

УДК 631.147:582.951.4

## ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КРИОСОХРАНЕНИЯ ОБРАЗЦОВ КАРТОФЕЛЯ

Г.К. Магзумова, А.Н. Хусанбаева, А.Ж. Измаганбетова, А.А. Какимжанова

РГП «Национальный центр биотехнологии», г. Астана, РК  
kakimzhanova@biocenter.kz

Технологии *in vitro* для поддержания коллекций растений используются в генбанках весьма широко. Привлечение методов биотехнологии, базирующихся на культивировании изолированных органов, тканей и клеток растений для решения проблем сохранения биологического разнообразия имеет преимущества перед традиционно используемыми подходами.

Сформирована коллекция из 32 сортов и 6 форм картофеля, полученных из генофонда КазНИИКО в качестве клубневого материала для создания генбанка в культуре *in vitro* и в условиях криосохранения. Одним из важных этапов введения в культуру *in vitro* апикальных меристем является стерилизация. Для этого были подобраны режимы стерилизации и стерилизующие агенты для регенерации апикальных меристем. Введены в культуру *in vitro* апикальные меристемы 46 образцов картофеля для создания коллекции пробирочных растений и криоконсервации. Оптимизирован состав питательной среды для размножения меристемных линий образцов картофеля. Создана коллекция меристемных линий образцов картофеля в культуре *in vitro* из 694 пробирочных растений, которая размножается и систематически культивируется на свежие питательные среды. В настоящее время активно проводится работа по оптимизации условий криосохранения и создания банка генов в условиях жидкого азота.

**Ключевые слова:** картофель, *in vitro*, апикальные меристемы растений, питательные среды, криоконсервация, криопротекторы, замораживание.

---

### ВВЕДЕНИЕ

Картофель является важной культурой после пшеницы для Республики Казахстан. Для эффективного ведения сельского хозяйства, выведения новых сортов и улучшения старых требуется разнообразный генетический материал. Генетические ресурсы картофеля Казахстана представляют собой научную и практическую ценность и включают биоразнообразие дикорастущих видов и их уникальных форм, а также районированные сорта отечественной и зарубежной селекции, стародавние сорта народной селекции и уникальный гибридный материал [1].

В настоящее время в крупных генбанках мира, таких как Международный центр картофелеводства (International Potato Center, CIP), Лейбницкий Институт генетики растений и исследований сельскохозяйственных культур (Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, IPK), Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И.Вавилова (ВИР), Научно-практический центр по картофелеводству и плодоовощеводству Национальной академии наук Беларуси (НПЦ КП НАНБ) хранят картофель при использовании трех систем хранения – естественные условия (полевые коллекции), в условиях *in vitro*, сверхнизкие температуры (криоколлекции). Методы сохранения генофонда в полевых, *in vitro* и криоколлекциях взаимно дополняют друг друга, и только их совместное применение может обеспечить надежное долгосрочное хранение генетического разнообразия картофеля. Ни одна из видов сохранения (криоконсервация, культура тканей, полевые культуры) не могут быть полностью безопасными, так как растительные материалы могут быть потеряны всегда, независимо от сохранения техники. Таким образом, генбанки мира используют три вида сохранения картофеля – криоконсервация, культура тканей, полевые культуры.

В последнее время исследователи ряда стран изучают возможность использования для сохранения генофонда различных видов растений принципиально новый способ, основанный на глубоком замораживании и последующем хранении при сверхнизких температурах клеточных культур и меристематических верхушек побегов [2-6]. Криоконсервация – наиболее подходящий долгосрочный способ хранения генетических ресурсов вегетативно размножаемого картофеля. Наиболее перспективным и эффективным подходом к решению проблемы сохранения гермоплазмы *in vitro* вегетативно размножаемых растений является криоконсервация в жидком азоте (-196°C) изолированных органов, тканей и клеток растений [3, 7].

Одно из 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. Исследования проводятся по изучению влияния различных факторов, влияющих на криоконсервацию, такие как физиологическое состояние растений и доноров побегов, а также конкретные криогенные факторы – тип криопротектора, скорости охлаждения и согревания [3-6].

Созданные протоколы криоконсервации не могут гарантировать сохранение всех генотипов. Критическая точка в картофеле при криоконсервации является регенерация растений после размораживания. Слабо реагирующие генотипы на криоконсервацию необходимо поддерживать с использованием культуры *in vitro* [8].

Криоконсервация растений состоит из следующих этапов: подготовка растительного материала, добавление криопротектора, замораживание в определенном режиме, хранение в жидком азоте, размораживание, удаление криопротекторов (отмывка), регенерация целых растений. На начальном этапе особое значение имеет подготовка клеток. Для этого нужно подобрать криопротектор – вещество, ослабляющее повреждение клеток от осмотического стресса, от механических повреждений при образовании и росте кристаллов льда. Помимо эффективности действия, криопротекторы не должны быть токсичными. Наиболее часто используют проникающие в клетки вещества – диметилсульфоксид (ДМСО, 5-10%), глицерин (10-20%), а также непроникающие высокомолекулярные вещества – криопротекторы – поливинилпирролидон (ПВП), декстран, полиэтиленгликоль (ПЭГ-6000) [9].

При хранении в жидком азоте деление клеток и метаболические процессы останавливаются, и растительный материал может сохраняться неограниченный период времени. Хранимый материал не занимает много места, не изменяется генетически и не заражается патогенами.

