

CRYOPRESERVATION OF PEAR MERISTEMATIC TISSUES

**Turdiyev T.T.¹, Frolov S.N.¹, Madiyeva G.A.¹, Rymkhanova N.K.²,
Kovalchuk I.Yu.¹**

¹*Institute of plant biology and biotechnology,
Almaty, Kazakhstan, Timiryazev str., 45, 050040*

²*Al-Farabi Kazakh National University,
Almaty, Kazakhstan, 71, Al-Farabi ave., 050040
turdievtt@mail.ru*

ABSTRACT

The southern and south-eastern regions of Kazakhstan have exceptionally favorable conditions for the cultivation of pear. However, in recent years, the areas occupied with this culture are gradually decreasing. Many foreign and domestic cultivars, valuable hybrids and local traditional cultivars of folk breeding carrying genes of high productivity and adaptability have been lost in the field genebanks (orchards and nurseries). It is necessary to study, collect and preserve valuable genotypes that have important economic and biological characteristics to restore and prevent further loss of the gene pool.

Conservation of plant genetic resources in the field is associated with significant financial costs for the care of plantations, as well as the risk of loss of cultivars due to disease, pests and adverse environmental factors. The most promising and effective approach to solve this problem is the cryopreservation of plant germplasm in liquid nitrogen.

Studies on optimization of cryopreservation protocols for pear meristematic tissues were carried out based on vitrification method with 0.3 M sucrose. It has been established that the viability of meristematic tissues after cryopreservation depends on the duration of hardening, the method of thawing, the type of cryoprotectant and genotype. Optimum duration of hardening by variable temperatures (8 h, 22°C, light 5.9 lx, then 16 h, -1°C, dark) is 3-4 weeks, and the best cryoprotectant in preparing apical meristems for cryopreservation is PVS2. An effective way for viability recovery is thawing in water at a temperature of +45°C, and then at +25°C followed by planting on a nutrient medium.

Keywords: pear, biotechnology, gene pool, genetic resources, meristematic tissues, cryopreservation, cryobank.

УДК 581.1.083:634.10.13.

КРИОСОХРАНЕНИЕ МЕРИСТЕМАТИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ ГРУШИ

**Турдиев Т.Т.¹, Фролов С.Н.¹, Мадиева Г.А.¹, Рымханова Н.К.²,
Ковальчук И.Ю.¹**

¹*Институт биологии и биотехнологии растений,
Алматы, Казахстан, ул.Тимирязева, 45, 050040*

²*Казахский национальный университет им. аль-Фараби,
Алматы, Казахстан, пр. аль-Фараби, 71, 050040
turdievtt@mail.ru*

АБСТРАКТ

В южных и юго-восточных регионах Казахстана сложились исключительно благоприятные условия для выращивания груши. Однако в последние годы занимаемые культурой площади постепенно сокращаются. В полевых генбанках (садах и питомниках) были утрачены многие зарубежные и отечественные сорта, ценные гибриды и местные стародавние сорта народной селекции, несущие гены высокой продуктивности и адаптивности. Для восстановления и предупреждения дальнейшей потери генофонда необходимо изучить, собрать и сохранить ценные генотипы, обладающие важными хозяйственно-биологическими признаками.

Сохранение генетических ресурсов растений в полевых условиях сопряжено со значительными финансовыми затратами по уходу за насаждениями, а также риском утраты сортообразцов в результате поражения болезнями, вредителями и неблагоприятными факторами среды произрастания. Наиболее перспективный и эффективный подход к решению этой проблемы – криоконсервация гермоплазмы растений в жидком азоте.

Проведены исследования по оптимизации протоколов криосохранения меристематических тканей груши на основе метода витрификации с 0,3М сахарозой. Установлено, что жизнеспособность меристематических тканей после криосохранения зависит от продолжительности закаливания, способа размораживания, вида криопротектора и генотипа. Оптимальной длительностью закаливания переменными температурами (8 час, 22°C, освещенность 5,9 lx, затем 16 час, -1°C, без освещения) являются 3-4 недели, а лучшим криопротектором при подготовке апикальных меристем к криоконсервации – PVS2. Эффективным способом восстановления жизнеспособности является размораживание в воде при температуре +45°C, а затем при +25°C с последующей посадкой на питательную среду.

