Biotechnology. Theory and Practice/Биотехнология. Теория и практика.
2015, no. 2, pp. 35-41
DOI: 10.11134/btp.2.2015.4

УДК 635.21; 57.086.13

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ РЕГЛАМЕНТА КРИОКОНСЕРВАЦИИ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ ДЛЯ СОЗДАНИЯ КРИОБАНКА СОРТОВ И ГИБРИДОВ КАРТОФЕЛЯ

Кушнаренко С.В., Ромаданова Н.В., Бекебаева М.О., Матакова Г.Н.

Институт биологии и биотехнологии растений
ул. Тимирязева, 45, Алматы, 050040, Казахстан
svetlana_bio@mail.ru

АБСТРАКТ

Криоконсервация клеток, тканей и органов в жидком азоте при температуре –196°С широко используется в мировой практике для долгосрочного депонирования генетических ресурсов растений. Криоконсервация апикальных меристем особенно актуальна для сохранения вегетативно размножаемых культур, к которым относится картофель, поскольку позволяет после регенерации получить не только генетическую копию исходного материала, но и оздоровить растительный материал от бактериальных, грибных и вирусных патогенов. В настоящей статье приведены результаты усовершенствования регламента криоконсервации апикальных меристем картофеля на основе метода витрификации. Апикальные меристемы размером 1,5-2,0 мм выделяли из асептических растений, культивировали на среде Мурасиге-Скуга с добавлением 0,3 М сахарозы в течение 1 сут, затем обрабатывали последовательно в растворе 2М глицерина с 0,4 М сахарозой в течение 20 мин и растворе криопротектора PVS2 в течение 30 мин при комнатной температуре и погружали в жидкий азот. Выживаемость апикальных меристем картофеля после криоконсервации составляла, в зависимости от генотипа, от 43,1 до 59,8%. Разработанный протокол криоконсервации апикальных меристем используется для создания криогенного банка казахстанских и зарубежных сортов и гибридов картофеля.

Ключевые слова: картофель, криоконсервация, апикальные меристемы, метод PVS2-витрификации, криогенный банк.

IMPROVING SHOOT TIP CRYOPRESERVATION PROTOCOL TO SET UP A CRYOGENIC BANK FOR POTATO CULTIVARS AND HYBRIDS

Kushnarenko S.V., Romadanova N.V., Bekebaeva M.O., Matakova G.N.

Institute of Plant Biology and Biotechnology
45, Timiryazev str., Almaty, 050040, Kazakhstan
svetlana_bio@mail.ru

ABSTRACT

Cryopreservation of cells, tissues, and organs in liquid nitrogen at -196°C is widely practiced around the world for long-term conservation of plant genetic resources. Cryopreservation of shoot tips is particularly relevant for the conservation of vegetatively propagated crops including potatoes because liquid nitrogen exposure not only allows to obtain a genetic copy of the donor material, but also improves plants from pathogens like bacteria, fungi, and viruses. An effective cryopreservation protocol for potato shoot tips based on PVS2-vitrification is presented in this paper. About 1.5-2.0 mm long shoot tips dissected from plantlets, grown *in vitro*, were precultured for a day, on Murashige-Skoog medium supplemented with 0.3 M sucrose, in a plant growth room at 24°C and subjected to 16 h light/8 h dark photoperiod (light intensity of 25 μmol/m^2/s). Subsequently, the shoot tips were loaded in 2 M glycerol with 0.4 M sucrose for 20 min. After treatment in PVS2 cryoprotectant for 30 min at room temperature, shoot tips were immersed in liquid nitrogen. Recovery of shoot tips following cryopreservation in these conditions varied between 43.1 to 59.8% depending on the genotype. This elaborated protocol of shoot tips cryopreservation is recommended to set up a cryogenic bank in Kazakhstan for foreign potato cultivars and hybrids.

Keywords: potato, cryopreservation, shoot tips, PVS2-vitrification method, cryogenic bank.

Biotechnology. Theory and Practice/Биотехнология. Теория и практика.
2015, no. 2, pp. 35-41
DOI: 10.11134/btp.2.2015.4

ВВЕДЕНИЕ

В мировой практике для сохранения генофонда различных видов растений широко применяется метод криоконсервации или глубокого замораживания при сверхнизких температурах. В криобанках при температуре –196°С депонируют различные экспланты: апикальные меристемы, почки, семена, пыльцу, клеточные культуры [1]. Наибольший интерес для сохранения вегетативно размножаемых культур, к которым относится картофель, представляет криоконсервация апикальных меристем, т.к. после размораживания можно получить растения-регенеранты, являющиеся генетической копией исходного материала. Генетическая стабильность растений, регенерированных после процедуры замораживания-оттаивания, была доказана на основе методов ДНК-анализа с использованием различных типов ДНК-маркеров [2, 3].

Криоконсервация меристематических тканей позволяет не только надежно сохранить на длительное время сорта и гибриды картофеля, но, что не менее важно, получать при последующей регенерации освобожденные от фитопатогенов растения. Как было показано в публикациях последних лет, криотерапия является новым методом оздоровления растительного материала от вирусных, микоплазменных и бактериальных инфекций [4, 5].

Разработкой методов криоконсервации генетических ресурсов картофеля, одной из важнейших продовольственных культур, занимаются во многих исследовательских институтах мира: в Международном центре картофеля (International Potato Center), Перу [6]; Институте генетики растений и исследования культурных растений им. Г. Лейбница (Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research), Германия [7-9]; Всероссийском институте растениеводства им. Н.И. Вавилова, Россия [10]; Институте проблем криобиологии и криомедицины, Украина [11].

