N. alata*, *N. glauca* та *N. sanderae*, а також стерильні статеві гібриди сприйнятливих до ВБТ сортів тютюну зі стійкими видами *N. sanderae* та *N. glauca*: Американ 361 х *N. sanderae* (Асан), Курчавий 73 х *N. sanderae* (КС), Курчавий 140 х *N. glauca* (КГ) та Трапезонд 19 х *N. glauca* (ТГ). Насіння дослідних сортів та диких видів, а також стерильні рослини міжвидових гібридів тютюну отримані з Кримської дослідної станції тютюнництва.

Для подолання стерильності стійких до ВБТ міжвидових гібридів тютюну були випробовані такі клінічно-інженерні методи: регенерація сомаклонів з листових експлантатів стерильних гібридів; гібридизація стійких сомаклонів сприйнятливих сортів з дикими видами та сомаклонами міжвидових гібридів; схрещування частково фертильних сомаклонів міжвидових гібридів між собою та отримання рослин із стерильного насіння міжвидових гібридів.

Сомаклони регенерували з листового калусу [2]; гібридизацію рослин проводили шляхом запилення материнських квіток з видаленими пиляками [17]; насіння стерильних гібридів культивували на живильних середовищах MS42 та MSP[18]; стійкість рослин до ВБТ тестували методом послідовних інокуляцій [19].

Результати та їх обговорення. Спроби подолання стерильності гібридів Американ 361 х *N. sanderae* (Асан), Курчавий 73 х *N. sanderae* (КС), Курчавий 140 х *N. glauca* (КГ) та Трапезонд 19 х *N. glauca* (ТГ) шляхом регенерації сомаклонів з листових експлантатів показали, що ці гібриди суттєво відрізняються один від одного як за регенераційною здатністю, так і за кількісним виходом стійких і фертильних форм (табл. 1). Вихід первинних регенерантів (сомаклони SC₀) у гібридів тютюну з *N. sanderae* варіює від 3-х (Курчавий 73 х *N. sanderae*) до 141-го (Американ 361 х *N. sanderae*). Стабільнішу регенераційну здатність мають гібриди тютюну з *N. glauca*, кількість отриманих сомаклонів у яких складає від 14-ти (Трапезонд 19 х *N. glauca*) до 79-ти (Курчавий 140 х *N. glauca*).

За рахунок високої спонтанної мінливості в калусних культурах у популяціях сомаклонів стійких до ВБТ міжвидових гібридів з'являються відносно стійкі та сприйнятливі рослини. У гібридів тютюну з *N. sanderae* стійкі сомаклони складають 66,7-86,5%, а у гібридів з *N. glauca* – лише 7,1-35,4%.

Серед регенерованих сомаклонів часто зустрічаються карли-

кові рослини з потовщеними листками і стеблами, видозміненими або редукованими квітками та іншими морфологічними дефектами. Такі рослини не уражуються ВБТ, мабуть, через нездатність підтримувати репродукцію вірусу внаслідок порушення життєво важливих функцій.

Морфологічно нормальні соматкони гібридів Асан і КС мають лише часткову (чоловічу або жіночу) фертильність, однак значна кількість гібридних соматклонів КГ і ТГ (8,1-13,3%) проявляють здатність до самозапилення. Отже, в популяціях соматклонів, регенерованих з листкових експлантів стерильних міжвидових гібридів тютюну, зустрічаються стійкі до ВБТ самофертильні та частково фертильні рослини.

Таблиця 1. Стійкість до ВБТ та фертильність соматклонів тютюну, регенерованих з листкових експлантів стерильних міжвидових гібридів

Досліджувані гібриди*	Кількість соматклонів				
	отримано	сприйнятливих, %	відносно стійких, %	стійких, %	самофертильних, %
Асан	141	0	13,5	86,5	0
КС	3	0	33,3	66,7	0
ТГ	14	35,7	57,2	7,1	13,3
КГ	79	60,8	3,8	35,4	8,1

*Асан – Американ 361 x *N. sanderae*; КС – Курчавий 73 x *N. sanderae*; ТГ – Трапезонд 19 x *N. glauca*; КГ – Курчавий 140 x *N. glauca*

При гібридизації стійких соматклонів міжвидових гібридів з дикими видами, з соматклонами сприйнятливих сортів та між собою встановлено, що гібриди Асан x *N. sanderae*, КС x Асан та Асансан x КС, батьківські форми яких мають низьку фертильність і високий вихід стійких зразків, зберігають стійкість до вірусу, але майже повністю втрачають фертильність (табл. 2). В той же час гібриди ТГ x Асан, ТГ x Імунний 580 та Американ 361 x Асан, отримані шляхом схрещування високофертильних соматклонів зі стійкими соматклонами, втрачають стійкість, але зберігають фертильність.

