

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ**СОХРАНЕНИЕ И РАЗМНОЖЕНИЕ ЗЕМЛЯНИКИ (*FRAGARIA* x *ANANASSA* DUCH.)
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ**

И.Ю. КОВАЛЬЧУК, кандидат сельскохозяйственных наук;

З.Р. МУХИТДИНОВА, кандидат биологических наук;

Т.Т. ТУРДИЕВ

Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан

Введение

Земляника (*Fragaria* x *ananassa* Duch.) – одна из самых распространённых ягодных культур в Казахстане. В связи с острым дефицитом поливных земель в регионе площади полевых коллекций этой культуры сокращаются, и ценные, но временно невостребованные сорта уничтожаются. Поэтому необходимо сохранить и поддерживать коллекцию этой исключительно важной коммерческой культуры. Для сохранения многих вегетативно размножаемых растений используются биотехнологические методы криоконсервации в жидком азоте, при этом неограниченно долго сохраняется жизнеспособность, регенерационный потенциал и генетическая стабильность исходного материала. За последнее время методы криоконсервации успешно развивались и применялись ко многим видам растений во всем мире [8]. Разработанные стандартные методы [4, 8, 9] получили достаточно широкое распространение. Для криоконсервации многих ягодных культур, включая культурные сорта и дикие разновидности земляники, использовалось контролируемое программное замораживание, методы PVS2 витрификации, инкапсуляции-дегидратации и витрификации-дегидратации [1, 2, 5-7]. В результате было сохранено много различных видов и сортов растений. Стандартные методы криоконсервации хорошо зарекомендовали себя, однако они требуют модификации и оптимизации при изменении лабораторных условий. В Казахстане до настоящего времени коллекция земляники содержалась лишь в полевых условиях, криобанка не существовало.

Данные исследования были проведены с целью усовершенствования технологии введения в асептическую культуру *in vitro*, клонального микроразмножения и разработки биотехнологии криоконсервации изолированных тканей перспективных сортов земляники для создания национального криобанка Казахстана.

Объекты и методы исследования

В эксперименте использовались 22 интродуцированных, перспективных сорта земляники из коллекции Помологического сада Института плодоводства и виноградарства Казахстана.

Исходными эксплантами служили сегменты усов и розеток земляники с пазушными почками, изолированные в период активного роста. Оптимизацию способа введения земляники в культуру *in vitro* осуществляли путём подбора стерилизующих агентов, их концентраций и экспозиций. Для стерилизации растительного материала использовали стерилизующие агенты: диохлор, содержащий в качестве действующего вещества натриевую соль дихлоризоциануровой кислоты, сулему (HgCl_2) и перекись водорода (H_2O_2). Для культивирования использовали среду Мурасиге и Скуга (МС) с различными концентрациями регуляторов роста: 6-бензиламинопурина (БАП), Р-индолил-3-масляная кислота (ИМК) и гибберелловая кислота (ГК). Микрорастения культивировали при 16-часовом фотопериоде, интенсивности освещения $25 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ и температуре 24°C .

Изучали влияние продолжительности холодной акклиматизации (ХА) пробирочных растений на восстановление роста криосохраненных меристем, способы замораживания, состав восстановительных сред оптимальных для регенерации эксплантов, режимы вывода тканей из состояния глубокого охлаждения и регенерации из них целых растений.

Акклиматизацию побегов земляники проводили в течение 1 – 6 недель в климатической камере (Lab-Line Environette, Melrose Park, IL, США) 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.

Испытывали 3 метода криоконсервации в жидком азоте:

1) витрификация с прекультивированием на среде с 0,3 М сахарозой. Метод, предложенный Matsumoto T. и Sakai A. для предобработки [6] был изменен, вычлененные апикальные меристемы с 3-4 листовыми примордиями (в дальнейшем меристемы) для ХА, прекультивировали в течение 2 сут. в условиях ХА на среде МС с 0,3 М сахарозой, а не 3 сут. при 25°C в рекомендованном методе. Размораживание образцов было проведено в водной бане при температуре 45°C в течение 1 мин., затем 1 мин. в воде, при 22°C.

2) витрификация с прекультивированием на среде с 5% ДМСО. Эта техника витрификации была разработана для меристем *Ribes* [5]. Вычлененные меристемы были прекультивированы в течение 2 сут. в условиях ХА на среде МС, содержащей 5% ДМСО. Размораживание образцов было выполнено так же, как в первом методе криоконсервации.