В Казахстане в Институте биологии и биотехнологии растений с 2002 года проводятся исследования по сохранению биоразнообразия *ex situ*, разработаны регламенты криоконсервации апикальных меристем многих плодовых и ягодных культур [12, 13], а с 2012 года начаты работы по криоконсервации гермоплазмы картофеля.

Для длительного депонирования апикальных меристем картофеля в жидком азоте используются различные методы криоконсервации: витрификации [8, 9], медленного программируемого замораживания [11], дроплет (капельное замораживание) [8, 10], дроплет-витрификации [10, 14, 15] и инкапсуляции-дегидратации [9].

Целью настоящей работы являлась разработка эффективного протокола криоконсервации апикальных меристем картофеля для создания в Казахстане криогенного банка гермоплазмы казахстанских и зарубежных сортов и гибридов этой важной сельскохозяйственной культуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Растительный материал

Материалом для исследования служили асептические растения *in vitro* 9 сортов и 2 гибридов картофеля (*Solanum tuberosum* L.): восемь сортов казахстанской селекции: Астана, Аул, Жолбарыс, Нартау, Нэрли, Союз, Тамыр и Шагалалы, один – российской (Хозяюшка); гибриды: 12-04-01 и 18-04-01. Асептические растения были введены в культуру *in vitro* из клубневого материала, предоставленного Казахским НИИ картофелеводства и овощеводства. Методика получения асептических растений картофеля подробно описана в статье Кушнаренко С.В. с соавт. [16].

Biotechnology. Theory and Practice/Биотехнология. Теория и практика.
2015, no. 2, pp. 35-41
DOI: 10.11134/btp.2.2015.4

Растения *in vitro* культивировали на среде Мурасиге-Скуга (МС) без регуляторов роста с добавлением 2 мг/л пантотената кальция, 3 г/л агара, 1,25 г/л джелрайта, 30 г/л сахарозы, pH 5,7 в светокультуральной комнате при температуре 24±1°С, освещенности 25 μмол•м-2•с-1, 16-часовом фотопериоде.

Криоконсервация апикальных меристем

Для криоконсервации апикальных меристем использовали метод витрификации, модифицированный нами для яблони [13, 17]. Апикальные меристемы (апексы побегов с 4-5 листовыми примордиями размером 1,5-2,0 мм) изолировали из растений *in vitro* в асептических условиях ламинар-бокса с использованием стереомикроскопа. Далее изолированные апикальные меристемы культивировали в течение 1 или 2 сут при комнатной температуре или при 8°С на среде МС, содержащей сахарозу в концентрации 0,3М, затем помещали в криопробирки с раствором 2М глицерина в 0,4 М сахарозе на 20 мин. На следующем этапе – при обработке раствором криопротектора оценивали влияние длительности экспозиции (от 20 до 80 мин) и температуры обработки (8°С и 24°С). Проводили сравнение эффекта двух криопротокторов: PVS2 (30% глицерина, 15% этиленгликоля, 15% диметилсульфоксида (ДМСО) в жидкой среде МС с 0,4 М сахарозой, pH 5,7) и витрификационного раствора, состоящего из этиленгликоля, сорбита и бычьего сывороточного альбумина (50:15:6 вес.%). После этого криопробирки погружали в жидкий азот. Оттаивание образцов проводили в водяной бане: 1 мин при 45°С, затем 1 мин при 25°С. Меристемы промывали в жидкой среде МС с 1,2М сахарозой и помещали на среду для восстановления роста: среда МС с добавлением 30 г/л сахарозы, 2 г/л агара,0,8 г/л джелрайта, pH 5,7. Неделю меристемы культивировали в темноте, затем переносили в светокультуральную комнату.

В каждом варианте эксперимента использовали 20 меристем. Эксперименты проводили в 3-х повторностях (20 х 3 = 60 меристем). Статистический анализ проводили общепринятыми методами [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Усовершенствование протокола криоконсервации апикальных меристем сортов и гибридов картофеля

Криоконсервация апикальных меристем представляет собой многоэтапный процесс, важной стадией которого является предварительная обработка меристематических тканей, для того, чтобы растительные клетки выдерживали последующую процедуру замораживания. Главная задача этого этапа состоит в удалении свободной воды из клеток и стабилизации клеточных мембран, для чего апикальные меристемы культивируют на питательных средах с добавлением осмотически активных соединений (сахароза, сорбит) или химических реагентов, таких как ДМСО [8, 10, 19].

Кроме того, для большинства растений умеренного климата эффективно закаливание пробирочных растений, которое проводится как при низких положительных температурах (+4°С … +5°С), так и при переменных в течение дня температурах (22°С, 8 час/–1°С, 16 час) [20, 13]. Все эти приемы значительно улучшают выживаемость апикальных меристем после глубокого замораживания.

Влияние закаливания асептических растений на жизнеспособность криосохраненных апикальных меристем

При разработке протокола криоконсервации апикальных меристем картофеля нами были проведены эксперименты по выяснению эффективности предварительного закаливания асептических растений. В статье Kaczmarczyk с соавт. показано

Biotechnology. Theory and Practice/Биотехнология. Теория и практика.
2015, no. 2, pp. 35-41
DOI: 10.11134/btp.2.2015.4

положительное влияние закаливания пробирочных растений картофеля при переменных температурах (22°C / 8°C) [21].