Одним из часто используемых хранений генетического материала является культура тканей. Технология *in vitro* для поддержания коллекций растений используется в генбанках весьма широко. Привлечение методов биотехнологии, базирующихся на культивировании изолированных органов, тканей и клеток растений для решения проблем сохранения биологического разнообразия имеет преимущества перед традиционно используемыми подходами. Методы биотехнологии позволяют получать оздоровленный материал от вирусной и грибной инфекции, свободный от нематод, осуществлять быстрое размножение ценного экземпляра растения, получать в больших количествах вегетативное потомство трудно размножаемых в обычных условиях видов и форм растений, работать в лабораторных условиях круглый год и планировать выпуск растений к определенному сроку, размножать растения без вывода их из ювенильной фазы, длительно хранить пробирочные растения и создавать «банк» ценных форм.

В республике генофонд картофеля отечественной и зарубежной селекции представлен преимущественно полевыми коллекциями и сосредоточен в Казахском научно-исследовательском институте картофельного и овощного хозяйства (КазНИИКО). Для выведения новых перспективных сортов картофеля селекционеры Казахстана имеют в своем распоряжении большое разнообразие исходного материала – лучшие отечественные и зарубежные сорта, гибридные формы, дикие и примитивные культурные виды [10]. Поддержание больших коллекций, которые выращивают в поле, не только трудоемкий процесс, но и не очень надежный, так как не исключаются потери образцов коллекции вследствие неблагоприятных условий среды, болезней, вредителей, нарушения агротехники и других факторов. Такие потери не только обедняют коллекцию исходного материала, но и сводят на нет многолетний труд селекционеров, вложенный входящий в нее сорт или перспективный гибрид.

В Казахстане до сих пор не существует генбанка картофеля, хранящегося в лабораторных условиях. Исследования по сохранению гермоплазмы генофонда картофеля в условиях *in vitro* и криоконсервации проводятся впервые. Разработка комплексной технологии – полевые условия (клубни), условия *in vitro* (пробирочные растения), условия криоконсервации (изолированные меристематические ткани) и создание генбанка генофонда картофеля при использовании биотехнологических методов является актуальной. Созданную коллекцию картофеля в культуре *in vitro* и условиях криосохранения, оздоровленную от вирусной и грибной инфекции, можно использовать для массового ускоренного размножения оздоровленного пробирочного материала в системе элитного семеноводства, а также для безопасного его переноса при интродукции, обмене, рассылке в процессе карантинных мер испытания и досмотра, и для поддержания и длительного хранения образцов и коллекций в национальных генбанках и научно-исследовательских центрах.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В качестве объектов исследований для сохранения в культуре *in vitro* и криоконсервации использовали 32 сорта и 6 форм картофеля из генофонда, которые были любезно предоставлены селекционерами КазНИИКО и сотрудниками НЦБ.

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

Для оздоровления растительного материала от вирусных и грибных болезней проводили термотерапию чистых клубней картофеля. Клубни картофеля помещали в термостат и повышали температуру от 25° до 37°С путем ежедневного увеличения температуры на 2°С.

Введение растительного материала картофеля *in vitro* проводили в стерильных условиях ламинар-боксе по описанной методике Калашниковой Е.А., Кочиевой Е.З., Мироновой О.Ю. [11]. Для получения апикальных меристем проращивали сорта и формы картофеля в термостате при температуре 37°С 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 полиоксиэтиленсорбитана) и растворах коммерческих хлорсодержащих реагентов – «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 фактеростатной комнате с 16-часовым световым режимом, освещенностью – 5-6 тыс. люкс, температурой 22-25°С, влажностью 70%. Через 50-60 дней из выделенных апикальных меристем вырастали пробирочные растения.

Для сохранения в культуре *in vitro* и жидком азоте выросшие меристемные линии в 3-ем пассаже были протестированы с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) на вирусы PVX, PVY, PVS, PVM и PLRV. Линии, показавшие наличие концентрации вирусной инфекции, выбраковывались.

Затем оздоровленные меристемные линии картофеля постоянно микроклонально размножали через каждые 24-28 дней. Выросшие пробирочные растения картофеля с 5-6 листочками периодически черенковали и пересаживали в пробирки со свежей питательной средой. Из этих черенков снова вырастали новые пробирочные растения.

Для криоконсервации использовали простерилизованные апикальные меристемы размером 3-5 мм, выделенные из глазков клубней сортов и форм картофеля. Апикальные меристемы помещали в эпиндоровские 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 проводили постепенное понижение температуры от +20 до –28°С 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 ОБСУЖДЕНИЕ

### *Сбор коллекции картофеля для создания банка генов в культуре in vitro и в условиях криосохранения*

Собрана коллекция из 32 сортов и 3 гибридов картофеля, полученных из генофонда КазНИИКО в качестве клубневого материала для создания генбанка в культуре *in vitro* и в условиях криосохранения: *Сорта* – Астаналық, Валентина, Дуняша, Кайнар, Шортандинский, Карасайский, Артемис, Казахстанский, Кустанайские новости, Розара, Мошняковский, Жанайсан, Ушкoньыр, Дидар, Невский, Латона, Аладин, Памяти Кунаева, Акжар, Альянс, Алая заря, Айтмурат, Кокчетавский ранний, Мирас, Елена, Фирменный, *Гибриды* - 2-10-12, 23-10-01, 9-10-04 (рис. 1).