Ключевые слова: груша, биотехнология, генофонд, генетические ресурсы, меристематические ткани, криоконсервация, криобанк.

ВВЕДЕНИЕ

Генетические ресурсы груши Казахстана представляют собой огромную научную и практическую ценность, включая дикорастущие виды и их уникальные формы, а также районированные сорта отечественной и зарубежной селекции, стародавние сорта народной селекции и гибридный материал. В последнее время утрачены многие сорта и гибриды груши, площади, занимаемые грушей, сокращаются. Одной из основных причин сокращения площадей является гибель саженцев груши при поражении болезнями, особенно бактериальным ожогом, а также вследствие повреждений заморозками.

Недостатки традиционных приемов сохранения генетических ресурсов обусловили необходимость разработки технологии сохранения генофонда с использованием биотехнологических методов, преимущества которых – экономия труда и площади культивирования, независимость от погодных условий и возможность длительного хранения в стерильных условиях. Наиболее перспективный и эффективный подход к решению этой проблемы – криоконсервация гермоплазмы растений в жидком азоте (-196°C). Использование этого метода позволяет неограниченно долго сохранять жизнеспособность и регенерационную способность растений, ограждает коллекции от воздействия экстремальных факторов среды, сводит к минимуму вероятность появления генетических изменений, требует меньших затрат по сравнению с традиционными методами, облегчает интродукцию растений из карантинных регионов, а также обеспечивает надёжный международный обмен [1]. В мире давно проводятся исследования по криоконсервации и хладохранению гермоплазмы и создаются криобанки растений. Чаще всего для криосохранения используют апикальные меристемы, изолированные из растений, культивируемых в условиях *in vitro* [2].

Для подготовки растений к глубокому замораживанию, их выращивают при низких температурах в течение одной или нескольких недель в условиях короткого светового дня, схожих с условиями зимнего сезона, как запуск природных механизмов устойчивости растений к низким температурам [3]. Применение предобработки закаливанием растений к холоду перед криоконсервацией приводит к значительному повышению жизнеспособности меристем после криосохранения [4]. Так, например, процент регенерации апексов 5 сортов яблони после 3 недель адаптации к холоду при 5°C возрос до 70-92% [5]. Адаптация к холоду малины в течение 1 недели в переменном режиме (8 часов день при +25°C и 16 часов ночь при -1°C) позволила повысить жизнеспособность меристем от 43% до 62-75% [6], а для некоторых сортов до 82% [7].

Для повышения жизнеспособности перед замораживанием используются различные смеси криопротекторов. В Японии группой Sakai разработана серия растворов-криопротекторов PVS (plant vitrification solution) [8], которые сейчас успешно применяются для криоконсервирования апексов более 200 видов растений [9]. Так, эмбриогенные ткани дикой вишни (*Prunus avium*L.) были успешно криоконсервированы с помощью раствора PVS2 [10]. А меристемы, изолированные из выращенных *in vitro*

побегов земляники (*Fragaria xananassa* Duch. cv.Redcoat) и проростков гороха (*Pisum sativum*L. cv. Century), обработанные криопротекторами, сохраняли жизнеспособность в жидком азоте с 1979 г. по 2007 г. [11].

Целью наших исследований являлась оптимизация протоколов криоконсервации гермоплазмы груши для обеспечения высокой степени выживаемости меристематических тканей при глубоком замораживании для создания криобанка дикорастущих видов, произрастающих в Казахстане, и наиболее ценных сортов и гибридов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований служили сорта и гибриды груши из коллекционных насаждений Помологического сада КазНИИ плодоводства и виноградарства. Асептические побеги размножали в течение 3 недель в светокультуральной комнате при 23-25°C, освещенности 25 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 16-часовом фотопериоде. Изучали влияние длительности закаливания пробирочных растений на восстановление роста криосохраненных меристем. Для этого через 3 недели растения помещали в климатическую камеру «Lab-Line Environette» при режиме: 8 час, 22°C, освещенность 5,9 lx, затем 16 час, -1°C, темнота. Длительность закаливания составляла 1-6 недель. Контролем служили неакклиматизированные побеги *in vitro*. После акклиматизации выделяли меристематические части побегов с 2-3 листовыми примордиями (в дальнейшем меристемы). Криосохранение проводили методами витрификации с 0,3М сахарозой и 5% ДМСО [12-14]. Для предобработки перед криосохранением испытывали влияние различных криопротекторов: PVS2 (30% глицерин+15% ЭГ+15% ДМСО+0,4М сахара); PVS3 (50% глицерин+50% сахара); PVS4 (35% глицерин+20% ЭГ+0,6М сахара) и раствор Towill (35% глицерин+10% ДМСО+10% ПЭГ-8000+0,4М сахара), а также криопротектор, состоящий из 50% глицерина и 50% глюкозы. С целью оптимизации режимов вывода растений груши из состояния глубокого замораживания и регенерации из них целых растений изучали влияние способов размораживания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация закаливания растений груши перед криоконсервацией