В наших экспериментах закаливание асептических растений картофеля проводили при температуре +6°C … +8°C и фотопериоде (8 час освещение/16 час темнота) в течение 1-5 недель. Контролем служили растения, не подвергавшиеся воздействию низких положительных температур. Из асептических растений, прошедших закаливание, изолировали апикальные меристемы размером 1,5-2,0 мм, обрабатывали криопротекторами и погружали в жидкий азот на 15-20 мин. После размораживания и промывания меристемы высаживали на среду для восстановления роста. В результате сравнения жизнеспособности апикальных меристем из закаленных и контрольных растений картофеля не было выявлено положительного влияния воздействия низких положительных температур.

Таким образом, для последующих экспериментов использовали апикальные меристемы, изолированные из пробирочных растений без закаливания.

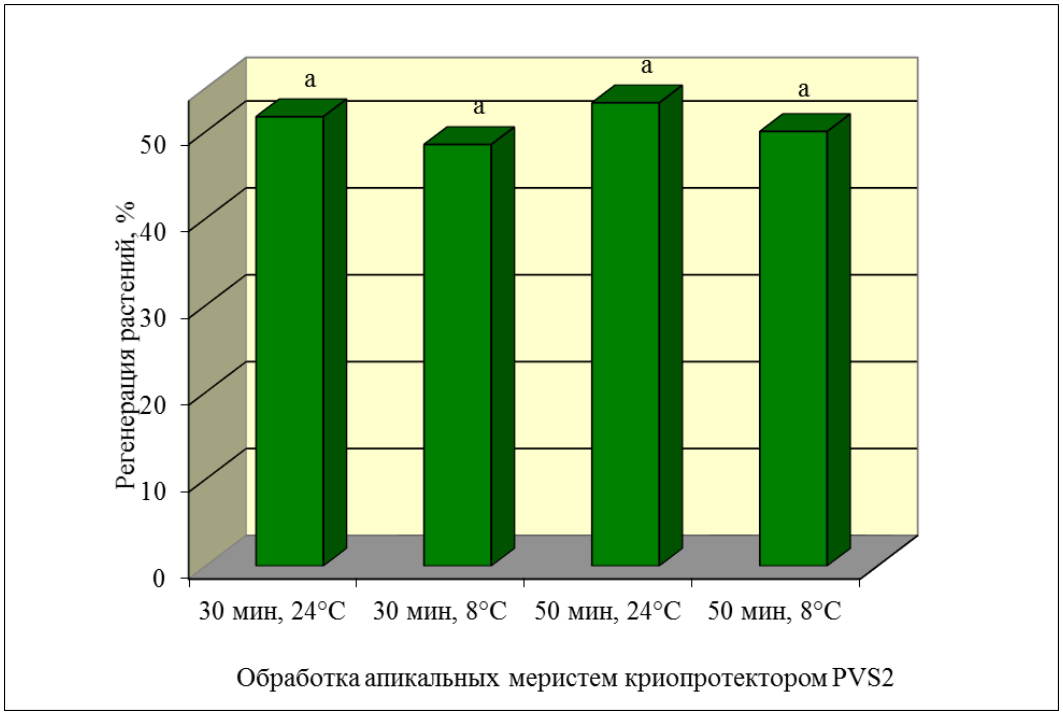
Влияние химических обработок апикальных меристем на их выживаемость после криосохранения

В дальнейших экспериментах был проведен подбор осмотиков, криопротекторов и химических реагентов для предобработки апикальных меристем. Проводили сравнение действия двух криопротекторов: PVS2 (глицерин: этиленгликоль: ДМСО (30:15:15 вес.%) [17] и витрификационного раствора, состоящего из этиленгликоля, сорбита и бычьего сывороточного альбумина (50:15:6 вес.%) [19]. Обработку криопротекторами проводили в различной экспозиции (20, 30, 40, 50 и 80 мин) при двух температурах: 8°C и 24°C. Также сравнивали эффект 5% ДМСО и различных концентраций сахарозы (0,06; 0,09 и 0,3 М), добавляемых в жидкую или агаризованную среду МС для предварительного культивирования изолированных апикальных меристем. Кроме того, изучали влияние обработки апикальных меристем раствором 0,4 М сахарозы и 2 М глицерина в среде МС. Апикальные меристемы изолировали из растений *in vitro* в асептических условиях ламинар-бокса. Далее апикальные меристемы подвергали последовательным обработкам: предварительное культивирование на среде с осмотиками, обработка осмотическими растворами и криопротекторами, погружение в жидкий азот, оттаивание, промывание осмотическими растворами, перенос на питательные среды для восстановления роста.

В результате проведенных экспериментов оптимизированы питательные среды для предварительного культивирования апикальных меристем: наиболее высокие результаты после криоконсервации апикальных меристем получены при предварительном культивировании на средах с 0,3 М сахарозой в течение 1 суток при комнатной температуре. Также выявлен положительный эффект обработки раствором 0,4 М сахарозы и 2 М глицерина в среде МС. Лучшим криопротектором оказался PVS2, с которым получались стабильные результаты по жизнеспособности апикальных меристем после глубокого замораживания. На рисунке 1 представлены данные по влиянию температуры и длительности обработки апикальных меристем картофеля криопротектором PVS2 на регенерацию побегов из криосохраненных меристем.

Не было выявлено достоверных различий между вариантами обработки меристем (рисунок 1). Для дальнейших экспериментов использовали 30 мин обработки криопротектором PVS2 при 24°C (рисунок 2).