**Рис. 1.** Сорта картофеля, полученные из генофонда КазНИИКО

Сотрудниками лаборатории биотехнологии и селекции растений НЦБ представлен клубневой материал растений-регенерантов картофеля – К-4-2 (R5), К-4-9 (R5), Тохтар 10% КФ, полученных биотехнологическими методами. Сорта и формы картофеля отличались между собой по группе спелости, по допуску к использованию в Республике Казахстан, по стране происхождения, по учреждению Оригинатора, по морфологическим и хозяйственно-биологическим признакам.

*Оптимизация режимов стерилизации апикальных меристем для введения в культуру in vitro*

На начальном этапе клубни образцов картофеля предварительно промыли в мыльном растворе и поместили в термостат для оздоровления от вирусной и грибной инфекции. Для этого в термостате повышали температуру от +25°C до +37°C путем ежедневного увеличения на 2°C. После этого клубни проращивали в факторостатной комнате при температуре 37°C и 70% относительной влажности воздуха в течение 3-х недель.

Проросшие ростки из глазков клубней использовали для введения в культуру *in vitro*. Одним из важных этапов введения в культуру *in vitro* апикальных меристем является стерилизация ростков. Для этого были подобраны режимы стерилизации и стерилизующие агенты для регенерации апикальных меристем.

В результате исследований провели подбор режимов стерилизации апикальных меристем размером 3-5 мм образцов картофеля для введения в культуру *in vitro*. Для этого стерилизовали апикальные меристемы сортов и форм в разных концентрациях дезинфицирующего раствора и времени экспозиции (табл. 1).

Показано, что из 8 вариантов стерилизующих растворов почти все обладали высокой эффективностью, процент регенерации составил от 59,1±3,3 до 91,7±5,0. Наибольший процент выживших апикальных меристем наблюдали при использовании 4 варианта (Белизна 20% с Tween, 10 мин) – 95,7%; 1 варианта (Белизна 20% с Tween, 7 мин) – 91,7%. Наименьший процент регенерации 59,1 наблюдали на 8 варианте (Белизна 100%, 10 мин). При высокой концентрации стерилизующего агента апикальные меристемы темнели, наблюдали некротический ожог. В связи с этим в дальнейшем для стерилизации апикальных меристем 100% Белизну не использовали.

При сравнении двух экспозиций времени 7 и 10 минут показано, что апикальные меристемы лучше вводятся в культуру *in vitro* при 20% Белизны с Tween, 10 минут, регенерация – 95,7%, по сравнению с 7 минут – 91,7%. Также использование 20% Белизны без Tween, 10 минут, снизило регенерацию на 14,9% (80,8%).

При 70% Белизны с Tween, 10 минут, регенерация составила 79,8%, при этих же концентрациях стерилизующего агента, время экспозиции 7 минут – 76,0%. Применение 70% Белизны без Tween, 10 минут, уменьшило регенерацию на 9,4% (70,4%).

**Таблица 1.** Подбор режимов стерилизации апикальных меристем образцов картофеля для введения в культуру *in vitro*

Дезинфицирующий раствор, время стерилизации	Сорт картофеля	Апикальные меристемы, введенные <i>in vitro</i> , шт.	Регенерация, %	Средний процент, %
1 вариант – Белизна 20% с Tween, 7 мин.	Валентина	17	100	91,7±5,0
	Карасайский	13	92,1	
	Азиада	23	98,4	
	Жанайсан	15	87,2	
	Розара	16	95,6	
	Ягодный 19	12	91,3	
	Ушконыр	20	77,4	
2 вариант – Белизна 70% с Tween, 7 мин.	Валентина	23	80,2	76,0±2,8
	Карасайский	12	77,1	
	Азиада	15	82,1	
	Розара	16	64,6	
3 вариант – Белизна 100% с Tween, 7 мин.	Валентина	23	56,1	61,4±3,2
	Дуняша	11	66,7	
4 вариант – Белизна 20% с Tween, 10 мин.	2-10-09	13	98,4	95,7±1,5
	15-09-2	24	93,1	
	21-10-06	12	96,7	
	6-10-03	21	94,7	
	26-09-03	12	95,6	
5 вариант – Белизна 70% с Tween, 10 мин.	4-10-01	23	90,1	79,8±3,4
	2-10-06	12	84,3	
	22-10-11	12	62,4	
	26-10-07	12	74,8	

	2-10-12	21	87,3	
6 вариант – Белизна 20%, 10 мин.	Валентина	14	84,1	80,8±4,3
	Карасайский	23	69,3	
	Азиада	10	88,2	
	Розара	14	81,6	
7 вариант – Белизна 70%, 10 мин.	Валентина	13	74,3	70,4±4,4
	Карасайский	25	72,9	
	Мошняковский	12	64,1	
8 вариант – Белизна 100%, 10 мин.	Валентина	22	59,1	59,1±3,3

Таким образом, 4 и 1 варианты (20% концентрация коммерческого хлорсодержащего раствора «Белизна» с Tween, время экспозиции 10 минут и 7 минут), 5 и 2 варианты (70% «Белизна» с Tween, время экспозиции 10 и 7 минут) могут быть использованы для стерилизации апикальных меристем картофеля для введения в культуру *in vitro*. Для стерилизации без Tween может быть использован шестой вариант (Белизна 20%, время экспозиции 10 мин.).