Известно, что предварительная адаптация к холоду растений приводит к запуску природных механизмов устойчивости растений к низким температурам [15, 16]. Способы и продолжительность акклиматизации к холоду играют исключительно большую роль при замораживании меристем в жидком азоте. Для предварительной акклиматизации растений используют как низкую положительную температуру (4-5°C), постоянную в течение всего периода акклиматизации [17], так и переменную в течение суток [18]. Поэтому для повышения эффективности криосохранения и подготовки меристематических клеток растений к воздействию сверхнизкой температуры оптимизировали этап закаливания к холоду.

Устанавливали способы и время акклиматизации асептических растений груши. Для чего испытывали влияние переменных, чередующихся температур 8 час+22°C и 16 час -1°C. Длительность акклиматизации варьировала от 1 до 6 недель. Контролем служили побеги *in vitro*, не прошедшие адаптацию к холоду. Меристемы замораживали методом витрификации с 0,3М сахарозой (рис. 1).

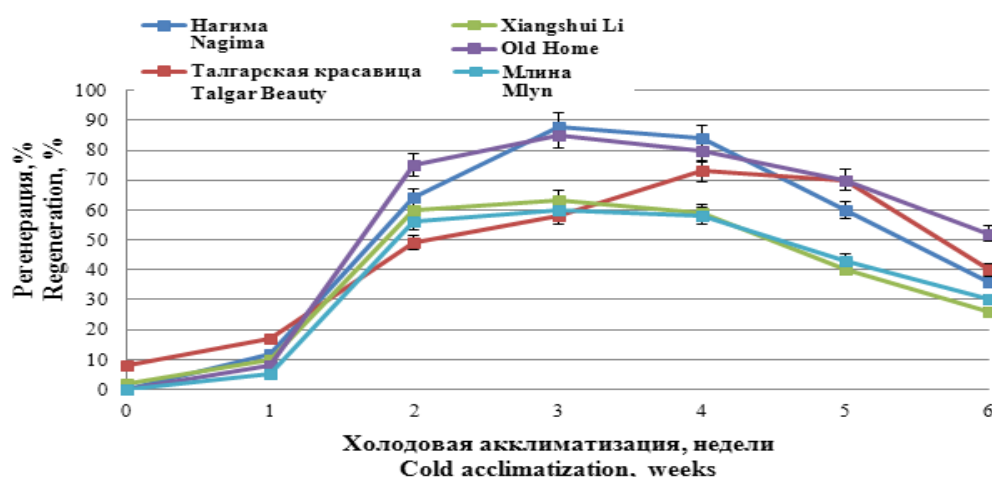


Рис. 1. Влияние времени акклиматизации на жизнеспособность меристем груши

Fig. 1. The effect of acclimatization time on the viability of pear meristems

Оценку жизнеспособности меристем груши после криосохранения проводили в конце каждого месяца, контролем служили меристемы, не подвергавшиеся замораживанию в жидком азоте.

Результаты экспериментов показали, что растительные ткани без предварительной акклиматизации после криоконсервации не выживают, закаливание в течение 1 недели приводит к выживаемости у сортов Нагима – 12%, Талгарская Красавица – 17%, XiangshuiLi – 10%, OldHome – 8%, Млина – 5%. Акклиматизация в течение 3 и 4 недель при переменной температуре повышает жизнеспособность меристем после криосохранения у сортов Нагима 88 и 84% соответственно, Талгарская Красавица – 79 и 73%, XiangshuiLi – 63,3 и 59%, OldHome – 85 и 80%, Млина – 60 и 58%. После 5-ти недель акклиматизации жизнеспособность меристем начинает снижаться (рис. 1).