Biotechnology. Theory and Practice/Биотехнология. Теория и практика.
2015, no. 2, pp. 35-41
DOI: 10.11134/btp.2.2015.4

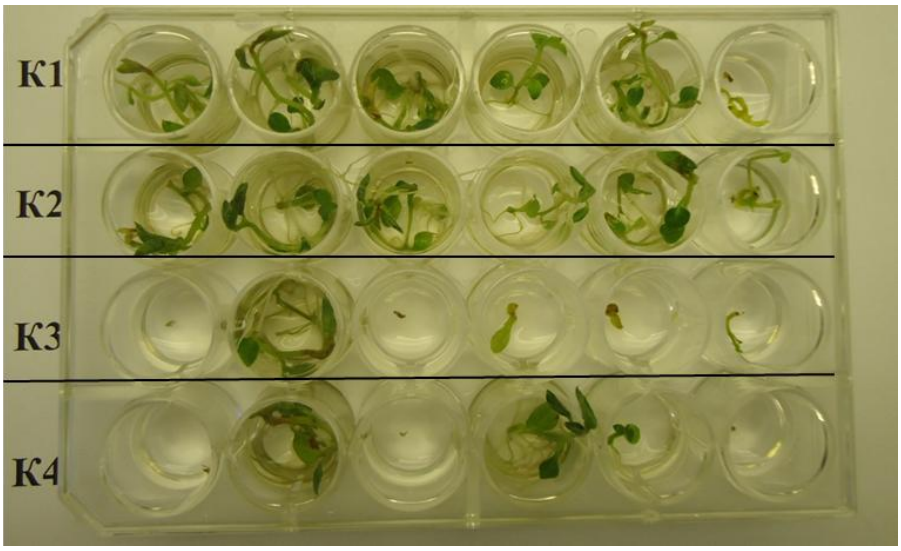


Различия между данными, обозначенными одинаковыми буквами, не достоверны при $p \leq 0,05$

Рис. 1. Влияние температуры и длительности обработки апикальных меристем криопротектором PVS2 на регенерацию растений из криосохраненных меристем картофеля гибрида 12-04-01

Means followed by the same letters are not significantly different ($p \leq 0.05$)

Fig. 1. Influence of temperature and duration during PVS2 treatment of 12-04-01 potato hybrid shoot tips on plantlet regrowth post cryopreservation



К1 – меристемы после культивирования на среде МС с 0,3 М сахарозой; К2 – после обработки 2 М глицерином и 0,4 М сахарозой; К3 – после обработки PVS2 в течение 30 мин при 24°С; К4 – после ЖА.

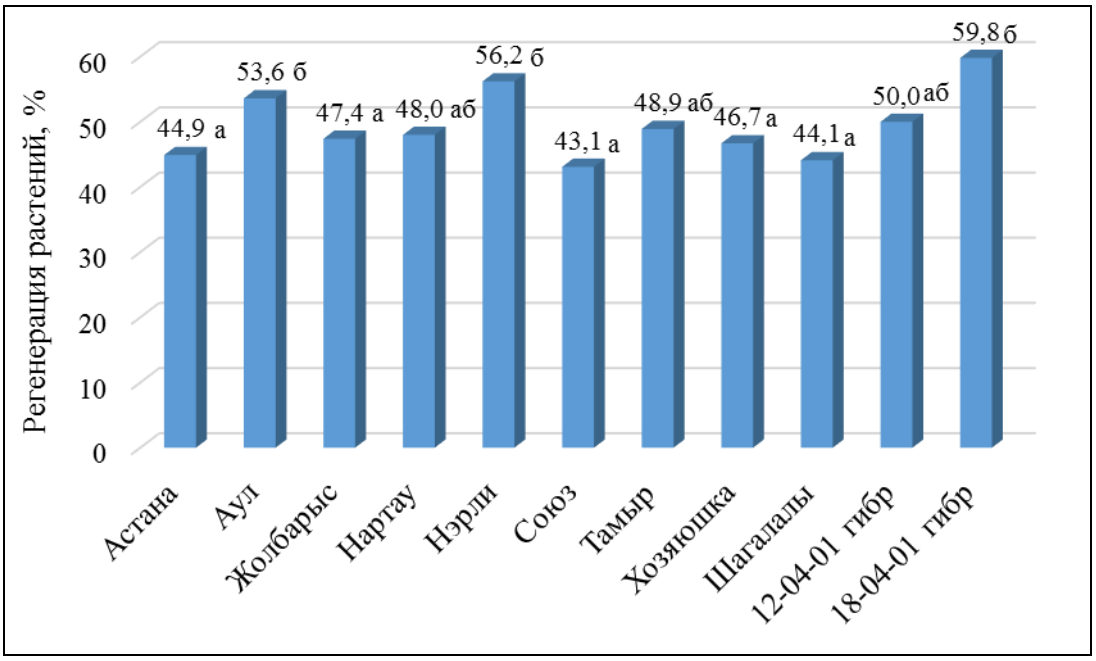
Рис. 2. Развитие апикальных меристем картофеля сорта Тамыр на полутвердой восстановительной среде МС (2 г/л агара и 0,8 г/л джелрайта, с добавлением 30 г/л сахарозы, pH 5,7)

K1 – shoot tips following preculture on MS medium with 0.3 M sucrose; K2 – after loading in 2 M glycerol with 0.4 M sucrose; K3 – after PVS2 treatment for 30 min at 24°C; K4 – after liquid nitrogen