В настоящее время введено в культуру *in vitro* 679 апикальных меристем сортов и форм картофеля для создания коллекции пробирочных растений и криоконсервации.

*Оптимизация состава питательной среды для размножения меристемных линий сортов и форм картофеля*

В следующем эксперименте проведено изучения влияния состава питательной среды на рост меристемных линий образцов картофеля (табл. 2). Калашникова Е.А. с соавторами [11] для клонального микроразмножения картофеля рекомендует использовать питательную среду Мурасиге и Скуга с добавлением аскорбиновой кислоты – 20 мг/л; мезоинозита – 100 мг/л; ИУК – 0,5 мг/л; БАП – 1,0 мг/л; сахарозы – 20000 мг/л; агара – 7000 мг/л.

**Таблица 2.** Варианты питательных сред для размножения меристемных линий картофеля (среда Мурасиге и Скуга)

Вещество	В-1 (мг/л)	В-2 (мг/л)	В-3 (мг/л)	В-4 (мг/л)
Макросоли	50	50	50	50
Микросоли	1,0	1,0	1,0	1,0
Хелат железа	5,0	5,0	5,0	5,0
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	330	330	330	330
Мезоинозит	100	100	100	100
Пиридоксин	1,0	1,0	1,0	1,0
Тиамин	1,0	1,0	1,0	1,0
Никотинамид	1,0	1,0	1,0	1,0
Аденин	40,0	10,0	1,0	1,0
Гиббереловая кислота	2,0	1,0	-	-
Аскорбиновая кислота	-	-	100,0	-
Пантотенат Са	-	10,0	-	-
Глицин	-	-	-	3,0
Активированный уголь	-	10000	-	-
Кинетин	1,0	-	1,5	-
ИУК	1,0	1,0	0,5	0,5
Агар	7000	7000	7000	7000
Сахароза	30000	20000	30000	40000
Глюкоза	-	20000	-	-

Для размножения меристемных линий картофеля использовали 4 варианта питательной среды МС с добавлением различных концентраций витаминов, фитогормонов. При сравнении 4-х вариантов среды не выявлено влияние кинетина, гиббереловой кислоты на активный рост меристемных линий, в связи с этим можно использовать питательные среды без добавления этих гормонов. Для формирования корней лучше использовать ИУК в концентрации 0,5 мг/л в питательной среде МС.

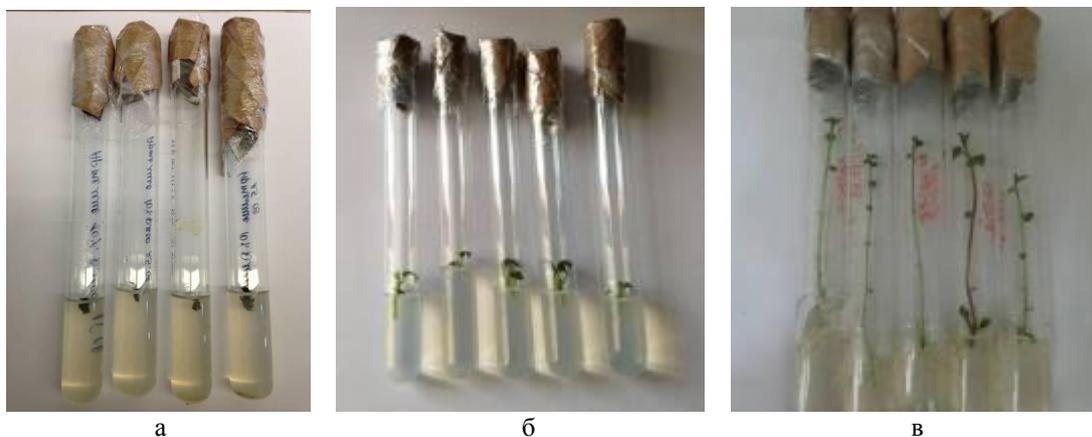
При изучении 4-х вариантов сред по сорту Шортандинский наблюдали наибольший прирост стебля – 10,1 см; количество листьев – 10,2 шт.; корней – 9,7 шт. на варианте питательной среды В4 (табл. 3, рис. 2). Также по остальным четырем сортам Ушконыр, Дуняша, Латона, Жанайсан на этой же питательной среде активно росли пробирочные растения с хорошо развитой корневой системой.

Наименьший рост меристемных линий по высоте растений, по формированию листьев наблюдали на варианте среды В1, корнеобразование отсутствовало. При изучении роста меристемных линий на пяти сортах картофеля Ушконыр, Дуняша, Шортандинский, Латона, Жанайсан активное корнеобразование было при использовании вариантов сред В3, В4. Таким образом, для размножения меристемных линий лучше использовать варианты питательных сред В3, В4.

