

Hristova, P. K. (2017). In vitro regeneration of tomato cultivars. *Rastenievadni nauki (Bulgarian Journal of Crop Science)*, 54(1), 51–55 (Bg).

***In vitro* регенерация на сортове домати**

Петя К. Христова

Агробιοинститут, София

e-mail: petyachristova@abi.bg

Резюме

Потенциалът за *in vitro* регенерация на 3 сорта домати при използване на два вида среди за култивиране (Rm и Rtaz) е обект на изследването. Два от избраните сортове са чери тип (Балконски Ацтек и Идул балконски червен), а третият е индетерминантен сорт (Биволско сърце). Резултатите показват регенерационна способност, варираща от 21% до 57%, в зависимост от сорта и използваната среда. Най-висок потенциал за регенерация и на двете среди е отчетен при сорт Биволско сърце (50% на Rm и 57% на Rtaz). Най-ниска е регенерационната способност на сорт Идул балконски червен (21% на Rm и 25% на Rtaz). Влиянието на използваната среда върху регенерационния потенциал е най-значимо при сорт Балконски Ацтек (45% на Rm и 25% на Rtaz).

Ключови думи: домати; *Solanum lycopersicum*; регенерация; *in vitro* култивиране

***In vitro* regeneration of tomato cultivars**

Petya K. Christova

AgroBioInstitute, Sofia

e-mail: petyachristova@abi.bg

Abstract

The potential for *in vitro* regeneration of three tomato cultivars using two types of culture media (Rm and Rtaz) was investigated. Two of selected tomato cultivars are cherry type (Aztec and Idul), whereas one of them is indeterminate variety (Buffalo heart). Results showed that the regeneration efficiency varied from 21% to 57%, depending on the cultivar and type of medium. The variety Buffalo heart demonstrated highest potential for regeneration on both cultivation media (50% on Rm and 57% on Rtaz). The lowest regeneration efficiency was counted for variety Idul (21% on Rm and 25% on Rtaz). The impact of the media used on regeneration potential is most significant for the variety Aztec (45% on Rm and 25% on Rtaz).

Keywords: tomato; *Solanum lycopersicum*; regeneration; *in vitro* cultivation

Доматът (*Solanum lycopersicum* L.) е вторият по значимост зеленчук в световен мащаб, който отбелязва непрекъснато нарастващо годишно производство. За периода 2000-2013 г. то се е увеличило с 49% (HORTI^{biz} Newsletter, 2016). Добивът от домати възлиза на 130 млн. t, от които 88 млн. t за свежа консумация и 42 млн. t за преработвателната промишленост.

В Европейския съюз доматиите заемат 19% от общото зеленчукопроизводство, което обуславя водещата им позиция сред тези култури. В страните от ЕС през 2014 г. са произведени 16,6 млн. t домати, което представлява 12% от световното производство. Добивът от домати в България за последните 3 години (2014-2016) е около 120 хил. t годишно, по данни на МЗХ (2015a, 2015b, 2016).

През последните години се наблюдава нарастващ интерес на учените към домата, не само поради стопанските му качества, но и като моделен обект за изследвания. За това до голяма степен допринася и секвенирането на неговия геном през 2012 г. (Tomato Genome Consortium, 2012). Доматът е отлична моделна система, както за фундаментални, така и за приложни изследователски програми. Той притежава редица важни характеристики, като възможност за отглеждане при различни условия на култивиране, относително кратък жизнен цикъл, образуване на семена, но и възможност за вегетативно размножаване, сравнително малък геном (950 Mb).

Прилагането на биотехнологични подходи разширява възможностите за провеждане на фундаментални и научно-приложни изследвания при домати (Bhatia et al., 2004; Rashid and Bal, 2010; Sherkar and Chavan, 2014; Gerszberg et al., 2015). Ефективността на тези методи до голяма степен зависи от регенерационната способност на различните сортове в условия *in vitro* (Bhatia and Ashwath, 2008; Chaudry et al., 2010; Cruz-Mendivil et al., 2011; Gudeva and Dedejski, 2012; Wayase and Shitole, 2014). От съществено значение за *in vitro* регенерацията при домата е видът на използваните експлантите и възрастта на растенията, от които те са получени (Kantor et al. 2010; Ali et al. 2012; Bahurupe et al., 2013). При органогенеза на домати като експлантите се използват хипокотили, котиледони, стъбла, меристеми, антери и протопласти (Chaudry et al., 2010; Rashid and Bal, 2010; Namitha and Negi, 2013). Другият фактор, оказващ влияние върху регенерационния потенциал на растенията, е видът на средата, използваните растежни регулатори, както и съотношението между тях (Plana et al., 2006; Ishag et al., 2009; Kantor et al. 2010; Namitha and Negi, 2013; Wayase and Shitole, 2014).

