

УДК 631.147:582.951.4

Г.К. Магзумова, А.Б. Ералинов, А.А. Какимжанова*
РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, г. Астана, Казахстан
*e-mail: kakimzhanova@biocenter.kz

Подбор условий криоконсервации для генотипов картофеля

Использованы следующие методы при работе: введение в культуру *in vitro* образцов картофеля, тестирование меристемных линий образцов картофеля на вирусную инфекцию, микроклональное размножение меристемных линий, криоконсервация образцов картофеля для создания банка генов.

Из введенных в культуру *in vitro* 32 образцов картофеля создана коллекция из 694 пробирочных растений, которая размножается и систематически культивируется на питательную среду МС. Оптимизированы условия криосохранения образцов картофеля: по выбору растительного материала – апикальные меристемы, черенки пробирочных растений; по выбору криопротектора – 10% ДМСО, 20% глицерин; по выбору замораживания – быстрое и медленное замораживание.

Ключевые слова: картофель, *in vitro*, криоконсервация, криопротекторы, замораживание.

Г.К. Магзумова, А.Б. Ералинов, А.А. Какимжанова

Картоп генотиптері үшін криоконсервация жағдайларын таңдау

Жұмысты орындау барысында келесі әдістер қолданылды: картоп үлгілерін *in vitro* культураны енгізу, вирус жұқпасына картоп линиялар үлгілерінің меристемасын тестілеу, меристемді линияларды микрокалемшелеп көбейту, гендер банкі жасау үшін картоп үлгілерін криосақтау.

Қазіргі таңда *in vitro* культураны енгізілген 32 картоп үлгілерінен меристемді линиялардың 694 пробиркалық өсімдіктерден топтама жасалды. Олар МС коректік ортасында жүйелі түрде өсіріледі және көбейтіледі. Картоп үлгілерінің криосақтау жағдайлары оңтайландырылды: өсімдік материалын таңдау бойынша – апикалды меристема, пробиркалық өсімдіктің калемшесі; криопротектерді таңдау бойынша - 10% ДМСО, 20% глицерин; мұздату бойынша – жылдам және асықпай мұздату.

Түйін сөздер: картоп, *in vitro*, криосақтау, криоконсервілеу, криопротекторлар, мұздату.

G.K. Magzumova, A.B. Eralinov, A.A. Kakimzhanova

Conditions for trial cryopreservation potato genotypes

The following methods are used at work : an introduction to culture *in vitro* potato samples, testing samples of potato meristem lines to viral infection, micropropagation meristem lines, cryopreservation of potato samples to create a gene bank.

From the introduction to the culture *in vitro* 32 potato samples created a collection of 694 test-tube plants, which multiplies and systematically cultivated on MS medium. The conditions of cryopreservation potato samples: the choice of plant material - apical meristem cuttings test-tube plants; cryoprotectant choice - 10 % DMSO, 20 % glycerol, optionally freeze - fast and slow freezing.

Keywords: potato, *in vitro*, cryopreservation, cryoprotectants, freezing.

Важным вкладом в селекцию растений стала технология сохранения генофонда в культуре *in vitro*, которая позволила частично решить проблему сохранения коллекций сортов и видов, исключить влияние неблагоприятных факторов, которые имеют место при выращивании картофеля в полевых условиях.

Генофонд генетических ресурсов растений является национальным достоянием Казахстана. В связи с этим, его изучению, сохранению, обогащению и рациональному использованию уделяется огромное внимание, так как это способствует развитию

агропромышленного комплекса и росту благосостояния народа. Генетические ресурсы служат основой для создания новых и улучшения существующих сортов растений. Ценным источником обогащения генетического биоразнообразия являются стародавние и новые сорта отечественной и зарубежной селекции [1]. Однако ареалы дикорастущих видов неуклонно сокращаются, из-за чего возникает угроза их исчезновения, а интродукция новых сортов зарубежной селекции в виде вегетирующих растений ограничивается длительностью и сложностью

прохождения карантинного контроля, а также дороговизной импортируемого посадочного материала. Проблемы эти могут решаться путём создания банков гермоплазмы картофеля в условиях криосохранения, которая позволит обеспечить длительную сохранность растительного материала.

В настоящее время хранение культивируемых *in vitro* тканей растений при температуре жидкого азота (-196°C) рассматривается как самый надежный способ долговременного сохранения генетических ресурсов. Криогенное хранение позволяет снизить до минимума потерю ценных образцов и сократить материальные затраты на поддержание коллекций [2].