**Таблица 3.** Влияние состава питательной среды на рост и развитие меристемных линий картофеля

Сорт	Среда	Динамика изменений показателя роста, см					Прирост, см
		0 сут	7 сут	14 сут	21 сут	28 сут	
<i>Высота растений, см</i>							
Ушконыр	В1	1,8	3,8	4,6	4,8	5,6	+3,8
	В2	1,5	2,0	2,5	3,0	4,3	+2,8
	В3	1,5	2,2	2,5	3,0	5,9	+4,4
	В4	2,2	4,2	7,5	8,5	9,5	+7,3
Дуняша	В1	1,8	2,3	3,6	4,7	5,8	+4,0
	В2	1,2	2,0	3,2	4,3	5,3	+4,1
	В3	1,8	2,8	4,3	5,6	8,0	+6,2
	В4	1,7	3,7	4,7	9,1	11,0	+9,3
Шортандинский	В1	1,5	2,5	3,6	4,6	5,0	+3,5
	В2	1,7	2,7	3,4	4,4	5,6	+3,9
	В3	1,6	2,6	4,0	6,0	8,5	+6,9
	В4	1,7	4,7	6,8	9,9	11,8	+10,1
Латона	В1	1,9	3,2	4,2	5,5	6,6	+4,7
	В2	1,9	2,2	3,2	4,5	5,0	+3,1
	В3	2,0	3,0	4,3	5,2	7,8	+5,8
	В4	1,8	2,5	4,8	6,6	9,0	+7,2
Жанайсан	В1	1,5	2,5	3,5	4,9	6,0	+4,5
	В2	1,5	2,5	3,0	4,8	6,2	+4,6
	В3	1,3	3,3	5,0	6,5	8,3	+7,0
	В4	1,8	3,8	5,6	7,5	10,4	+8,6
<i>Количество листьев, шт.</i>							
Ушконыр	В1	1,0	2,3	3,4	4,5	5,6	+4,6
	В2	1,0	1,6	2,0	3,3	4,0	+3,0
	В3	1,0	2,8	3,5	4,2	7,5	+6,5
	В4	1,0	8,7	10,2	11,4	12,5	+11,5
Дуняша	В1	1,0	3,0	4,2	5,4	6,5	+5,5
	В2	1,0	2,3	3,4	5,4	7,6	+6,6
	В3	1,0	2,5	4,3	6,0	9,6	+8,6
	В4	1,0	3,7	4,8	8,5	10,5	+9,5
Шортандинский	В1	1,0	2,4	4,0	4,4	5,6	+4,6
	В2	1,0	3,8	4,7	5,3	6,3	+5,3
	В3	1,0	2,1	3,5	5,0	7,5	+6,5
	В4	1,0	5,9	7,1	9,5	11,2	+10,2
Латона	В1	1,0	2,8	3,7	4,0	6,2	+5,2
	В2	1,0	3,5	5,0	5,5	6,6	+5,6
	В3	1,0	7,0	7,3	8,7	10,5	+9,5
	В4	1,0	5,8	7,7	9,6	11,4	+10,4

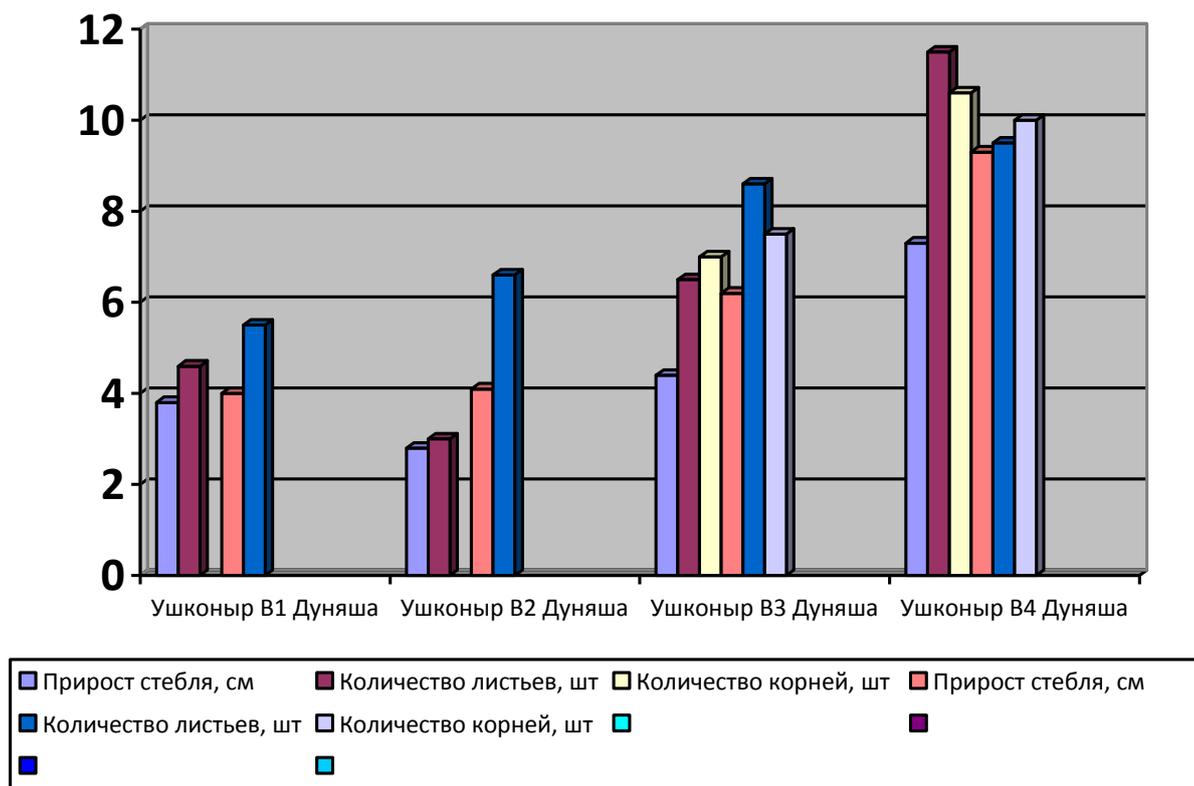
Жанайсан	B1	1,0	1,7	2,5	3,0	3,4	+2,4
	B2	1,0	3,9	4,3	5,7	6,8	+5,8
	B3	1,0	3,6	5,8	7,0	8,0	+7,0
	B4	1,0	3,5	5,5	6,5	8,0	+7,0
<i>Количество корней, шт.</i>							
Ушконыр	B1	-	-	-	-	-	-
	B2	-	-	-	-	-	-
	B3	-	1,0	4,0	5,0	7,0	+6,0
	B4	-	5,7	7,0	8,6	10,6	+4,9
Дуняша	B1	-	-	-	-	-	-
	B2	-	-	-	-	-	-
	B3	-	4,0	5,0	6,3	7,5	+3,5
	B4	-	4,2	5,8	7,3	10,0	+5,8
Шортандинский	B1	-	-	-	-	-	-
	B2	-	2,0	3,0	3,2	3,5	+1,5
	B3	-	1,5	2,0	3,0	5,5	+4,0
	B4	-	6,0	7,7	9,2	9,7	+3,7
Латона	B1	-	-	-	-	-	-
	B2	-	-	-	-	-	-
	B3	-	1,5	2,0	2,5	3,0	+1,5
	B4	-	2,0	3,0	4,0	6,0	+4,0
Жанайсан	B1	-	-	-	-	-	-
	B2	-	1,6	2,0	2,3	3,3	+1,7
	B3	-	2,0	3,2	5,3	5,6	+3,6
	B4	-	7,6	9,0	11,0	12,6	+5,0