Целта на настоящото изследване е да се оцени регенерационния потенциал на три сорта домати чрез използването на два вида среди за култивиране при *in vitro* условия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследванията са проведени с три сорта домати - Балконски Ацтек, Идул балконски чер-

вен и Биволско сърце. Първите два сорта домати са тип чери, съответно с жълти и червени плодове, подходящи за отглеждане в саксии и сандъчета на балкона или на малки градински площи. Третият сорт е индетерминантен, с големи розови плодове. И трите сорта се отличават с отлични вкусови качества.

Семената от трите сорта домати са повърхностно обеззаразени чрез последователно третиране със 70% етилов алкохол (1 min), белина (разредена с вода 1:1, 15 min), последвано от трикратно промиване със стерилна вода. След подсушаване върху филтърна хартия, семената са заложени на среда MS (Murashige and Skoog, 1962) за получаване на *in vitro* растения.

В експеримента са използвани два вида експлантите – котиледони и хипокотили, които са получени от 10-дневни *in vitro* растения. За регенерация са заложени по 56 експлантите от сортовете Идул балконски червен и Биволско сърце, и 40 експлантите от сорт Балконски Ацтек.

Използвани са следните две среди за регенерация:

Rm - MS основна с добавени витамини B5 (3,2 g/l; Gamborg et al., 1968), мио-инозитол (50 mg/l), захароза (2%), зеатин (2 mg/l), агар (0,8%); pH 5,5-5,8.

Rtaz - MS основна с добавени витамини B5 (3,2 g/l), MES (500 mg/l), PVP (55 mg/l), глюкоза (2%), зеатин (2 mg/l), агар (0,8%); pH 5,8.

Получените регенеранти са вкоренени на MS среда. При достигане на височина 3-4 cm вкоренените растения са прехвърлени в почва. За поддържане на оптимална влажност е използван прозрачен капак, който след около седмица е отстранен. Адаптирането на растенията в почва е осъществено при контролируеми условия при температура 22°C и фотопериод 16/8 часа.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Регенерационният потенциал на трите сорта домати (Балконски Ацтек, Идул балконски червен и Биволско сърце) е проучен при използването на два вида среди за регенерация в условия *in vitro*. Като експлантите са използвани хипокотили и котиледони от 10-дневни *in vitro* растения, които са заложени на среди *Rm* и *Rtaz*. Първите признаци на калусообразуване са наблюдавани

7-10 дни след поставяне на експлантите на средите за регенерация (Фиг. 1), като процесът е ясно изразен при хипокотилите.

Според изследванията на редица автори подходящи за регенерация на домати са експлантите, получени от растения на възраст между 7 и 14 дни (Ishag et al., 2009; Kantor et al. 2010; Ali et al. 2012). Някои изследвания показват, че най-висок регенерационен потенциал имат хипокотилите (Chaudry et al., 2010), докато други автори доказват, че по-ефективен е процесът на органогенеза при котиледоните (Harish et al., 2010).

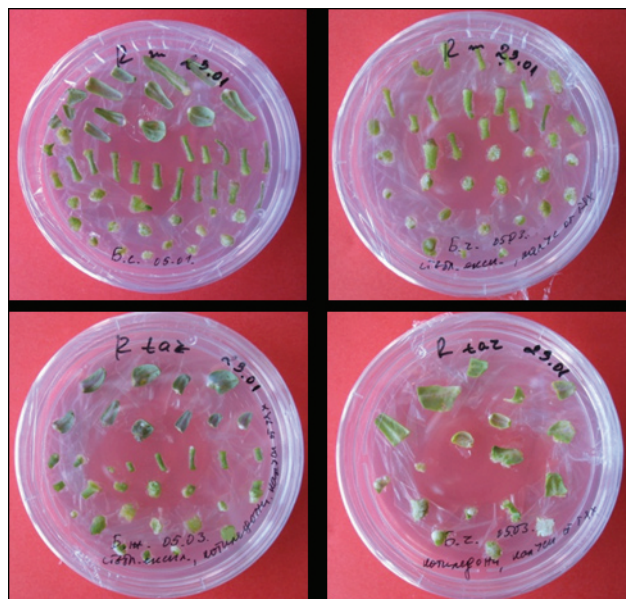
Появата на първите регенеранти е отчетена при сорт Балконски Ацтек след две седмици култивиране на среда Rm. В края на първия месец е отчетена регенерация от хипокотили от трите сорта на двете среди за *in vitro* култивиране, като най-добре диференцирани са регенерантите от сорт Биволско сърце (Фиг. 2). Установено е, че регенерационната способност на котиледоните е значително по-ниска за трите сорта на двата вида среди.