Одним из главных преимуществ, хранения при очень низких температурах заключается в способности значительно замедлять или даже останавливать метаболические процессы и биологическое разрушение в клетках живых организмов. В этом случае растительный материал остается генетически стабильным, что не приводит к генетическим изменениям. Растительные клетки в основном большого размера, вакуолизированы, большим количеством воды и чрезвычайно широкой пластичностью их метаболизма. Выживание клеток после размораживания не превышает 60-70%. В связи с этим лучше использовать для криоконсервации меристематические клетки [3].

Для замораживания среди всех известных криопротекторов используются легко проникающие в клетки вещества, как диметилсульфоксид (ДМСО, 5-10%), глицерин (10-20%), а также непроницающие высокомолекулярные-поливинилпирролидон (ПВП), декстран, полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 6000.

Таким образом, биотехнологические методы позволяют получать оздоровленный материал картофеля свободный от вирусной и грибной инфекций; осуществлять быстрое размножение ценного экземпляра растения; получать в больших количествах пробирочные растения; работать в лабораторных условиях круглый год и планировать выпуск растений к определенному сроку; длительно хранить пробирочные растения и создавать «банк» ценных форм [4].

Материалы и методы

В качестве объектов исследований для сохранения в культуре *in vitro* и криоконсервации использовали 26 сортов и 6 форм картофеля из генофонда, которые были любезно представлены селекционерами КазНИИКО и сотрудниками НЦБ.

В качестве криопротектора использовали вещества диметилсульфоксид (ДМСО) - 10%, глицерин - 20% которые снижают действие физико-химических факторов при криоконсервации.

Введение растительного материала картофеля *in vitro* проводили в стерильных условиях ламинар-боксе по описанной методике Калашниковой Е.А. и т.д. [5]. Для получения апикальных меристем проращивали сорта и формы картофеля в термостате при температуре 37°C и 70% относительной влажности воздуха. Вычленение верхушечных апикальных меристем проводили в стерильных условиях. Перед вычленением меристемные ростки стерилизовали в стерилизующих растворах: «Твин 20» (Tween 20, вязкая жидкость, монолаурат полиоксиэтиленсорбитан) и раствор коммерческого хлорсодержащего реагента - «Белизна» (активный хлор 2,8%, гидроксид натрия 2,0%), разбавленных дистиллированной водой в концентрации - 20%; 70%; 100% в течение 7 или 10 минут. Затем ростки промывали три раза стерильной дистиллированной водой и переносили на питательную среду МС для получения меристемных линий. Культивировали апикальные меристемы в фактестатной комнате с 16-часовым световым режимом, освещенностью - 5-6 тыс. люкс, температурой 22-25°C, влажностью 70%. Через 50-60 дней из выделенных апикальных меристем вырастали пробирочные растения.

Для криоконсервации использовали простерилизованные апикальные меристемы размером 3-5 мм выделенных из глазков клубней и пробирочные растения сортов и форм картофеля. Апикальные меристемы и черенки меристемных линий помещали в эппендорвские пробирки для криоконсервации и за 2 часа до замораживания вносили криопротекторы ДМСО в концентрации 10% и глицерин - 20%. Использовали медленное и быстрое

замораживание клеток апикальных меристем. При медленном замораживании апикальных меристем проводили постепенное понижение температуры от +20 до -28°C на спиртовой бане. При быстром замораживании апикальные меристемы в эпиндоровских пробирках сразу погружали в жидкий азот. Далее эпиндоровские пробирки с апикальными меристемами перенесли в жидкий азот на хранение.

Результаты и их обсуждение

В настоящее время из введенных в культуру *in vitro* 32 образцов картофеля создана коллекция меристемных линий из 694 пробирочных растений, которые размножаются и систематически культивируются на питательную среду МС с 40 г/л сахарозы и 0,5 мг/л ИУК. Пробирочные растения выращиваются в фактеростатной комнате с 16-часовым световым режимом, освещенностью - 5-6 тыс. люкс, температурой 22-25°C, влажностью 70%. Созданная коллекция в культуре *in vitro* используется для размножения и криоконсервации.

Созданные протоколы криоконсервации не могут гарантировать сохранение всех генотипов. Одним из важных моментов при криоконсервации является регенерация растений после размораживания. В связи с этим, проводили оптимизацию этапов криоконсервации отобранных образцов картофеля.

В результате исследований замораживали сразу в жидком азоте апикальные меристемы и черенки пробирочных растений картофеля при использовании два вида криопротектора - 10% ДМСО и 20% глицерин (таблица 1).

При использовании криопротектора 10% ДМСО заморожено 145 апикальных меристем при размороже выжило 52 (36%), при использовании 20% глицерина заморожено 161 апикальных меристем из них выжило 67 (42%).

Также замораживали 302 черенков пробирочных растений размером 2-3 см при использовании 10% ДМСО и 20% глицерина, показано, что на 10% ДМСО только 20% черенков сохранили жизнеспособность, на 20% глицерине выживших черенков составило - 26,5%.