а - апикальные меристемы; б – расчеренкованные меристемные линии;  
в – пробирочные растения

**Рис. 2.** Меристемные линии образцов картофеля, культивируемые на питательных средах

На рисунке 1 показано влияние состава питательных сред на рост и развитие меристемных линий сортов картофеля Ушконыр, Дуняша. На сорте Ушконыр наблюдали наибольший прирост стебля – 7,3 см, количество листьев – 11,5 шт., корней – 10,6 шт. на варианте питательной среды В4 (рис. 3).



V1, V2, V3, V4 – варианты питательных сред

**Рис. 3.** Влияние состава питательных сред на рост и развитие меристемных линий сортов Ушконец и Дуняша

Наименьший рост меристемных линий по высоте растений, по формированию листьев наблюдали на варианте среды В2. По двум сортам Ушконец, Дуняша на вариантах среды В1, В2 отсутствовало корнеобразование.

Следовательно, оптимизирован состав питательной среды для размножения меристемных линий образцов картофеля, что позволило нам создать коллекцию образцов картофеля в условиях *in vitro* для криосохранения.

*Создание коллекции образцов картофеля в условиях in vitro*

В настоящее время из введенных в культуру *in vitro* сортов и форм картофеля создана коллекция меристемных линий из 694 пробирочных растений (табл. 4), которая размножается и систематически культивируется на свежие питательные среды. Созданная коллекция используется для размножения и криоконсервации.

**Таблица 4.** Коллекция меристемных линий картофеля в культуре *in vitro*

№	Образцы	Количество растений, шт.
1	Латона	48
2	Шортандинский	45
3	Аладин	10
4	Кайнар	25
5	Айтмурат	10
6	Ушконец	110
7	Акжар	12
8	Жанайсан	45
9	Дуняша	51
10	Казахстанский	15
11	Дидар	9
12	Невский	25

13	Валентина	10
14	Астанальк	17
15	Карасайский	24
16	Кустанайские новости	12
17	Розара	14
18	Мошняковский	13
19	Артемис	17
20	Памяти Кунаева	13
21	Альянс	11
22	Алая заря	17
23	Кокчеставский ранний	9
24	Мирас	10
25	Елена	14
26	Фирменный	17
27	2-10-12	13
28	23-10-01	15
29	9-10-04	14
30	К 4-9	18
31	К 4-5	16
32	Тохтар 10% <i>F.solani</i>	15
	Итого	694

#### *Криоконсервирование апикальных меристем растений картофеля*

Созданные протоколы криоконсервации не могут гарантировать сохранение всех генотипов. Критическая точка в картофеле при криоконсервации является регенерация растений после размораживания. В связи с этим проводим оптимизацию этапов криоконсервации отобранных образцов картофеля. Для этого используем растительный материал – апикальные меристемы, пробирочные растения; криопротекторы, вещества легко проникающие в меристемные клетки – 10% ДМСО, 20% глицерин; замораживание – медленное (от +20° до –35°С, скорость 0,5°С в минуту) и быстрое (сразу в жидкий азот); размораживание – в водяной бане +37°...+40°С в течение 1 минуты; отмывание в 3% сахарозе; культивирование на питательной среде МС для регенерации.

Для вегетативно размножающихся растений наилучший способ сохранения их генофонда является криоконсервирование верхушечных меристем побегов [3, 8]. Преимуществом является то, что апикальные меристемы после криосохранения сразу развиваются в целое растение, клетки меристемных растений всегда однородны по плоидности, и регенерируемые из них растения соответствуют исходному генотипу. Меристемные клетки растений очень мелкие, почти невакуолизированы, в связи с этим они намного легче переносят глубокое замораживание и оттаивание. Подвергая криоконсервированию меристемы, можно получить путем микрочеренкования необходимое количество растений.