Biotechnology. Theory and Practice/Биотехнология. Теория и практика.
2015, no. 2, pp. 35-41
DOI: 10.11134/btp.2.2015.4

Fig. 2. Regrowth of potato Tamyr cultivar shoots on semi-solid MS recovery medium (2 g/L agar and 0.8 g/L gelrite with 30 g/L sucrose, pH 5.7)

Для 9 сортов и 2 гибридов картофеля, используемых в исследованиях, выживаемость меристем после замораживания в ЖА составляла, в зависимости от генотипа, от 43,1 до 59,8% (рисунок 3). Наиболее высокий процент регенерации растений после криоконсервации наблюдали у гибрида 18-04-01 – 59,8%, наименьший у сорта Союз – 43,1%.



Данные, обозначенные разными буквами, достоверно отличаются при $p \leq 0,05$

Рис. 3. Регенерация растений сортов и гибридов картофеля после криоконсервации меристем с использованием усовершенствованного протокола витрификации (предварительное культивирование меристем на среде с 0,3 М сахарозой в течение 1 сут; обработка раствором 2 М глицерина в 0,4 М сахарозе 20 мин; обработка криопротектором PVS2 30 мин)

Means followed by different letters are significantly different ($p \leq 0.05$)

Fig. 3. Plantlet regrowth of potato cultivars and hybrids following cryopreservation of shoot tips by improved vitrification protocol (preculture of shoot tips on MS medium with 0.3 M sucrose for 1 day; loading in 2 M glycerol in 0.4 M sucrose for 20 min; PVS2 treatment for 30 min)

На рисунке 4 представлена схема усовершенствованного регламента криоконсервации апикальных меристем картофеля.

Сравнение полученных результатов с литературными данными дает основание говорить о том, что разработанный нами регламент криоконсервации апикальных меристем картофеля довольно эффективен. Так, в работе Keller с соавт. процент выживаемости меристем картофеля после криоконсервации методом витрификации находился в среднем в пределах 40% для использованных генотипов [19]. В статье Pantac соавт. разработан протокол криоконсервации апикальных меристем для 755 образцов культивируемых и диких видов картофеля из коллекции Международного центра картофеля (CIP), при этом средний процент регенерации после длительного замораживания составлял 51,3% [15]. Усовершенствованный нами регламент

Biotechnology. Theory and Practice/Биотехнология. Теория и практика.
2015, no. 2, pp. 35-41
DOI: 10.11134/btp.2.2015.4

криоконсервации позволяет получать в среднем 49,8% регенерации – достаточно высокий показатель для того, чтобы использовать этот протокол для создания криогенного банка.

