

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ХОЛОДОВОЙ АККЛИМАТИЗАЦИИ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ
МЕРИСТЕМ МАЛИНЫ (*Rubus idaeus* L.) ПОСЛЕ КРИОСОХРАНЕНИЯ

Турдиев Т.Т.

Институт биологии и биотехнологии растений Национального
центра биотехнологии Республики Казахстан

Ключевые слова: криосохранение, малина, апикальные меристемы, сахароза, холоддовая акклиматизация, криобанк.

Введение

Ягодные культуры широко используются в пищевой и перерабатывающей промышленности Казахстана, и занимают особое место. Ягоды являются основными источниками витаминов, в том числе витаминов С, Р, Е, К и каротина, которые не синтезируются в организме и должны постоянно поступать с пищей. Кроме того, ягоды богаты минеральными солями, высокоценными углеводами, органическими кислотами, клетчаткой и пектиновыми соединениями также содержат растительные масла, белковые вещества, ферменты, ряд ароматических, вкусовых, антибактериальных и многих других биологически активных соединений, оказывающих жизненно важное физиологическое действие на функции многих органов и систем организма человека [1].

На территории Казахстана произрастают культурные и дикие насаждения ягодных культур, в частности таких, как малина, чёрная смородина и земляника, адаптированные к местным условиям, устойчивые к вредителям и болезням [2]. Агробιοразнообразие ягодных растений Казахстана включает дикие формы, сорта и гибриды, которые содержатся в виде живых коллекций в помологических, ботанических садах и госсортоучастках.

В мировой практике в дополнение к традиционным формам сохранения генетического материала широко используются биотехнологические методы криоконсервации образцов гермоплазмы *in vitro*. Учеными доказано, что генетический материал можно хранить неограниченно долго при сверхнизких температурах [3]. Криосохранение – это метод глубокого замораживания и хранения клеток, тканей и органов растений в жидком азоте при температуре -196°C. Этот способ гарантирует длительное сохранение растительного материала, его генетическую стабильность, а также возможность регенерации целого растения в любое удобное время [4].

Для успешного криосохранения верхушек побегов – наиболее активно растущей ткани (меристемы) необходима предварительная холоддовая акклиматизация, которая приводит к запуску природных механизмов устойчивости растений к холодной погоде [5].

Согласно литературным данным, холоддовая акклиматизация (22°C, 8ч свет, -1°C, 16 ч темнота) улучшает регенерацию меристем малины после замораживания. При увеличении продолжительности акклиматизации от 1 до 3 недель процент выживших меристем сорта *Rubus parvifolius* L. возрастает от 63 до 90%; [6]. У растений яблони, прошедших ХА при 5°C в течение 3 недель, после размораживания образуется около 80% побегов [7]. Целью настоящих исследований являлся подбор оптимальной длительности и способа холоддовой акклиматизации при криосохранении апикальных меристем малины для создания криобанка растений Казахстана.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования служили сорта малины (Анар и Дружная) из коллекции Помологического сада КазНИИ плодоводства и виноградарства.

Асептические побеги в условиях *in vitro* размножали на среде Мурасиге и Скуга (МС) [8] в течение 3 недель в факторостатной комнате при 23-25°C, освещенности 25 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 16-ти часовом фотопериоде. В конце 3 недельного цикла микроклонального размножения растения были помещены на холоддовую акклиматизацию. Акклиматизацию побегов проводили в течение 1 - 6 недель в климатической камере (Lab-Line Environette, Melrose Park, IL, USA) при чередующемся режиме: 8 час, 22°C, интенсивность освещения 10 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, затем 16 час, -1°C, отсутствие освещения. Или при постоянной температуре +4°C от 1 до 3 месяцев (8-ми часовой фотопериод (интенсивность освещения 10 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Криосохранение проводили методом витрификации с прекультивированием на среде с 0,3М сахарозой, предложенный Matsumoto T. и Sakai A. [9]. Выделяли апикальные меристемы с 2-3 листовыми примордиями и размером не более 0,8-1 мм.

Меристемы, культивируемые на среде МС с 0,3М сахарозой помещали в климакамеру с переменной температурой (8 час, 22°C, интенсивность освещения 10 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ / 16 час, -1°C, темнота) на 48 часов. Для предобработки перед криоконсервацией использовали криопротектор

PVS2 (глицерин 30%, этиленгликоль 15%, ДМСО 15%). После размораживания меристемы промывали 1,2М сахарозой два раза, затем побеги регенерировали из меристем на среде МС для размножения и возобновления роста.