Міжвидові гібриди, отримані в результаті запилення соматклонів тютюну пилом дикого виду *N. alata*, були або повністю стерильними (Крупнолистний БЗ), або дали поодинокі схожі насін-

нини (Американ 307, Американ 19 x Американ 5), з яких виросло лише п'ять рослин (табл. 3). Одна з них (Американ 19 x Американ 5) виявилась стійкою до ВБТ, але не дала потомства. При гібридизації соматклонів SC1 з *N. alata* один із гібридів був стерильним (Американ 5ж x *N. alata*), другий – фертильним (Американ 3 x *N. alata*). Отримане при цьому фертильне потомство втратило стійкість до ВБТ в третьому поколінні. Збільшення виходу високостійких зразків у послідовних поколіннях потомства виявлено у гібрида (Американ 3 x *N. alata*) F1 x *N. alata*, у якого всі три досліджені клони в третьому поколінні дали понад 70% стійких рослин.

Спроби отримати фертильні рослини із стерильного насіння міжвидових гібридів шляхом пророщування його на живильних середовищах *in vitro* показали (табл. 4), що окремі насіннини здатні давати проростки або калус. Проростки гібридів Курчавий 73 x *N. sanderae* та Американ 361 x *N. sanderae* виявились нежиттєздатними і швидко загинули, однак всі 4 проростки гібрида Курчавий 140 x *N. glauca* та 6 проростків Американ 3 x *N. alata* дали морфологічно нормальні рослини. Переважна більшість отриманих рослин (9 із 10) мали високу стійкість до ВБТ і 2 із 5-ти стійких зразків гібрида Американ 3 x *N. alata* виявились фертильними.

Таблиця 2. Стійкість до ВБТ та фертильність гібридів, отриманих при схрещуванні стійких соматклонів міжвидових гібридів тютюну

Схрещувані соматклони*	Кількість стійких рослин, %			Кількість самофертильних гібридів, %
	матері	батьки	гібриди	
Асан x <i>N. sanderae</i>	86,5	100,0	100,0	0,0
КС x Асан	66,7	86,5	97,1	2,9
Асансан F1 x КС	100,0	66,7	99,8	0,0
ТГ x Асан	7,1	86,5	13,7	58,8
ТГ x Імунний 580	7,1	6,2	3,2	32,3
Американ 361 x Асан	5,6	86,5	0,0	100,0

*Асан – Американ 361 x *N. sanderae*; ТГ – Трапезонд 19 x *N. glauca* Асансан – Асан x *N. sanderae*; КС – Курчавий 73 x *N. sanderae*

Таблиця 3. Стійкість до ВБТ гібридів тютюну, отриманих при схрещуванні стійких соматклонів з диким видом *N. alata*

Соматклони, гібридизовані з <i>Nicotiana alata</i>	Покоління гібридів	Досліджено		Виявлено стійких рослин, %
		рослин, шт.	клонів, шт.	
Крупнолистий БЗ	F ₁	0	0	0
Американ 307	F ₁	1	1	0
(Американ 19 х Американ 5)	F ₁	4	1	0,25
	F ₂	0	0	0
Американ 5ж SC ₁	F ₁	0	0	0
Американ 3 SC ₁	F ₁	189	1	4,2
	F ₂	349	7	0,0 – 0,25
	F ₃	169	6	0
(Американ 3 х <i>N. alata</i>) F ₁	F ₁	4	1	50,0
	F ₂	43	1	48,8
	F ₃	118	3	73,7-83,5

Таблиця 4. Результати отримання рослин із стерильного насіння стійких до ВБТ міжвидових гібридів тютюну шляхом прощування на живильних середовищах *in vitro*