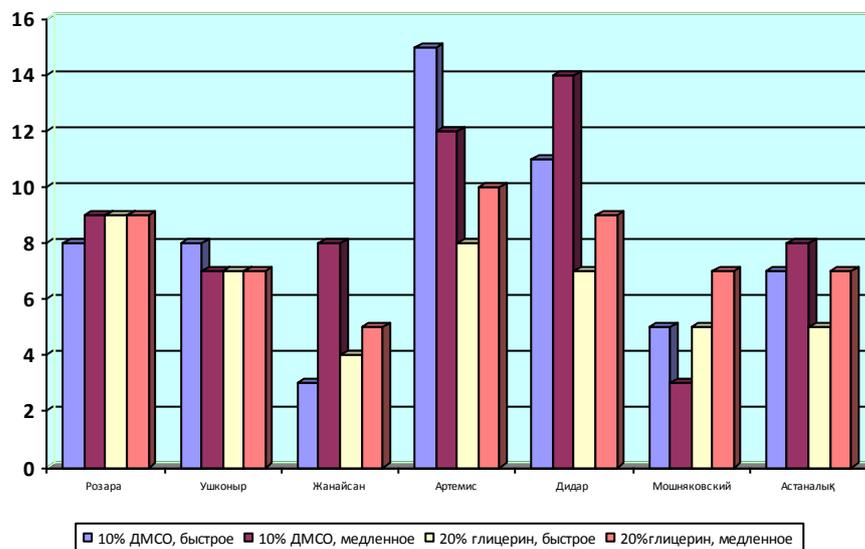
В связи с этим в начале эксперимента для криоконсервации использовали пророщенные из глазков клубней картофеля апикальные меристемы (табл. 5, рис. 4). Апикальные меристемы размером 3-5 мм срезали, затем стерилизовали и помещали в эпиндоровские пробирки для криоконсервации. Затем заливали криопротектором 10% ДМСО, 20% глицерин, и выдерживали 2 часа при комнатной температуре. После этого сливали криопротекторы и часть апикальных меристем образцов картофеля в эпиндоровских пробирках погружали сразу в жидкий азот при быстром замораживании. Для остальных апикальных меристем в эпиндоровских пробирках проводили медленное замораживание. Для этого снижали температуру от +20° до –35°С, скорость 0,5°С в минуту в термосе с металлической колбой (0,5 литра спирта, жидкий азот). Затем апикальные меристемы в пробирках перенесли в сосуд Дьюра с жидким азотом.

Для оптимизации условий криоконсервации провели быстрое размораживание апикальных меристем в эпиндоровских пробирках в водяной бане до +37°...+40°С в течение 1 минуты, после этого отмыли в 3% сахарозе и пересадили на питательную среду МС для регенерации (рис. 5).



1 – подготовка апикальных меристем; 2 – добавление криопротекторов 10% ДМСО, 20% глицерин; 3 – замораживание в жидком азоте; 4, 5 – размораживание меристем в водяной бане; 6 – отмывание меристем в 3% сахарозе; 7 – культивирование меристемы на питательной среде для регенерации

**Рис. 4.** Криоконсервация образцов картофеля



**Рис. 5.** Криоконсервация апикальных меристем сортов картофеля

Размороженные апикальные меристемы сортов картофеля Розара, Ушконыр, Жанайсан, Артемис, Дидар, Мошняковский, Астаналык в количестве 217 пробирок культивируются в освещенной фактостатной комнате при 25°C и влажностью воздуха 70%. В настоящее время проводится работа по оптимизации условий криосохранения для создания банка генов в условиях жидкого азота.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Собрана коллекция из 32 сортов и 6 форм картофеля, полученных из генофонда КазНИИКО в качестве клубневого материала для создания генбанка в культуре *in vitro* и в условиях криосохранения.

Подобраны режимы стерилизации и стерилизующие агенты для регенерации апикальных меристем. 20%-ная концентрация коммерческого хлорсодержащего раствора «Белизна» с Tween, время экспозиции 10 минут и 7 минут, 70% «Белизна» с Tween, время экспозиции 10 и 7 минут, могут быть использованы для стерилизации апикальных меристем картофеля.

Оптимизирован состав питательной среды для размножения меристемных линий образцов картофеля. Из введенных в культуру *in vitro* сортов и форм картофеля создана коллекция меристемных линий из 694 пробирочных растений, которая размножается и систематически культивируется на свежие питательные среды. Созданная коллекция используется для размножения и криоконсервации.