Результаты и обсуждение

Режим холодовой акклиматизации очень важно определить для оптимальной криоконсервации различных генотипов малины, помещенных в дьюар с жидким азотом на длительное хранение.

Влияния холодовой акклиматизации на эффективность криосохранения изучалось многими исследователями. Так, изучение выживаемости верхушек побегов груши показало различное отношение к ХА разным сортам [10]. Длительная холодовая акклиматизация повышала выживаемость меристем после криоконсервации, однако время обработки холодом было индивидуально для каждого проверяемого генотипа и зависело от его выносливости [11]. Чередование температуры при акклиматизации, было более эффективно для криоконсервации верхушек побегов мяты, в отличие от постоянной низкой температуры [12]. Palonen and Junttila [13] определили, что предобработка сахарозой в течение 14 дней при ХА приводит к еще лучшей холодовой выносливости растений малины.

Проведенные нами эксперименты по криосохранению показали, что жизнеспособность меристем малины после криосохранения в значительной степени зависит от акклиматизации к холоду. Способы и продолжительность холодовой акклиматизации определяли при постоянной температуре: +4°C 8-ми часовом фотопериоде от 1 до 3 месяцев и при чередующемся режиме: +22°C 8 час / 16 час, -1°C в течение 1 - 6 недель.

У неакклиматизированных растений малины сорта Анар меристемы после криоконсервации не выживали, у сорта Дружная выживали единичные меристемы. Постоянная положительная низкая температура +4°C способствовала выживаемости меристем: при акклиматизации в течение одного месяца выживаемость меристем сорта Анар после замораживания составляла 39,5%, двух месяцев – 39,8%, трех – 55,0%.

При криосохранении более эффективным было влияние переменной температуры. Холодовая акклиматизация в течение одной недели положительно влияла на выживаемость большинства меристем. Две недели ХА улучшали регенерацию растений у двух исследуемых сортов Анар и Дружная до 46,4% и 34,6% соответственно. Увеличение продолжительности ХА до 3 недель приводило к резкому повышению жизнеспособности (70,0 и 81,7%) меристем этих сортов. Три недели ХА были лучшими для восстановления роста Дружная, а для Анар были оптимальными 3 - 5 недель. Через 4 недели акклиматизации регенерационная способность обеих сортов начала снижаться до 67,8% и 56,8. После 6 недель ХА жизнеспособность меристем уменьшилась до 39,5 и 37,3% в зависимости от сорта. Следовательно, эффективная продолжительность холодовой акклиматизации для меристем малины находилась в пределах от 3 до 5 недель (рисунок). Все дальнейшие эксперименты были проведены с 3 неделями ХА. Регенерация контрольных меристем (без замораживания) составляла 80-100 %.



Рисунок. Регенерация побегов малины при акклиматизации переменной температурой в течение от 0 до 6 недель с использованием метода криосохранения с PVS2 и 0,3М сахарозой

Выводы:

Холодовая акклиматизация является эффективным приемом при подготовке растительного материала к криоконсервации. Холодовая акклиматизация побегов *in vitro* в течение 3 недель повышает жизнеспособность меристем малины после криосохранения. Выявлено, что оптимальная продолжительность холодовой акклиматизации для сортов Анар и Дружная составляет 3 недели.