Таким образом, установлено, что оптимальной длительностью закаливания растений груши переменными температурами перед криоконсервацией являются 3-4 недели.

Определение оптимального состава криопротектора для криоконсервации меристем груши в жидком азоте

Перед криоконсервацией меристематических тканей растений, для предотвращения разрушения клеток образующимися при замораживании кристаллами льда и осмотического шока, вызываемого повышенной концентрацией солей внутри клетки при удалении воды, применяют криопротекторы. Криопротекторы на этапах замораживания и размораживания максимально уменьшают повреждение клеток от осмотического и механического стресса [19]. В связи с этим для подбора оптимального состава криопротектора проводили эксперименты с известными криопротекторами PVS2, PVS3, PVS4 и раствором Towill (рис. 2).

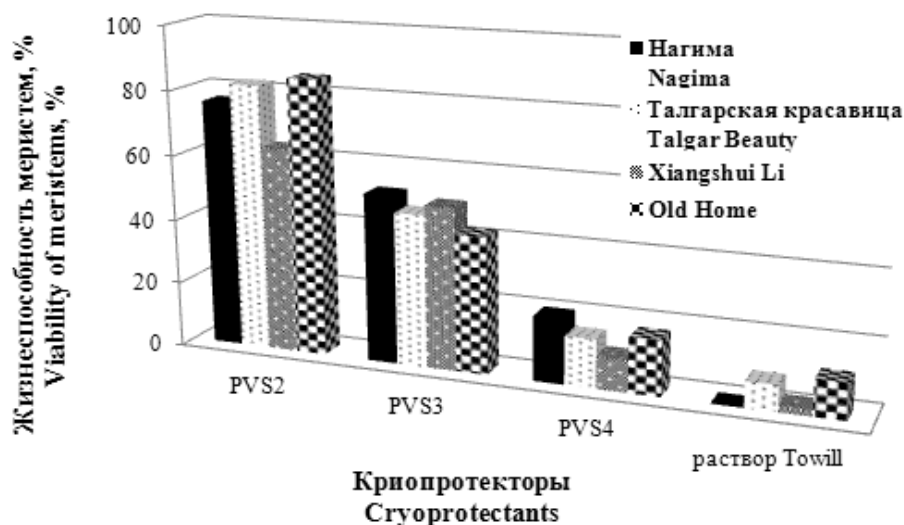


Рис. 2. Влияние предобработки криопротекторами при криоконсервации груши в жидком азоте

Fig. 2. The effect of pretreatments by cryoprotectants while cryopreservation of pear in liquid nitrogen

Результаты исследований показали, что при обработке раствором Towill выживаемость меристем груши очень низкая, они не выживают или регенерируют не более 11,0% (сорт OldHome). При обработке меристем криопротекторами PVS3 и PVS4 выживаемость несколько выше и максимально достигает 52,0% (сорта Нагима). После обработки криопротектором PVS2 достигнут максимальный уровень выживаемости, который для сортов Нагима составил 76,3%, Талгарская Красавица – 82,1%, XiangshuiLi – 63,3%, а для сорта OldHome – 85,0% (рис. 2).

Результаты исследований также показали, что жизнеспособность меристем груши после криосохранения зависела как от предобработки, так и от генотипа (рис. 3).