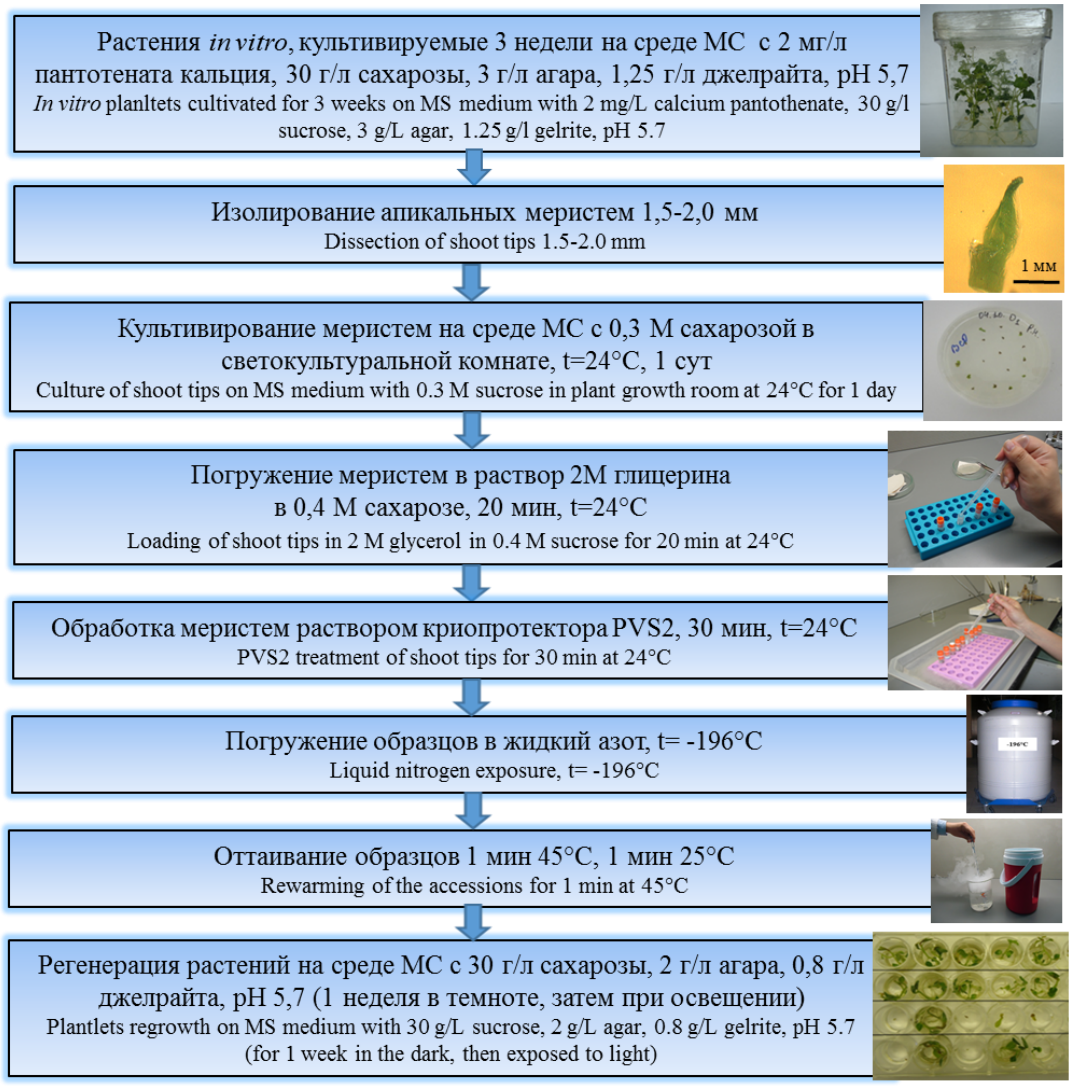


Рис. 4. Усовершенствованный регламент криоконсервации апикальных меристем картофеля методом PVS2-витрификации

Fig. 4. Improved protocol for potato shoot tips cryopreservation using PVS2-vitrification

Способ длительного замораживания апексов картофеля, предложенный в статье Магзумовой с соавт. [22], не может быть применен для создания криобанка вследствие очень низкой регенерации – от 3 до 15%. Кроме того, авторы использовали для криоконсервации апексы, выделенные не из асептических растений *in vitro*, а изолированные из проростков клубней. Такой подход может привести к высокой инфицированности и, как следствие, гибели криосохраненного материала.

Таким образом, для создания криобанка гермоплазмы сортов и гибридов картофеля может быть рекомендован усовершенствованный нами регламент криоконсервации на основе метода PVS2-витрификации.

ВЫВОДЫ

На основе метода PVS2-витрификации усовершенствован регламент криоконсервации апикальных меристем картофеля. Апикальные меристемы размером 1,5-2,0 мм выделяли из асептических растений, культивировали на среде МС с добавлением 0,3 М сахарозы в течение 1 сут, затем обрабатывали последовательно в растворе 2 М глицерина с 0,4 М сахарозой в течение 20 мин и растворе криопротектора PVS2 в течение 30 мин при комнатной температуре и погружали в жидкий азот. Выживаемость апикальных меристем сортов и гибридов картофеля после криоконсервации составляла, в зависимости от образца, от 43,1 до 59,8%.

Финансирование

Работа выполнена в рамках проекта 0047/ГФ «Создание криогенного банка гермоплазмы картофеля для надежного сохранения и эффективного использования генетических ресурсов в семеноводстве и селекционной практике Казахстана» по бюджетной программе 055 «Научная и/или научно-техническая деятельность», подпрограмма 101 «Грантовое финансирование научных исследований».

ЛИТЕРАТУРА

1. Plant Cryopreservation. A Practical Guide / Reed B.M. (Ed.). – Springer Science+ Business Media, LLC, 2008. – 513 p.

2. Wang B., Li J.W., Zhang Z.B., Wang R.R., Ma Y.L., Blystad D.R., Keller E.R.J., Wang Q.C. Three vitrification-based cryopreservation procedures cause different cryo-injures to potato shoot tips while all maintain genetic integrity in regenerants // Journal of Biotechnology. – 2014. – Vol. 184. – P. 47-55.

3. Harding K. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: A review // CryoLetters. – 2004. – Vol. 25. – P. 3-22.

4. Wang Q.C., Liu Y., Xie Y., YouM. Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of Potato leafroll virus (PLRV) and Potato virusY (PVY) // Potato Research. – 2006. – Vol. 49. – P. 119-129.

5. Wang Q., Valkonen J.P.T. Cryotherapy of the shoot tips: novel pathogen eradication method // Trends in Plant Science. – 2008. – Vol. 14. – P. 119-122.

6. Espinoza N., Estrada R., Tovar P., Bryan J., Dodds J.H. Tissue culture micropropagation, conservation, and export of potato germplasm. Specialized Technology Document I. – International Potato Center, Lima, Peru, 1986. – 20 p.

7. Mix-Wagner G., Schumacher H.M., Cross R.J. Recovery of potato apices after several years of storage in liquid nitrogen // CryoLetters. – 2003. – Vol. 24, №1. – P. 33-41.

8. Kryszczuk A., Keller J., Grübe M., Zimnoch-Guzowska E. Cryopreservation of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips using vitrification and droplet method // J. Food Agricult. Environm. – 2006. – Vol. 4. – P. 196-200.

9. Keller E.R.J., Senula A., Leunufna S., Grübe M. Slow growth storage and cryopreservation – tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections // Int. J. Refrig. – 2006. – Vol. 29. – P. 411-417.

10. Дунаева С.Е., Пендинен Г.И., Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А. Сохранение вегетативно размножаемых культур в *in vitro*- и криоколлекциях: метод. указания. – СПБ, 2011. – 72 с.

11. Стрибуль Т.Ф., Шевченко Н.А., Розанов Л.Ф. Изучение влияния холодового закаливания картофеля на сохранность меристем, криоконсервированных медленным замораживанием // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, №1. – С. 60-65.