Размороженные апикальные меристемы сортов картофеля Розара, Ушконыр, Жанайсан, Артемис, Дидар, Мошняковский, Астаналық в количестве 217 пробирок культивируются в освещенной фактостатной комнате при 25°C и влажностью воздуха 70%. В настоящее время проводится работа по оптимизации условий криосохранения для создания банка генов в условиях жидкого азота.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Айтбаев Т.Е. Сорты картофеля, допущенные к использованию в республике Казахстан // Сборник тез. второго науч.-практ. совещания «Генетические и агротехнологические ресурсы повышения качества продовольственного и технического картофеля». – М., 2012. – С. 5-6.
2. International Potato Center (CIP). – *Medium-Term Plan*, 2009. – P. 2010-2012.
3. Kaczmarczyk A., Shvachko N., Lupysheva Y., Hajirezaei M.R., Keller E.R.J. Influence of alternating temperature preculture on cryopreservation results for potato shoot tips // *Plant Cell Rep.* - 2008. – Vol. 27. – P. 1551-1558.
4. Mikula A., Tomiczak K., Rybczyn J.J. Cryopreservation enhances embryogenic capacity of *Gentiana cruciata* (L.) suspension culture and maintains (epi) genetic uniformity of regenerants // *Plant Cell Rep.* – 2011. – Vol. 30. – P. 565-574.
5. Edesi J., Kotkas K., Mattila A.M., Haggman H. Preservation of potato (*Solanum tuberosum*) germplasm by the mean of cryopreservation // Meeting Workgroup 2 COST Action 871, Integration of cryopreservation in genebank strategies. – Germany, 2009. – P. 34.
6. Гавриленко Т.А., Дунаева С.Е., Трускинов Э.В., Антонова О.Ю., Пендинен Г.И., Лупышева Ю.В., Роговая В.В., Швачко Н.А. Стратегия долгосрочного сохранения генофонда вегетативно размножаемых сельскохозяйственных растений в контролируемых условиях среды // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2007. – Т. 164. – С. 273-283.
7. Ковальчук И.Ю., Турдиев Т.Т. Оптимизация методов криоконсервации гермоплазмы черной смородины (*Ribes nigrum* L.) // Биотехнология. Теория и практика. – 2010. – №2. – С. 54-61.
8. Kaczmarczyk A., Rokka V.M., Keller E.R.J. Potato Shoot Tip Cryopreservation. A Review // *Potato Research.* – 2011. – Vol. 54. – P. 45-79.
9. Towill L.E. Survival at ultra-low temperatures of shoot tips from *Solanum tuberosum* groups Andigena, Phureja, Stenotomum, Tuberosum, and other tuber-bearing *Solanum* species. *Cryo-Letters.* – 1984. – Vol. 5. – P. 319-326.
10. Красавин В.Ф. Изучение генетических ресурсов картофеля коллекции ВИР в условиях юго-востока Казахстана и их использование в селекции // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции, посв. 80-летию мировой коллекции картофеля ВИР. – 2007. – Т. 163. – С. 29-41.
11. Калашникова Е.А., Кочиева Е.З., Миронова О.Ю. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. – М.: КолоС, 2006. – 144 с.

## ТҮЙІН

*In vitro* технологиясы өсімдіктердің топтамасын құру мақсатында гендер банкінде кеңінен қолданылады. Оқшауланған мүшелерді, ұлпаларды және өсімдік жасушаларын өсіруге негізделетін биотехнологиялық әдістерді қолданудың биологиялық алуантүрлілікті сақтау мәселесін шешуде қолданылып жүрген дәстүрлік әдістерден артықшылығы бар.

*In vitro* культурасы және криосақтау жағдайында гендер банкін құру үшін түйнек материалы ретінде ҚазКЖКШҒЗИ генофондынан алынған картоптың 32 сорты және 14 гибриді топтамаға біріктірілді. *In vitro* жағдайындағы апикальды меристемасын культураға енгізудің маңызды кезеңдерінің бірі - залалсыздандыру. Ол үшін апикальды меристеманың регенерациясына арналған залалсыздандыру режимдері мен залалсыздандыру агенттері таңдалып алынды. Пробиркалық өсімдіктер мен криосақтау үшін *in vitro* жағдайында картоптың 46 үлгісінің апикальды меристемасы культураға енгізілді. Картоп үлгілерінің меристемалық линияларын көбейтуге арналған қоректік орта құрамы оңтайландырылды. *In vitro* жағдайында жаңа қоректік ортада жүйелі түрде өсіп көбейе алатын 694 пробиркалық өсімдіктен картоп үлгілерінің меристемалық линияларының топтамасы құрылды. Қазіргі уақытта криосақтау жағдайын оңтайландыру және сұйық азотта гендер банкін құру жұмыстары қарқынды жүргізілуде.

**Кілтті сөздер:** картоп, *in vitro*, өсімдіктің апикальды меристемасы, қоректік орталар, криосақтау, консервация, криопротекторлар, мұздату.

## SUMMARY

In vitro technology to maintain plant collections in genebanks is used very widely. Involvement of biotechnology based on the cultivation of isolated organs, tissues and cells of plants to address the conservation of biological diversity has advantages over traditionally used approaches.

Formed collection of 32 varieties of potato and 6 forms derived from the gene pool KazNIIKO tuber material as to create Genebank in culture in vitro and in cryopreservation. One of the important stages of the introduction of in vitro culture of apical meristems is sterilization. Were selected for this mode of sterilization and sterilizing agents for the regeneration of the apical meristem. Permission to culture in vitro apical meristem 46 potato samples to create a collection of test-tube plants and cryopreservation. Optimized composition of the culture medium for the propagation of meristem lines potato samples. The collection of samples of potato meristem lines in culture in vitro of 694 test-tube plants, which multiplies and systematically cultivated in fresh nutrient medium. There are now also is working to optimize the cryopreservation conditions and the creation of a gene bank in liquid nitrogen.

**Keywords:** potato, *in vitro*, the apical meristems of plants, growth media, cryopreservation, cryoprotectants, freezing.