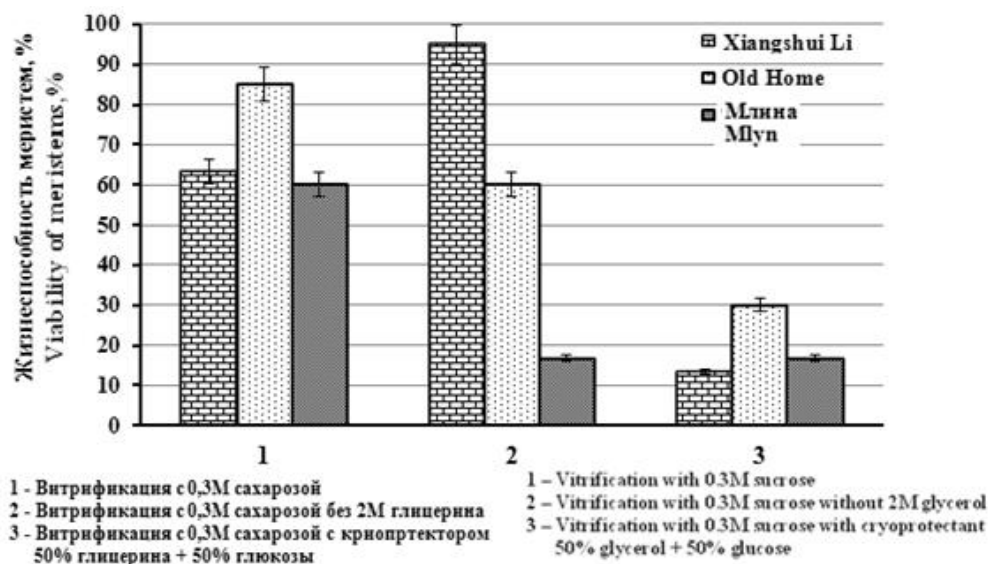


Рис. 3. Влияние предобработок на жизнеспособность криоконсервированных меристем груши

Fig. 3. The effect of pretreatments on the viability of cryopreserved pear meristems

Так, при криоконсервации методом витрификации с 0,3М сахарозой у груши сорта XiangshuiLi жизнеспособность меристематических тканей составляет 63,3%, у сорта OldHome – 85,0%, а у сорта Млина – 60,0%. При исключении обработки с 2М глицерином, жизнеспособность меристем сорта XiangshuiLi– 95,0%, у сорта OldHome – 60,0%, а у сорта Млина– 16,7%. Использование криопротектора 50% глицерина+50% глюкозы снижает жизнеспособность меристем после криосохранения у всех исследуемых сортов и составляет лишь 13,3-30,0% в зависимости от сорта.

С целью оптимизации режимов вывода меристематических тканей груши из состояния глубокого замораживания и регенерации из них целых растений проводили исследования по влиянию способов размораживания на жизнеспособность меристем, замороженных в жидком азоте (–196°C).

Исследования показали, что при использовании метода витрификации наиболее эффективным способом вывода меристем груши из состояния глубокого охлаждения оказалось размораживание в воде в течение 1мин. сначала при температуре +45°C, а затем при +25°C. Выживаемость меристем сорта Нагима составила 76,3%, Талгарская Красавица – 82,1%, Карындас и Любимица Клаппа – 95%. При оттаивании в воде температурой +45°C в течение 1 мин. регенерация тканей сорта Нагима и Любимица Клаппа составила 70%, Карындас – 65%. При оттаивании в воде при температуре +25°C в течение 1 мин. регенерация тканей снизилась до 25-45% в зависимости от генотипа. При размораживании в потоке стерильного воздуха в ламинар-боксе при температуре +25°C в течение 5 мин. выживаемость составила от 10 до 20%.

Данные наших исследований соответствуют результатам, полученным Chang Y. и др., где высокий процент жизнеспособности был получен при использовании раствора PVS2 для предобработки тропических культур, а использование этапа адаптации к холоду побегов груши приводило к повышению жизнеспособности меристем после криоконсервации [20, 21]. Для криосохранения меристематических тканей чёрной смородины, малины и мяты, также, как и в нашем эксперименте, чередование температуры при акклиматизации было более эффективным, по сравнению с постоянной низкой температурой [4, 7, 22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, оптимальной длительностью закаливания переменными температурами (8 час, 22°C, освещенность $7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, затем 16 час, –1°C, без освещения) для растений груши перед криоконсервацией являются 3-4 недели. Лучшим криопротектором при подготовке апикальных меристем к замораживанию в жидком азоте является PVS2. Эффективным способом восстановления развития меристем после

глубокого охлаждения является размораживание в воде в течение 1 мин. сначала при температуре +45°C, а затем при +25°C.

На основе проведённых исследований создан криобанк гермоплазмы груши с использованием метода витрификации с 0,3М сахарозой, состоящий из сортов и дикорастущих форм, отобранных с комплексом биологических и хозяйственно-ценных признаков (продуктивность+скороплодность+низкорослость+иммунность+адаптивность) и гибридных форм с максимальным уровнем выраженности селективируемого признака. Криогенная коллекция в настоящее время насчитывает 16 генотипов груши: Xiangshuidi, OldHome, Krylov, OHxF69, Млина, Айдана, Жаздык, Керим, Kieffer, Лесная Красавица, PaiLi, Млеевская Зимняя, Карындас, Moonglow и дикорастущие формы: груша Регеля (*Pyrus regelii* Rehder) и груша лесная (*Pyrus pyrastrer* L.).