3) инкапсуляция-дегидратация. Использовали метод, разработанный J. Dereuddre и др. [3] и модифицированный M. Reed [7]. Вычлененные меристемы для ХА были помещены в альгинат (3%- ный альгинат в жидкой среде МС с 0,75 М сахарозой). Альгинатные шарики полимеризовали в насыщенном растворе хлорида кальция. Размораживание криопробирок проводили при комнатной температуре в течение 20 мин. Верхушки побегов в альгинатных шариках повторно гидратировали в жидкой среде МС в течение 5 мин.

Меристемы после размораживания помещали на питательную среду для восстановления роста.

Результаты и обсуждение

Для проведения исследований по криоконсервации необходимо иметь в достаточном количестве асептические растения идентичные исходной форме, которые можно получить путём клонального микроразмножения. Необходимым является подбор питательных сред для восстановления меристем после криоконсервации. Для введения в условия *in vitro* были испытаны стерилизующие агенты и их концентрации, уничтожающие сапрофитную микрофлору, а также состав питательных сред для пролиферации. Проведенные исследования показали, что кончики усов земляники эффективно стерилизовать 0,1% $HgCl_2$ с экспозицией 5-7 мин с последующей обработкой в 3% H_2O_2 в течение 10-20 мин или 1% деохлором – 8 мин, затем 3% H_2O_2 – 10-12 мин. Причём время обработки зависело от вводимого в асептическую культуру сорта.

Для введения в культуру *in vitro* земляники была определена оптимальная среда МС, содержащая 0,5 мг/л БАП, 0,01 мг/л ИМК, 0,2 мг/л ГК, 1,0-1,5 мг/л АС, 30 г/л сахарозы. Лучшей для микроразмножения оказалась среда МС, содержащая удвоенное количество NaFe EDTA, 0,3 мг/л БАП, 0,01 мг/л ИМК, 0,2 мг/л ГК, 30 г/л сахарозы. Подобрана эффективная восстановительная среда для меристем после криоконсервации – среда МС, содержащая 0,3 мг/л БАП, 0,2 мг/л ГК, 1,5 мг/л АС, 30 г/л сахарозы.

Известно, что для успешного криозамораживания меристем необходима предварительная холодовая акклиматизация растений, что приводит к запуску природных механизмов устойчивости растений к холодной погоде [8]. В ходе экспериментов по криосохранению определено, что жизнеспособность меристем земляники после криосохранения в значительной степени зависит от акклиматизации к холоду. У не акклиматизированных растений земляники сорта Свит Чарли выживали лишь единичные меристемы. Холодовая акклиматизация в течение одной недели не оказывала существенного влияния на выживаемость. Две недели ХА улучшали регенерацию растений до 37,3%. Увеличение продолжительности ХА до 3 недель приводило к резкому увеличению жизнеспособности (76,7%) меристем этого сорта. Через 4 недели акклиматизации регенерационная способность возросла незначительно, а в последующие недели понемногу снижалась. После 6 недель ХА жизнеспособность меристем уменьшилась до 76,1%. То есть эффективная продолжительность холодовой акклиматизации для земляники составила от 3 до 6 недель. Однако целесообразно проводить акклиматизацию не более 3-4 недель (табл.).

Таблица

Влияние холодной акклиматизации на регенерацию растений из меристем земляники сорта Свит Чарли после криозамораживания методом инкапсуляции-дегидратации

Неделя акклиматизации	Количество жизнеспособных меристем, шт.		Регенерация, %
	до замораживания	после замораживания	
0	58	3	5,2
1	55	4	7,3
2	51	19	37,3
3	60	46	76,7
4	60	47	78,3
5	49	38	77,6
6	46	34	76,1

Для установления оптимального метода замораживания в жидком азоте нами использованы стандартные методики: две модификации метода витрификации и метод инкапсуляции-дегидратации. Исследование проводили на 2 сортах земляники: Адди и Редгонтлит. В проводимых экспериментах сорт Адди имел лучшее восстановление жизнеспособности после замораживания в жидком азоте по сравнению с сортом Редгонтлит. Восстановление роста у обоих сортов после жидкого азота было значительней при использовании метода инкапсуляции-дегидратации. Криоконсервация двумя другими методами была менее успешной, и восстановление жизнеспособности у обоих сортов земляники не превышало 55% (рис. 1). Однако жизнеспособность меристем во всех изучаемых методах были достаточно высокой для длительного хранения, так как регенерация превышала 40% – минимальный порог, требуемый для безопасного криохранения растительного материала [7].