Таким образом, для криоконсервации лучше использовать апикальные меристемы образцов картофеля размером 2-3 мм, меристемные клетки очень мелкие, невакуолизированные и легче переносят глубокое замораживание и оттаивание. Процент выживших апикальных меристем составило на 10% ДМСО - 36%, на 20% глицерине - 42%. В дальнейшем из выживших апикальных меристем можно получить путем микрочеренкования необходимое количество пробирочных растений.

Таблица 1 – Подбор растительного материала и криопротектора для криоконсервации (быстрое замораживание)

Генотип	Апикальные меристемы (3-5 мм), шт				Черенки растений (2-3 см), шт			
	10% ДМСО		20% глицерин		10% ДМСО		20% глицерин	
	Заморозка	Разморозка	Заморозка	Разморозка	Заморозка	Разморозка	Заморозка	Разморозка
Астаналык	9	3	9	4	4	0	7	2
Айтмурат	9	3	7	3	9	2	7	2
Артемис	7	3	8	3	8	2	8	3
Аладин	6	2	8	4	7	2	9	3
Альянс	5	2	8	4	5	0	9	3
Алая заря	8	3	6	3	7	2	8	2
Баянды	7	3	7	4	8	1	6	2
Валентина	8	4	9	4	6	1	6	2
Дуняша	9	3	5	2	9	2	5	0
Дидар	8	2	9	4	8	2	7	2
Жанайсан	4	1	7	2	6	0	7	0
Кайнар	7	2	7	3	6	0	6	1
Карасайский	5	2	7	3	7	1	6	2

Продолжение таблицы 1

Кокчетавский ранний	9	3	6	3	8	2	7	3
Костанайские новости	6	2	8	4	9	1	7	3
Казахстанский	7	2	9	4	8	3	9	2
Мошняковский	4	2	8	4	9	3	6	1
Мирас	5	2	8	4	9	2	7	0
Памяти Кунаева	6	3	7	3	8	3	8	2
Розара	8	3	9	3	8	2	9	3
Ушконыр	8	2	9	4	8	2	9	2
Итого	145	52 -36%	161	67-42%	151	30-20%	151	40- 26,5%

В настоящее время для криоконсервации апикальных меристем картофеля применяем два вида замораживания: медленное (от +20° до -35°С, скорость 0,5°С в минуту) и быстрое (сразу в жидкий азот).

При использовании 2-х видов криопротекторов - 10% ДМСО и 20% глицерина при быстром замораживании заморожено 305 апикальных меристем, при медленном замораживании - 302. Апикальные меристемы в эппендорвских пробирках в количестве 607 штук хранятся в жидком азоте в сосуде Дьюра.

Также размороженные апикальные меристемы 21 образцов картофеля в количестве 189 пробирок культивируются в освещенной фактеростатной комнате при 25°С и влажностью воздуха 70%.

Оптимизированы условия криосохранения образцов картофеля: по выбору растительного материала - апикальные меристемы, черенки

пробирочных растений; по выбору криопротектора - 10% ДМСО, 20% глицерин; по выбору замораживания - быстрое и медленное замораживание. Таким образом, для криоконсервации лучше использовать апикальные меристемы образцов картофеля размером 2-3 мм, меристемные клетки очень мелкие, невакуолизированные и легче переносят глубокое замораживание и оттаивание.

При использовании 2-х видов криопротекторов - 10% ДМСО и 20% глицерина (быстрое замораживание) апикальные меристемы в эппендорвских пробирках в количестве 607 штук хранятся в жидком азоте в сосуде Дьюра. Также размороженные апикальные меристемы 21 образцов картофеля в количестве 189 пробирок культивируются в освещенной фактеростатной комнате при 25°С и влажностью воздуха 70%.

Литература

- 1 Красавин В.Ф. Изучение генетических ресурсов картофеля коллекции ВИР в условиях юго-востока Казахстана и их использование в селекции: тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. - Москва, 2007. - Т.163. - С.29-41.
- 2 Соловьева А. И. Оценка вариабельности ДНК-маркеров в каллусной ткани пшеницы (*Triticum aestivum* L.) после криосохранения // Автореф. ... канд. биол. наук: 03.01.05. - Москва, 2011. - 25 с.
- 3 <http://worldofscience.ru/biogija/6498-kriokonservatsiikletokrastenij>. Криоконсервация клеток растений. - 2013.
- 4 Вечернина Н.А. Сохранение биологического разнообразия редких, исчезающих видов, уникальных форм и сортов растений методами биотехнологии // Автореф. ... докт. биол. наук. – Барнаул, 2006. - 42 с.
- 5 Калашникова Е.А., Кочиева Е.З., Миронова О.Ю. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. - Москва, 2006. - 144 с.