Финансирование

Исследования проводились по бюджетной программе: 217 «Развитие науки», подпрограмме 102 «Грантовое финансирование научных исследований». По приоритету: «Наука о жизни», по подприоритету: «Научные основы повышения продуктивности и устойчивости растений и животных». По теме проекта: №2174/ГФ4 «Разработка биотехнологических регламентов сохранения гермоплазмы сортового и видового разнообразия груши для использования в селекционном процессе по созданию новых высокопродуктивных и устойчивых сортов».

ЛИТЕРАТУРА

1. Вержук В.Г., Филипенко Г.И., Сафина Г.Ф. и др. Криоконсервация—эффективный метод сохранения генетических ресурсов плодовых и ягодных культур // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2012. – Т. 169. – С. 270-279.
2. Benson E.E., Harding K. Cryopreservation of shoot tips and meristems: an overview of contemporary methodologies // Methods in molecular biology (Clifton, NJ). – 2012. – Vol. 877. – P. 191-226.
3. Angelo E., Iverson V.E. Studies on Some Factors Relating to Hardiness in the Strawberry // Univ. Minn. Agric. Sta., Tech. – 1939. – Vol. 101. – P. 473-497.
4. Ковальчук И.Ю., Турдиев Т.Т. Оптимизация методов криоконсервации гермоплазмы чёрной смородины (*Ribes nigrum* L.) // Биотехнология. Теория и практика. – 2010. – №2. – С. 54-60.
5. Zhao Y., Wu Y., Engelmann F., Zhong M., Chen S. Cryopreservation of apple *in vitro* shoot tips by the droplet freezing methods // CryoLetters. – 1999. – Vol. 20, №2. – P. 109-112.
6. Reed B.M. Responses to ABA and cold acclimation are genotype development for cryopreserved blackberry and raspberry meristems // Cryobiology. – 1993. – Vol. 30. – P. 179-184.
7. Kovalchuk I., Turdiev T., Kushnarenko S., Rakhimbaev I., Reed B. Cryopreservation of Raspberry Cultivars: Testing Techniques for Long-Term Storage of Kazakhstan's Plant Germplasm // The Asian and Australian Journal of Plant Science and Biotechnology: Global Science Books. – 2010. – №4. – P. 1-4.
8. Uragami A., Sakai A., Nagai M. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L grown in vitro // Plant Cell Report. – 1990. – №9. – P. 328-331.
9. Hirai D., Sakai A. Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of potato by encapsulation-vitrification // Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Eds. Engelmann F & Takagi H., JIRCAS, Tsukuba & IPGRI, Rome. – 2000. – P. 205-211.
10. March G., Boucaud M., Chmielarz P. Cryopreservation of *Prunus avium* L. embryogenic tissues // CryoLetters, c/o Royal Veterinary Co. – 2005. – №26. – P. 341-348.
11. Caswell K.L., Kartha K.K. Recovery of plants from pea and strawberry meristems cryopreserved for 28 years // CryoLetters, c/o University of Bedfordshire, Luton LU2 8DL. – 2009. – №30. – P. 41-46.
12. Niino T., Sakai A., Enomoto S., Magosi J., Kato S. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of mulberry by vitrification // Cryo-Letters. – 1992. – Vol.13. – P. 303-312.
13. Reed B.M. CIIA The Basics of *in vitro* storage and cryopreservation National Clonal Gemplasm Repository Corvallis // O.R. USA. – 2000. – 34 p.
14. Matsumoto T., Sakai A., Nako Y. A novel precutting for enhancing the survival of *in vitro* grown meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) cooled to –196°C by vitrification // CryoLetters. – 1998. – №19. – P. 27-36.