Първите добре оформени регенеранти са прехвърлени на среда MS за вкореняване 8 сед-

мици след началото на експеримента. Коренообразуването се наблюдава за 8-10 дни (Фиг. 3а). Доказано е, че доматиът съдържа високо ниво на ендогенни ауксини (Mensuali-Sodi et al., 1995), което способства вкореняването на растенията без добавяне на екзогенни хормони.

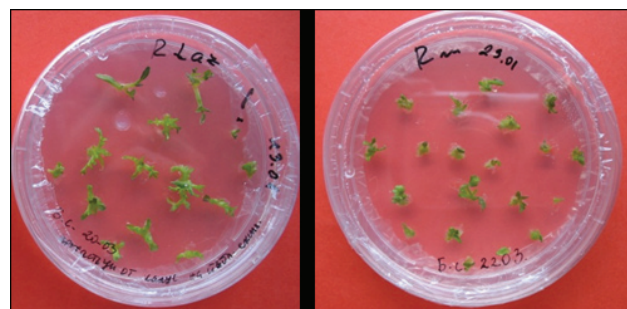
Адаптирането на растенията се осъществява в почвена смес при контролирани условия (Фиг. 3b). Целият процес от поставянето на експлантите на среда за регенерация до адаптирането на почва е с продължителност 3 месеца.

Регенерационната способност на изследваните сортове домати варира от 21% до 57% (Фиг. 4). Най-висок процент на регенерация е отчетен при сорт Биволско сърце, като ефективността при двете използвани среди е сходна, съответно 50% на Rm и 57% на Rtaz. Това показва, че



Фигура 1. Начало на калусообразуване при котиледони и хипокотили от сортове домати Биволско сърце (a), Балконски Ацтек (b) и Идул балконски червен (c, d) на среди Rm и Rtaz

Figure 1. Callus formation of cotyledons and hypocotyls of tomato cultivars Buffalo heart (a), Aztec (b) and Idul (c, d) on Rm and Rtaz media



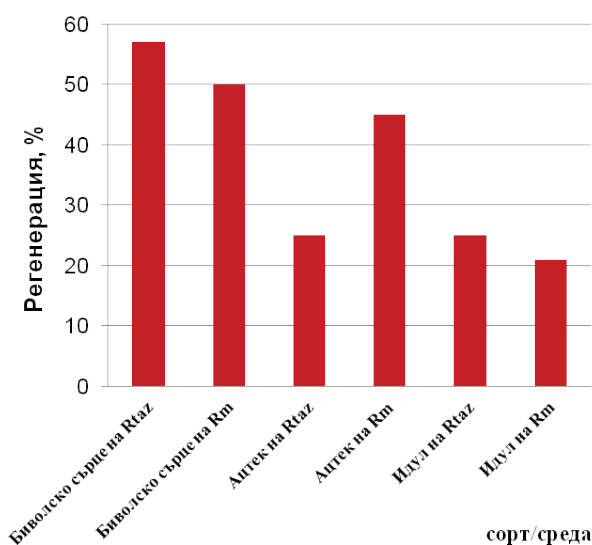
Фигура 2. *In vitro* регенерация на сорт Биволско сърце на среди Rtaz (a) и Rm (b)

Figure 2. *In vitro* regeneration of cultivar Buffalo heart on Rtaz (a) and Rm (b) media



Фигура 3. Вкореняване на среда MS (a) и адаптиране на почва (b) на домати от сорт Биволско сърце

Figure 3. Rooting on MS medium (a) and acclimatization on soil (b) of tomato cultivar Buffalo heart