12. Кушнаренко С.В., Ковальчук И.Ю., Ромаданова Н.В., Турдиев Т.Т., Рид Б.М., Рахимбаев И.Р. Криосохранение апикальных меристем плодовых и ягодных культур. Методические рекомендации. – Алматы, 2008. – 58 с.

13. Kushnarenko S.V., Romadanova N.V., Reed B.M. Cold acclimation improves regrowth of cryopreserved apple shoot tips // CryoLetters – 2009. – Vol. 30, №1. – P. 47-54.

14. Yi J.Y., Lee S.Y., Lee G.A., Jeong J.W., Cho J.H., Kim H.H. Improvement of the droplet-vitrification method for the cryopreservation of cultivated potato shoot tips // Kor. J. Breed. Sci. – 2012. – Vol. 44, №2. – P. 94-99.

15. Panta A., Pamis B., Ynouye C., Swennen R., Roca W., Tay D., Ellis D. Improved cryopreservation method for long-term conservation of the world potato germplasm collection // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2015. – Vol. 120. – P. 117-125.

16. Кушнаренко С.В., Ромаданова Н.В., Аралбаева М.М., Матакова Г.Н., Бекебаева М.О., Бабисекова Д.И. Создание коллекции асептических растений картофеля *in vitro* как исходного материала для криоконсервации // Биотехнология. Теория и практика. – 2013. – № 1. – С. 28-33.

17. Matsumoto T., Sakai A. Cryopreservation of grape *in vitro*-cultured axillary shoot-tips by three step vitrification / Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm // Engelmann F., Hiroko T. Ed. Int. Plant Genetics Resources Inst. – Rome, Italy, 2000. – P. 424-425.

18. Лакин Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для биол. спец. вузов. – М.: Высш. школа, 1990. – 352 с.

19. Keller E.R.J., Senula A., Kaczmarczyk A. Cryopreservation of herbaceous dicots // In: Plant Cryopreservation. A Practical Guide / Reed B.M. (ed.). – Springer Science+ Business Media, LLC, 2008. – P. 281-332.

20. Chang Y., Reed B.M. Extended alternating-temperature cold acclimation and culture duration improve pear shoot cryopreservation // Cryobiology. – 2000. – Vol. 40. – P. 311-322.

21. Kaczmarczyk A., Shvachko N., Lupysheva Y., Hajirezaei M.R., Keller E.R.J. Influence of alternative temperature preculture on cryopreservation results for potato shoot tips // Plant Cell Rep. – 2008. – Vol. 27. – P. 1551-1558.

22. Магзумова Г.К., Хусанбаева А.Н., Измаганбетова А.Ж., Какимжанова А.А. Оптимизация условий криосохранения образцов картофеля // Биотехнология. Теория и практика. – 2013. – №4. – С. 42-49.

REFERENCES

1. Plant Cryopreservation. A Practical Guide / Reed B.M. (ed.). Springer Science+ Business Media, LLC, 2008, 513 p.

2. Wang B., Li J.W., Zhang Z.B., Wang R.R., Ma Y.L., Blystad D.R., Keller E.R.J., Wang Q.C. Three vitrification-based cryopreservation procedures cause different cryo-injures to potato shoot tips while all maintain genetic integrity in regenerants. *Journal of Biotechnology*, 2014, vol. 184, pp. 47-55. doi: 10.1016/j.ibiotec.2014.04.021.

3. Harding K. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: A review. *CryoLetters*, 2004, vol. 25, pp. 3-22.

4. Wang Q.C., Liu Y., Xie Y., YouM. Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of *Potato leafroll virus* (PLRV) and *Potato virusY* (PVY). *Potato Research*, 2006, vol. 49, pp. 119-129. doi: 10.1007/s11540-006-9011-4.

5. Wang Q.C., Valkonen J.P.T. Cryotherapy of the shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends in Plant Science*, 2008, vol. 14, pp. 119-122. 19217342. doi: 10.1016/j.tplants.2008.11.010.

6. Espinoza N., Estrada R., Tovar P., Bryan J., Dodds J.H. *Tissue culture micropropagation, conservation, and export of potato germplasm. Specialized Technology Document I.* International Potato Center, Lima, Peru, 1986, 20 p.

7. Mix-Wagner G., Schumacher H.M., Cross R.J. Recovery of potato apices after several years of storage in liquid nitrogen. *CryoLetters*, 2003, vol. 24, no. 1, pp. 33-41. 12644851.

8. Kryszczuk A., Keller J., Grübe M., Zimnoch-Guzowska E. Cryopreservation of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips using vitrification and droplet method. *J. Food Agricult. Environm*, 2006, vol. 4, pp. 196-200.

9. Keller E.R.J., Senula A., Leunufna S., Grübe M. Slow growth storage and cryopreservation – tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections.*Int. J. Refrig*, 2006, vol. 29, pp. 411-417. doi: 10.1016/j.ijrefrig.2005.07.012.

10. Dunaeva S.E., Pendinen G.I., Antonova O.Yu., Shvachko N.A., Volkova N.N., GavrilenkoT.A. Sokhranenie vegetativno razmnozhaemykh kultur v in vitro- i kriokollektsiyakh [Preservation of vegetatively propagated cultures in vitro- and in cryocollections] Metodicheskie ukazania - Methodical Guidelines. SPB, 2011, 72 p.

11. Stribul T.F., Shevchenko N.A., Rozanov L.F. Izuchenie vliyaniya kholodovogo zakalivaniya kartofelya na sokhrannost meristem, kriokonservirovannykh medlennym zamorazhivaniem [Study of influence of potato cold acclimation on shoot tips viability cryopreserved by slow freezing]. *Problemy kriobiologii – Problems of Cryobiology*, 2006, vol. 16, no. 1, pp. 60-65.