15. 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.
16. Höfer M. Cryopreservation of in Vitro Shoot Tips of Strawberry by the Vitrification Method—Establishment of a Duplicate Collection of Fragaria Germplasm // CryoLetters. – 2016. – Vol. 37, №3. – P. 163-172.
17. Paul H., Daigny G., Sangwan-Norreel B.S. Cryopreservation of apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification // Plant Cell Reports. – 2000. – Vol. 19. – P. 768-774.
18. Chang Y., Reed B.M. Extended Alternating-Temperature Cold Acclimation and Culture Duration Improve Pear Shoot Cryopreservation // Cryobiology. – 2000. – №40. – P. 311-322.
19. Dali T., Li Paul H. Classification of plant cell cryoprotectants // Journal Theoretical Biology. – 1986. – №123. – P. 305-310.
20. Chang Y., Reed B.M. Preculture conditions influence cold hardiness and regrowth of *Pyrus cordata* shoot tips after cryopreservation // HortScience. – 2001. – №36. – P. 1329-1333.
21. 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.
22. Senula A., Keller J., Sanduijav T., Yohannes T. Cryopreservation of cold acclimated mint explants using a simple vitrification protocol // CryoLetters. – 2007. – №28. – P. 1-12.

REFERENCES

1. Verzhuk V.G. Kriokonservatsiya – effektivnyy metod sokhraneniya geneticheskikh resursov plodovykh i yagodnykh kul'tur. *Trudy po prikladnoy botanike, genetike i seleksii*, 2012, vol. 169, ss. 270-279.
2. Benson E.E., Harding K. Cryopreservation of shoot tips and meristems: an overview of contemporary methodologies. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, 2012, vol. 877, pp. 191-226. doi: 10.1007/978-1-61779-818-4_16.
3. Angelo E., Iverson V.E. Studies on Some Factors Relating to Hardiness in the Strawberry. *Univ. Minn. Agric. Sta., Tech.*, 1939, vol. 101, pp. 473-497.
4. Kovalchuk I. Yu., Turdiyev T.T. Optimizatsiya metodov kriokonservatsii germoplazmy chornoy smorodiny (*Ribes nigrum* L.). *Biotekhnologiya. Teoriya i praktika*, 2010, no. 2, ss. 54-60.
5. Zhao Y., Wu Y., Engelmann F., Zhong M., Chen S. Cryopreservation of apple *in vitro* shoot tips by the droplet freezing methods. *CryoLetters*, 1999, vol. 20, no. 2, pp. 109-112.
6. Reed B.M. Responses to ABA and cold acclimation are genotype development for cryopreserved blackberry and raspberry meristems. *Cryobiology*, 1993, vol. 30, pp. 179-184.
7. Kovalchuk I., Turdiyev T., Kushnarenko S., Rakhimbaev I., Reed B. Cryopreservation of Raspberry Cultivars: Testing Techniques for Long-Term Storage of Kazakhstan's Plant Germplasm. *The Asian and Australian Journal of Plant Science and Biotechnology: Global Science Books*, 2010, no. 4, pp. 1-4.
8. Uragami A., Sakai A., Nagai M. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L grown in vitro. *Plant Cell Report*, 1990, no. 9, pp. 328-331.
9. Hirai D., Sakai A. Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of potato by encapsulation-vitrification // Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Eds. Engelmann F & Takagi H., JIRCAS, Tsukuba & IPGRI, Rome, 2000, pp. 205-211.
10. March G., Boucaud M., Chmielarz P. Cryopreservation of *Prunus avium* L. embryogenic tissues. *CryoLetters, c/o Royal Veterinary Co*, 2005, no. 26, pp. 341-348.
11. Caswell K.L., Kartha K.K. Recovery of plants from pea and strawberry meristems cryopreserved for 28 years. *CryoLetters, c/o University of Bedfordshire, Luton LU2 8DL*, 2009, no. 30, pp. 41-46.
12. Niino T., Sakai A., Enomoto S., Magosi J., Kato S. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of mulberry by vitrification. *Cryo-Letters*, 1992, vol. 13, pp. 303-312.
13. Reed B.M. CIIA The Basics of *in vitro* storage and cryopreservation National Clonal Gemplasm Repository Corvallis. O.R. USA, 2000, 34 p.
14. Matsumoto T., Sakai A., Nako Y. A novel precutting for enhancing the survival of *in vitro* grown meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) cooled to –196°C by vitrification. *CryoLetters*, 1998, no. 19, pp. 27-36.
15. 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, pp. 333-364.