Фигура 4. Регенерационен потенциал на сортове домати Биволско сърце, Балконски Ацтек и Идул балконски червен на среди Rtaz и Rm

Figure 4. Regeneration efficiency of tomato cultivars Buffalo heart, Aztec and Idul on Rtaz and Rm media

независимо от използваната среда, включените в нея витамини и съотношението на хормоните, сорт Биволско сърце има по-висок регенерационен потенциал в сравнение с другите два изследвани сорта. При сорт Балконски Ацтек се наблюдава значителна разлика в регенерацията на двете използвани среди, като тя е 45% на Rm и 25% на Rtaz. Тези резултати демонстрират, че при някои генотипове използваната хранителна среда е от съществено значение за ефективността на регенерацията. Най-нисък регенерационен потенциал показва сорт Идул балконски червен, респективно 21% на среда Rm и 25% на среда Rtaz. За този сорт е необходимо допълнително оптимизиране на условията за *in vitro* регенерация, свързано с промяна на използваните витамини и растежни регулатори.

Регенерационната способност на растенията варира в зависимост от потенциала на изследвания сорт, използваните среди за култивиране, вида и възрастта на експлантите, както и условията на отглеждане. При домата са разработени различни системи и среди за регенерация от редица автори (Plana et al., 2006; Abu-El-Heba et al., 2008; Bhatia and Ashwath, 2008; Afroz et al., 2010; Chaudry et al., 2010; Ashakiran et al., 2011;

Cruz-Mendivil et al., 2011; Ajenifujah-Solebo et al., 2012; Gudeva and Dedejski, 2012; Zhang et al., 2012). Проучването на регенерацията и органогенеза на чери домати *L. esculentum* var. *cerasiforme* (Dunal) чрез използване на хипокотили, 1/3 сегменти от котиледони и апикални пъпки показва, че последните имат най-висок потенциал (Gudeva and Dedejski, 2012). Бърза и ефективна система за регенерация е разработена при сорт CastleRock, чрез използване на хипокотили и част от котиледоните като експлантите, след отстраняване на първичната меристема (Abu-El-Heba et al., 2008). Този метод води до регенерация от порядъка на 40-92% при използване на различни среди за *in vitro* култивиране. Листни експлантите от сорт Micro-Tom, който е тип чери и се използва като моделна система за домати, показват регенерация варираща от 28% до 69% (Cruz-Mendivil et al., 2011). Тези данни са сходни с получените от нас за трите изследвани сорта. Резултатите от проучването показват, че условията за *in vitro* регенерация са оптимизирани за сорт Биволско сърце, както и за сорт Балконски Ацтек на среда Rm.

ИЗВОДИ

Доматите, като икономически значима култура в световен мащаб, са обект на широк спектър от земеделски програми. В селекционните практики често се налага използването на методи за бързо размножаване или за поддържане на ценни генотипове. Настоящото изследване показва, че анализираният сорт Балконски Ацтек, Идул балконски червен и Биволско сърце имат регенерационна способност, варираща от 21% до 57%, в зависимост от използваната среда. Това дава възможност и обуславя техния потенциал за включването им в изследователски и селекционни програми, изискващи *in vitro* култивиране.

ЛИТЕРАТУРА

- МЗХ (2015а). Ситуационно-перспективен анализ на плодове и зеленчуци.
 МЗХ (2015б). Оперативен анализ за основни земеделски култури, Бюлетин № 8/2015
 МЗХ (2016). Оперативен анализ за основни земеделски култури, Бюлетин № 46/2016.