Гібриди	Живильні середовища	Вихід на 100 насінин		Отримано рослин		
		проростків	калусу	всього	стійких	стійких і фертильних
Курчавий 73 х <i>N. sanderae</i>	MS42	1	0	0	0	0
Американ 361 х <i>N. sanderae</i>	MSP	2	0	0	0	0
Трапезонд 19 х <i>N. glauca</i>	MS42	0	0	0	0	0
Курчавий 140 х <i>N. glauca</i>	MSP	4	0	4	4	0
(Американ 3 х <i>N. alata</i>) х <i>N. alata</i>	MS42	0	1	0	0	0
Американ 3 х <i>N. alata</i>	MSP	6	1	6	5	2

Велика різниця між випробованими живильними середовищами за кількісним виходом стійких і фертильних форм дає під-

ставу вважати, що добір придатного живильного середовища може забезпечити високу ефективність подолання стерильності насіння міжвидових гібридів. На це вказує велика залежність властивостей рослин-регенерантів від компонентів живильного середовища [20].

Таким чином, результати досліджень показали, що для отримання фертильних форм стійких до ВБТ міжвидових гібридів тютюну можна використовувати такі методи: регенерацію соматклонів з листового калусу стерильних гібридів; міжвидову гібридизацію відібраних на стійкість соматклонів сприйнятливих сортів зі стійкими дикими видами; схрещування частково фертильних соматклонів міжвидових гібридів між собою та отримання рослин із стерильного насіння міжвидових гібридів на живильних середовищах *in vitro*.

Подібні способи подолання стерильності міжвидових гібридів були використані в селекції рослин на стійкість до інших вірусів. Так, фертильні соматклони міжвидових гібридів пшениці, стійкі до вірусу жовтої мозаїки ячменю, були регеновані з пилкового калусу стерильних рослин [5]. Стерильність міжвидових гібридів картоплі, стійких до М- та Y-вірусів картоплі, вдалось подолати шляхом подвоєння хромосом гібрида *S. eutuberosum* x *S. pinatiseptum*, схрещування його з *S. acaule* і рятуння зародків отриманих гібридів [21]. Культура недозрілих зародків була використана для регенерації рослин, стійких до кореневої гнилі сходів пшениці [22].

1. Жук И.П. Селекция устойчивых к вирусу табачной мозаики соматических клонов томатов // Докл. Россельхозакадемии. – 1994. – № 5. – С. 5-6.

2. Щербатенко И.С., Коваленко А.Г., Олещенко Л.Т. и др. Получение соматических клонов табака, устойчивых к вирусу бронзовости томатов // Биол. науки. – 1989. – № 6. – С. 24-27.

3. Cassels A.C., Walsh M. Screening for *Sclerotinia* resistance in *Helianthus tuberosus* L. (Jerusalem artichoke) varieties, lines and somaclones, in the field and in vitro // Plant Pathol. – 1995. – Vol. 44. – P. 428-437.

4. Cerato C., Manici L.M., Borgatti S. et al. Resistance to late blight (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) of potato plants regenerated from in vitro selected calli // Potato Res. – 1993. – Vol. 36.

– P. 341-352.

5. Comeau A., Plourde A. Cell, tissue culture and intergeneric hybridization for barley yellow dwarf virus resistance in wheat // *Can. J. Plant Pathol.* – 1987. – Vol. 9. – P. 188-192.

6. Liu JP, Zheng CM. Application of in vitro selection and somaclonal variation in improvement of disease resistance // *Yi Chuan.* – 2002. – Vol. 24 (5). – P. 617-630.

7. Lotfi M, Alan AR, Henning MJ, Jahn MM, Earle ED. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L) for use in breeding for multiple virus resistance // *Plant Cell Rep.* – 2003. – Vol. 21(11). – P. 1121-1128.

8. Van den Bulk R.F. Application of cell and tissue culture and in vitro selection for disease resistance breeding – a review // *Euphytica.* – 1991. – Vol. 65. – P. 269-285.

9. Wenzel G., Foroughi-Wehr B. Progeny tests of barley, wheat, and potato regenerated from cell cultures after in vitro selection for disease resistance // *Theor. Appl. Genet.* – 1990. – Vol. 80. – P. 359-365.

10. Гостимский С.А. Генетическая изменчивость клеток растений при культивировании // *Успехи соврем. генетики.* – 1987. – № 14. – С. 48-63.

11. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 1. Изменчивость в онтогенезе // *Биополимеры и клетка.* – 1994. – Т. 10, № 6. – С. 5-35.

12. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. – К.: Наукова думка, 1990. – 280 с.

13. Hao YJ, Wen XP, Deng XX. Genetic and epigenetic evaluations of citrus calluses recovered from slow-growth culture. // *J. Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 161(4). – P. 479-484.

14. Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 43 (2-3). – P. 179-88.

15. Kubis SE, Castilho AM, Vershinin AV, Heslop-Harrison JS. Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation // *Plant Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 52 (1). – P. 69-79.

16. Svirshchevskaya A, Dolezel J. Karyological characterization of sugar beet gynogenetic lines cultured in vitro // *J. Appl. Genet.* – 2001. – Vol. 42 (1). – P. 21-32.

17. Коваленко А.Г., Рудь Е.А., Стреляева Н.И. и др. Реакция сортов, диких видов и межвидовых гибридов табака на искусственное заражение вирусом бронзовости томатов // Микробиол. журн. – 1987. – Т. 49, № 1. – С. 85-89.

18. Щербатенко И.С., Олещенко Л.Т., Олевинская З.М. Проявление сверхчувствительности и приобретенной устойчивости к ВТМ у растений-регенерантов табака // Микробиол. журн. – 1991. – Т. 53, № 3. – С. 69-75.

19. Коваленко А.Г., Щербатенко И.С., Олещенко Л.Т. и др. Получение фертильных соматклонов межвидовых гибридов табака, обладающих высокой устойчивостью к вирусу бронзовости томатов // Цитология и генетика. – 1989. – Т. 24, № 4. – С. 59-65.

20. Rakoczy-Trojanowska M. The effects of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits // Cell Mol. Biol. Lett. – 2002. – Vol. 7 (4). – P. 1111-1120.

21. Chavez R., Brown C.R., Iwanaga M. Transfer of resistance to PLRV titer buildup from *Solanum tuberosum* to a tuber-bearing *Solanum* gene pool // Theor. Appl. Genet. – 1988. – Vol. 76. – P. 129-135.

22. Yu Y.J., Liao P.G., Pu Z., Yu F.Q. Genetic analysis of resistance to scab of regenerated plants (R2) from wheat immature embryo culture // Acta Genet. Sin. – 1990. – Vol. 17. – P. 461-468.

ПРЕОДОЛЕНИЕ СТЕРИЛЬНОСТИ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ТАБАКА, УСТОЙЧИВЫХ К ВИРУСУ БРОНЗОВОСТИ ТОМАТОВ

Щербатенко И.С., Гордейчик О.И. , Олещенко Л.Т.

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, г. Киев

Исследована возможность использования соматклональной изменчивости для преодоления стерильности межвидовых гибридов табака, устойчивых к вирусу бронзовости томатов. Установлено, что фертильные вирусоустойчивые гибриды можно получить путем регенерации соматклонов из листового каллуса стерильных гибридов, гибридизации отобранных на устойчивость соматклонов восприимчивых сортов с устойчивыми дикими видами, скрещивания частично фертильных соматклонов межвидовых гибридов между собой и получения растений из стерильных семян межвидовых гибридов на питательных средах in vitro.

Ключевые слова: вирус бронзовости томатов, табак, вирусоустойчивость, соматклональная изменчивость, межвидовые гибриды, фертильность, стерильность, клеточная инженерия

STERILITY OVERCOMING IN INTERSPECIFIC TOBACCO HYBRIDS RESISTANT TO TOMATO SPOTTED WILT VIRUS

Shcherbatenko I.S. , Gordejchuk O.I. , Oleshchenko L.T.

Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

It was investigated a possibility of use somaclonal variation for overcoming of sterility in tomato spotted wilt virus-resistant interspecific tobacco hybrids. It was established that fertile virus-resistant hybrids can be produced by regeneration of somaclones from leaf-derived callus of sterile hybrids; by hybridization of selected virus-resistant somaclones of susceptible tobacco varieties with resistant wild species; by intercrossing between semifertile somaclones of interspecific hybrids; as well as by producing of plants from nongerminable seed on nutrient media in vitro.

Key words: tomato spotted wilt virus, tobacco, virus-resistance, somaclonal variation, interspecific hybrids, fertility, sterility, cell engineering