16. Höfer M. Cryopreservation of in Vitro Shoot Tips of Strawberry by the Vitrification Method—Establishment of a Duplicate Collection of *Fragaria* Germplasm. *CryoLetters*, 2016, vol. 37, no. 3, pp. 163-172.
17. Paul H., Daigny G., Sangwan-Norreel B.S. Cryopreservation of apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification. *Plant Cell Reports*, 2000, vol. 19, pp. 768-774.
18. Chang Y., Reed B.M. Extended Alternating-Temperature Cold Acclimation and Culture Duration Improve Pear Shoot Cryopreservation. *Cryobiology*, 2000, no. 40, pp. 311-322.
19. Dali T., Li Paul H. Classification of plant cell cryoprotectants. *Journal Theoretical Biology*, 1986, no. 123, pp. 305-310.
20. Chang Y., Reed B.M. Preculture conditions influence cold hardiness and regrowth of *Pyrus cordata* shoot tips after cryopreservation. *HortScience*, 2001, no. 36, pp. 1329-1333.
21. 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, pp. 34-61.
22. Senula A., Keller J., Sanduijav T., Yohannes T. Cryopreservation of cold acclimated mint explants using a simple vitrification protocol. *CryoLetters*, 2007, no. 28, pp. 1-12.

АЛМҰРТТЫҢ МЕРИСТЕМАЛЫҚ ҰЛПАЛАРЫН КРИОСАҚТАУ

Турдиев Т.Т.¹, Фролов С.Н.¹, Мадиева Г.А.¹, Рымханова Н.К.²,
Ковальчук И.Ю.¹

¹Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы,
Алматы, Қазақстан, Тимирязев к-сі, 45, 050040

²әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті,
Алматы, Қазақстан, әл-Фараби данг., 72, 050040
turdievtt@mail.ru

ТҮЙІН

Қазақстанның оңтүстік және оңтүстік-шығыс аудандары алмұртты өсіруге ерекше қолайлы жағдайлар тудырады. Дегенмен соңғы жылдары осы дақылдың алқаптары біртіндеп азайып жатыр. Далалық генбанктерде (бау-бақшалар мен тәлімбақтарда) жоғары өнімділік пен бейімділікке не көптеген отандық сұрыптар, бағалы гибридтер мен халықтық сұрыптаудың жергілікті ежелгі сұрыптары жойылып кетті. Генқорын қайта қалпына келтіру және ары қарай жойылып кетпеуін ескерту мақсатында маңызды шаруашылық-биологиялық белгілері бар бағалы генотиптерді зерттеу, жинау және сақтау қажет.

Өсімдіктердің генетикалық ресурстарын далалық жағдайларда сақтау көшеттерді күтіп-баптауға байланысты едәуір қаржы шығындарымен, сондай-ақ сұрыптардың аурулармен, зиянкестермен және өсу ортасының қолайсыз жағдайларымен зақымдану нәтижесінде жойылу қаупімен түйіндесіп жатыр. Осы мәселені шешудің едәуір перспективті және тиімді әдісі сұйық азотта өсімдіктердің гермоплазмасын криосақтау болып табылады.

0,3М сахарозасы бар витрификация тәсілінің негізінде алмұрттың меристемалық ұлпаларын криосақтаудың хаттамаларын оңтайландыру бойынша зерттеулер жүргізілді. Меристемалық ұлпалардың криосақтаудан кейінгі өміршеңдігі шынықтырудың ұзақтығы, ерітудің тәсілі, криопротектор мен генотиптің түріне байланысты екені анықталды. Ауыспалы температурада (8 сағ, 22°C, жарық 5,9 lx, одан кейін 16 сағ, -1°C, қараңғы) шынықтырудың тиімді ұзақтығы 3-4 апта болып табылса, апикальды меристемаларды криосақтауға дайындау барысында ең жақсы криопротектор болып PVS2 болып табылды. Өміршеңдікті қалпына келтірудің оңтайлы тәсілі суда +45°C температурада еріту, содан кейін +25°C температурада қоректік ортаға кезекті отырғызу болып табылады.

Негізгі сөздер: алмұрт, биотехнология, генқоры, генетикалық ресурстар, меристемалық ұлпалар, криосақтау, криобанк.