- Abu-El-Heba, G. A., Hussein, G. M., & Abdalla, N. A.** (2008). A rapid and efficient tomato regeneration and transformation system. *Landbauforschung volkenrode/ Agriculture and Forestry Research*, 58(1/2), 103-110.
- Ajenifujah-Solebo, S. O. A., Isu, N. A., Olorode, O., Ingelbrecht, I., & Abiade, O. O.** (2012). Tissue culture regeneration of three Nigerian cultivars of tomato. *African Journal of Plant Science*, 6(14), 370-375.
- Afroz, A., Chaudhry, Z., Rashid, U., Khan, M. R., & Ali, G. M.** (2010). Enhanced regeneration in explants of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) with the treatment of coconut water. *African Journal of Biotechnology*, 9(24), 3634-3644.
- Ali, A., Yossef, T., & El-Banna, A.** (2012). Cytokinin-cytokinin interaction ameliorates the callus induction and plant regeneration of tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.). *Acta Agronomica Hungarica*, 60(1), 47-55.
- Ashakiran, K., Sivankalyani, V., Jayanthi, M., Govindasamy, V., & Girija, S.** (2011). Genotype specific shoots regeneration from different explants of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) using TDZ. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 1(2), 107-113.
- Bahurupe, J. V., Patil, S. C., Pawar, B. D., Chimote, V. P., & Kale, A. A.** (2013). Callus induction and plantlet regeneration in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Cell and Tissue Research*, 13(2), 3765-3768.
- Bhatia, P., & Ashwath, N.** (2008). Improving the quality of in vitro culture shoots of tomato. *Biotechnology*, 7(2), 188-193.
- Bhatia, P., Ashwath, N., Senaratna, T., & Midmore, D.** (2004). Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78(1), 1-21.
- Chaudry, A., Abbas, S., Yasmin, A., Rashid, H., Ahmed, H. & Anjum, M. A.** (2010). Tissue culture studies in tomato (*Lycopersicon esculentum*) var. moneymaker. *Pak J Bot*, 42(1), 155-163.
- Cruz-Mendivil, A., Rivera-López, J., Germán-Báez, L. J., López-Meyer, M., Hernández-Verdugo, S., López-Valenzuela, J. A., Reyes-Moreno, C. & Valdez-Ortiz, A.** (2011). A simple and efficient protocol for plant regeneration and genetic transformation of tomato cv. Micro-Tom from leaf explants. *HortScience*, 46(12), 1655-1660.
- Gamborg, O. L., Miller, R., & Ojima, K.** (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research*, 50(1), 151-158.
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K.** (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(3), 881-902.
- Gudeva, L. K., & Dedejski, G.** (2012). In vivo and in vitro production of some genotypes of cherry tomato *Solanum lycopersicum* var. Cerasiforme (DUNAL). *International Journal of Farming and Allied Science*, 1(4), 91-96.
- Harish, M. C., Rajeevkumar, S., & Sathishkumar, R.** (2010). Efficient in vitro callus induction and regeneration of different tomato cultivars of India. *Asian Journal of Biotechnology*, 2(3), 178-184.
- HORTI^{biz} Newsletter** (2016). <http://www.hortibiz.com/item/news/tomato-production-facts-around-the-world/>
- Ishag, S., Osman, M. G., & Khalafalla, M. M.** (2009). Effects of growth regulators and genotype on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv Omdurman). *Int J Sustain Crop Prod*, 6, 7-13.
- Kantor, M. I. H. A. I. L., Sestras, R., & Chowdhury, K.** (2010). Identification of the most organogenic-responsive variety of tomato using the variety X medium interaction. *Rom Biotechnol Lett*, 5, 5640-5645.
- Mensuali-Sodi, A., Panizza, M., & Tognoni, F.** (1995). Endogenous ethylene requirement for adventitious root induction and growth in tomato cotyledons and lavender microcuttings in vitro. *Plant Growth Regulation*, 17(3), 205-212.
- Murashige, T., & Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Namitha, K. K., & Negi, P. S.** (2013). Morphogenetic Potential of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) cv. Arka Ahuti to Plant Growth Regulators. *Notulae Scientia Biologicae*, 5(2), 220-225.
- Plana, D., Fuentes, A., Alvarez, M., Lara, R. M., Alvarez, F., & Pujol, M.** (2006). A new approach for in vitro regeneration of tomato plants devoid of exogenous plant growth hormones. *Biotechnology Journal*, 1(10), 1153-1157.
- Rashid, R., & Bal, S. S.** (2010). Effect of hormones on direct shoot regeneration in hypocotyl explants of tomato. *Notulae Scientia Biologicae*, 2(1), 70-73.
- Sherkar, H. D., & Chavan, A. M.** (2014). Studies on callus induction and shoot regeneration in tomato. *Sci Res Rep*, 1, 89-93.
- Wayase, U. R., & Shitole, M. G.** (2014). Effect of plant growth regulators on organogenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Dhanashri. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 20(2), 65-71.
- Zhang, W., Hou, L., Zhao, H., & Li, M.** (2012). Factors affecting regeneration of tomato cotyledons. *Bioscience Methods*, 3(4), 27-33.
- Tomato Genome Consortium** (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635-641.