1. Волкова Н.К., /Сад и ягодник.// Изд. Компартии Казахстана- 1988- 215 с.
2. Джангалиев А. Д., Салова Т. М., Туреханова Р. М. Дикie плодовые растения Казахстана. – Алматы: КазгосИНТИ. – 135 с.
3. Валиханова Г.Ж. Биотехнология растений. Алматы «Конжик», 1996, С. 257-263.) (Попов А.С. Криогенное хранение культур клеток растений.// Культура клеток растений. -М., Наука, 1981, С. 150-162.
4. Reed B. M. The basics of *in vitro* storage and cryopreservation // National Clonal Germplasm Repository, Corvallis, O.R. USA. – 2002. – P. 34-46.
5. Reed B.M. Cryopreservation of Temperate Berry Crops / Reed B.M. (Ed) // Plant Cryopreservation: A Practical Guide. – New York: Springer Science + Business Media LLC, 2008. – P. 333-364.
6. Y.Chang, B.M.Reed. Extended cold acclimation and recovery medium alteration improve regrowth of *Rubus* shoot tips following cryopreservation. Cryo-Letters 20, 1999. P. 371-376.
7. Niino T., Sakai A., Yakuwa H., Nojiri K. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot-tips of apple and pear by vitrification // Plant Cell, Tissue and Organ Culture - 1992. - V. 28. - P.261-266.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays whis tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V.15. – P. 431-434.
9. Matsumoto T., Sakai A. Cryopreservation of grape *in vitro*-cultured axillary shoot tips by three-step vitrification / Engelmann F., Takagi H. (Eds) // Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current Research Progress and Applica tion. – Rome: Japan International Research Center for Agricultural Sciences and International Plant Genetic Resources Institute, 2000. – P. 424-425.
10. Chang Y, Reed B M Effects of photoperiod and alternating temperature on the cryopreservation and cold hardiness of *in vitro*-grown *Pyrus* meristems. In Vitro Cellular and Developmental Biology, 1998 – P. 34- 61.
11. Chang Y, Reed B M Preculture conditions influence cold hardiness and regrowth of *Pyrus cordata* shoot tips after cryopreservation. HortScience, 2001 – P. 1329-1333.
12. Senula A, Keller E R J, Sanduijav T, Yohannes T Cryopreservation of cold acclimated mint explants using a simple vitrification protocol. CryoLetters, 2007– P. 1-12.
13. Palonen P, Junttila O Cold hardening of raspberry plants *in vitro* is enhanced by increasing sucrose in the culture medium. Physiologia Plantarum, 1999– P. 386-392.

* * *

0,3М сахароза қосылған витрификация әдісімен криосақтаудан кейін таңқурайдың Анар және Дружная сорттарының өміршендігіне суыққа ұзақ уақыт бейімдеудің әсері зерттелінді. Криоконсервіленгеннен кейін таңқурайдың суыққа бейімделмеген Анар сортының меристемаларының өміршенділігі сақталмады, ал Дружная сортының біраз меристемалары өміршендігін сақтап қалды. +4°C температурада 3 ай бойы тұрақты суыққа бейімделген Анар сортының меристемаларының мұздатылғаннан кейін өміршендігі 55,0 %-ға жетті. Ал ауыспалы температурада (8 сағат +22°C температурада және 16 сағат -1°C) 3 апта бойы бейімделген меристемалардың өміршендігі генотипке байланысты 70,0 -81,7%-ға дейін жетті. Меристемалардың өміршендігі 6 апта бойы суыққа бейімдеу нәтижесі бойынша төмендегені (39,5 және 37,3%) байқалды. Таңқурай меристемалары үшін криоконсервілеу алдында суыққа бейімдеудің ең тиімдісі 3-5 апта уақыт аралығы болды.

We studied influence of method and duration of cold acclimatization on meristem viability of “Anar” and “Druzhnaya” raspberry breeds after cryopreservation by vitrification with 0.3M sucrose. Meristems of non acclimatized plants of “Anar” raspberry breeds did not survived and meristems of non acclimatized plants “Druzhnaya” raspberry breeds survived only numbers of them. Acclimatization by constant positive temperature (+4°C) during 3 months viability of preliminary freezed “Anar” raspberry

breed meristems was 55.0%. The cold acclimatization (CA) under variable temperature during 3 weeks raised viability of the most meristems up to 70.0 and 81.7% respectively to breeds. 6 weeks long CA decreased meristems' viability to 39.5 and 37.3% respectively. The effective duration of cold acclimatization for raspberry meristems is in between 3-5 weeks.

УДК 575.24: 582.1

ӘР ТҮРЛІ МӨЛШЕРДЕ ЫЛҒАЛДАНҒАН АРПА МЕН БИДАЙ ТҰҚЫМЫНДА ФУНГИЦИДТЕРДІҢ ЦИТОГЕНЕТИКАЛЫҚ ӘСЕРІН ЗЕРТТЕУ

Сартаев А.