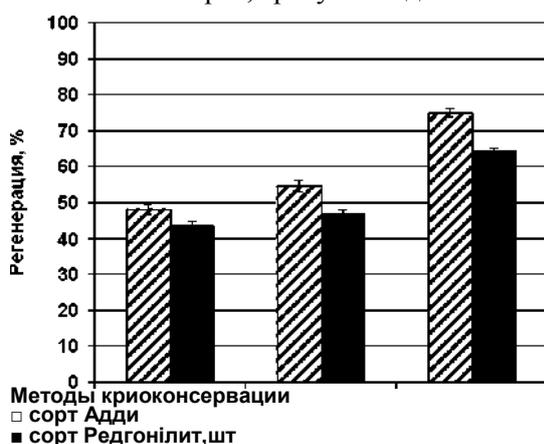


Рис. 1. Регенерация побегов земляники после криозамораживания различными методами (1 – витрификация с 5% ДМСО, 2 – витрификация с 0,3 М сахарозой, 3 – инкапсуляция-дегидратация)

На основе проведенных исследований для длительного хранения земляники применён оптимальный метод – инкапсуляции-дегидратации. На длительное криосохранение в дьюары с жидким азотом помещены меристемы 22 сортов земляники: Адди, Редгонтлит, Свит Чарли, Динамовка, Украинка, Заря, Зенга Зенгана, Кардинал, Трубадур, Жевел, Юни, Зенга Тигайга, Золушка, Надежда, Дочь Пурпуровой, Полли, Кохана, Фракунда, Sumos, Lord, Super Festion, Marilva Machat.

Криобирки с образцами сортов, сохранённых в жидком азоте, являются основой криогенной коллекции гермоплазмы земляники в Казахстане.

Выводы

Результаты исследований показывают, что генетические ресурсы земляники могут быть надёжно сохранены в жидком азоте, как резерв

полевой и *in vitro* коллекций. Все образцы заморожены оптимальным методом – инкапсуляции-дегидратации. Сохраненные двадцать два сорта земляники в дьюарах с жидким азотом – начало создания криогенной коллекции в Казахстане.

Список литературы

1. Высоцкая О.Н. Криосохранение меристем земляники садовой (*Fragaria x ananassa*) с помощью метода витрификации // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: Матер. VIII Международной конференции. Саратов, 9-13 сентября 2003 г. – Саратов, 2003. – С. 354-355.

2. Пат. 2220563 Российская Федерация, МПК⁷ А 01 Н 4/00 Способ криосохранения меристем, изолированных из земляники садовой (*Fragaria L.*) *in vitro* / Высоцкая О.Н., Попов А.С.; Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева. – № 2002113550/13; заявл. 24.05.2002, опублик. 10.01.2004, Бюл. № 1.
3. Dereuddre J., Scottez C., Arnaud Y., Duron M. Resistance of alginate-coated axillary shoot tips of pear tree (*Pyrus communis L.* cv. Beurre Hardy) *in vitro* plantlets to dehydration and subsequent freezing in liquid nitrogen // C. R. Acad. Sci. Paris. – 1990. – N 310. – P. 317-323.
4. Engelmann F., Gonzalez Arnao M.T., Wu Y., Escobar R.H. Development of Encapsulation Dehydration // Plant Cryopreservation: A Practical Guide / Reed B.M. (Ed). – New York: Springer Science + Business Media LLC, 2008. – P. 59-76.
5. Luo J., Reed B.M. Abscisic acid-responsive protein, bovine serum albumin, and proline pretreatments improve recovery of *in vitro* currant shoot-tip meristems and callus cryopreserved by vitrification // Cryobiology. – 1997. – N 34. – P. 240-250.
6. Matsumoto T., Sakai A. Cryopreservation of grape *in vitro*-cultured axillary shoot tips by three-step vitrification // Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current Research Progress and Application / Engelmann F., Takagi H. (Eds). – Rome: Japan International Research Center for Agricultural Sciences and International Plant Genetic Resources Institute, 2000. – P. 424-425.
7. Reed B. M. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants // CryoLetters. – 2001. – N 22. – P. 97-104.
8. Reed B.M. Cryopreservation of Temperate Berry Crops // Plant Cryopreservation: A Practical Guide. – New York: Springer Science + Business Media LLC, 2008. – P. 333-364.
9. Sakai A., Hirai D., Niino T. Development of PVS-Based Vitrification and Encapsulation-Vitrification Protocols // Plant Cryopreservation: A Practical Guide. – New York: Springer Science + Business Media LLC, 2008. – P. 33-58.

Рекомендовано к печати д.б.н. Митрофановой И.В.