Қазақ мемлекеттік қыздар педагогикалық университеті

Табиғи жағдайда көптеген абиотикалар факторлар (судың мөлшері, температура және т.б.) жасушада жүретін мутациялық үрдіске әсерін тигізетіні белгілі. Мысалы, жасушадағы судың мөлшері хромосомалардың мутагендерге сезімталдығын арттырып, радиациялық және химиялық мутагендер тудыратын өзгерістердің деңгейіне ықпал етеді [1]. Сондықтан жасушадағы суды күшті түрлендіргіш ретінде есептейді.

Осыған байланысты әр түрлі мөлшерде ылғалданған арпа мен бидай тұқымына фунгицидтердің цитогенетикалық әсерін зерттедік.

Материалдар және әдістер Фунгицидтердің цитогенетикалық белсенділігін зерттеу үшін арпаның Черниговский-5 сорты және бидайдың Казахстанская-3 сорттының әр түрлі мөлшерде ылғалданған (8-10% H_2O), (12-14% H_2O), (18-20% H_2O) тұқымдары алынды. Осы тұқымдарды фунгицидтердің гранозан, витавакс және ТМТД-ның әр түрлі мөлшерімен 96 сағат бойы өңдедік. Тұқым өскінінің меристемалық жасушасынан препарат жасап, митоздық бөлінудің анафазасында хромосомдардың құрылымдық өзгерістерінің жиілігін МБИ-3 микроскобының көмегімен анықтадық.

Зерттеу нәтижелері және оны талқылау Әр түрлі мөлшерде ылғалданған арпа мен бидай тұқымына фунгицид гранозанның цитогенетикалық әсері.

Ылғалдылығы 8-10% арпа мен бидай тұқымын фунгицид гранозанның ауыл шаруашылығында қолданатын дозасымен (НД) өңдегенде арпада түзілген мутацияның жиілігі 100 жасушаға ($5,43 \pm 0,84$) және бидайда ($6,68 \pm 0,83$) өзгерістерден келсе, бұл бақылау нұсқадан ($3,10 \pm 0,71$ және $3,04 \pm 0,86$) біршама артық. Гранозанның ауыл шаруашылығында қолданатын дозасын екі есе арттырғанда (2НД) арпа мен бидай жасушасында түзілген мутацияның жиілігі 100 жасушаға ($7,06 \pm 0,88$ және $8,58 \pm 0,92$) өзгерістерден болса, бұл бақылау нұсқамен салыстырғанда екі есе көп. Ал, гранозанның ауыл шаруашылығында қолданатын концентрациясын төрт есе азайтқанда (-4НД) арпа мен бидай жасушасында туындайтын мутацияның жиілігі бақылау нұсқа деңгейінде қалады. Ылғалдылығы 12-14% арпа мен бидай тұқымын гранозанның төрт есе кеміген (-4НД) дозасымен әсер еткенде түзілген мутацияның жиілігі жүз жасушаға бақылау нұсқамен салыстырғанда арпа жасушасында екі есеге, бидайда бір жарым есеге артады. Гранозанның ауыл шаруашылығында қолданатын дозасымен НД және 2НД дозасымен арпа мен бидай тұқымын өңдегенде арпада түзілген мутацияның жиілігі 100 жасушаға ($9,64 \pm 0,98$) өзгерістерден келсе, бидайда ($6,39 \pm 0,97$) өзгерістерден болды. Бұл бақылау нұсқамен салыстырғанда 2-3 көп. Ылғалдылығы 18-20% H_2O арпа мен бидай тұқымын фунгицид гранозанның ауыл шаруашылығында қолданатын дозасымен НД және екі есе көбейтілген дозасымен 2НД әсер еткенде арпаның жасушасында түзілген мутацияның жиілігі бақылау нұсқамен салыстырғанда екі еседен артық, ал бидай жасушасында түзілген мутацияның жиілігі бақылау нұсқадан статистикалық шамамен айырмасы жоқ. Барлық тәжірибе нұсқаларындағы нәтижелері мен хромосомдық өзгерістердің спектрін сараптағанда мутацияның жиілігінің артуы хромосомдық және хроматидтік өзгерістердің есебінен жүреді. Сонымен біздің тәжірибелеріміздің нәтижелері көрсеткендей фунгицид гранозан ауыл шаруашылығында қолданатын (НД) және одан жоғары (2НД) дозасында арпа мен бидай жасушасының хромосомасында құрылымдық мутациялар тудырады және тұқымның ылғалдылығы 8-10% және 12-14% болған жағдайда мутагендік қасиеті