12. Kushnarenko S.V., Kovalchuк I. Yu., Romadanova N.V., Turdiev T.T., Reed B.M., Rakhimbaev I.R. Kriosokhranenie apikalnykh meristem plodovykh i yagodnykh kultur. [Cryopreservation of shoot tips of fruit and berry cultures]. Metodicheskie rekomendatcii - Methodical Guidelines]. Almaty, 2008, 58 p.

13. Kushnarenko S.V., Romadanova N.V., Reed B.M. Cold acclimation improves regrowth of cryopreserved apple shoot tips. *CryoLetters*, 2009, vol. 30, no. 1, pp. 47-54.

14. Yi J.Y., Lee S.Y., Lee G.A., Jeong J.W., Cho J.H., Kim H.H. Improvement of the droplet-vitrification method for the cryopreservation of cultivated potato shoot tips. *Kor. J. Breed. Sci*., 2012, vol. 44, no. 2, pp. 94-99.

15. Panta A., Pamis B., Ynouye C., Swennen R., Roca W., Tay D., Ellis D. Improved cryopreservation method for long-term conservation of the world potato germplasm collection. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 2015, vol. 120, pp. 117-125. doi: 10.1007/s11240-014-0585-2.

16. Kushnarenko S.V., Romadanova N.V., Aralbaeva M.M., Matakova G.N., Bekebaeva M.O., Babisekova D.I. Sozdanie kollektcii asepticheskikh rasteniy kartofelya in vitro kak iskhodnogo materiala dlya kriokonservatcii [Establishment of in vitro collection of potato cultivars and hybrids as initial material for cryopreservation]. *Biotekhnologiya. Teoriya i praktika – Biotechnology. Theory and Practice*, 2013, no. 1, pp. 28-33. doi: 10.11134/btp.1.2013.6.

17. Matsumoto T., Sakai A. Cryopreservation of grape *in vitro*-cultured axillary shoot-tips by three step vitrification. *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. Engelmann F., Hiroko T. Ed. Int. Plant Genetics Resources Inst., Rome, Italy, 2000, pp. 424-425.

18. Lakin G.F. Biometriya: Uchebnoe posobie dlya boil. spetc. vuzov [Biometry: Textbook for biol. special. high school]. Moscow, High School Publ., 1990, 352 p.

19. Keller E.R.J., Senula A., Kaczmarczyk A. Cryopreservation of herbaceous dicots. *Plant Cryopreservation. A Practical Guide*. Reed B.M. (Ed.). Springer Science+ Business Media, LLC, 2008, pp. 281-332.

20. Chang Y., Reed B.M. Extended alternating-temperature cold acclimation and culture duration improve pear shoot cryopreservation. *Cryobiology*, 2000, vol. 40, pp. 311-322.

Biotechnology. Theory and Practice/Биотехнология. Теория и практика.
2015, no. 2, pp. 35-41
DOI: 10.11134/btp.2.2015.4

21. Kaczmarczyk A., Shvachko N., Lupysheva Y., Hajirezaei M.R., Keller E.R.J. Influence of alternative temperature preculture on cryopreservation results for potato shoot tips. *Plant Cell Rep*., 2008, vol. 2, pp. 1551-1558. doi: 10.1007/s00299-008-0574-1.

22. Magzumova G.K., Khusanbaeva A.N., Izmagambetova A.Zh., Kakimzhanova A.A. Optimizatciya uslovii kriosohraneniya obraztcov kartofelya [Optimization of cryopreservation conditions for potato accessions]. Biotekhnoloiya. Teoriya i praktika – Biotechnology. Theory and practice, 2013, no. 4, pp. 42-49. doi: 10.11134/btp.4.2013.6.

КАРТОП СОРТТАРЫ МЕН БУДАНДАРЫНЫҢ КРИОБАНКІН ҚҰРУ ҮШІН ҰШТЫҚ ТҮЗУШІ ҰЛПАЛАРДЫ КРИОСАҚТАУ РЕГЛАМЕНТІН ЖЕТІЛДІРУ

Кушнаренко С.В., Ромаданова Н.В., Бекебаева М.О., Матакова Г.Н.

Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты
Тимирязев к-сі, 45, Алматы, 050040, Қазақстан
svetlana_bio@mail.ru

Абстракт

Клеткаларды, ұлпаларды және мүшелерді сұйық азотта -196°С температурада криосақтау өсімдіктердің генетикалық ресурстарын ұзақ мерзімді сақтау үшін әлемдік тәжірибеде кеңінен қолданылады. Ұштық түзуші ұлпаларды криосақтау әсіресе оларға картоп та жататын, өсіп-өніп көбейетін дақылдар үшін өзекті, өйткені қалпына келгеннен кейін негізгі материалдың генетикалық көшірмесін алып қана қоймай, сонымен қатар өсімдік материалын бактериялық, саңырауқұлақтық және вирустық патогендерден сауықтыруға мүмкіндік береді. Осы мақалада витрификация әдісі негізінде картоптың ұштық түзуші ұлпаларын криосақтаудың регламентін жетілдіру нәтижелері келтірілген. Асептикалық өсімдіктерден 1,5-2,0 мм көлемінде ұштық түзуші ұлпалар бөлініп, 0,3 М сахароза қосылған Мурасиге-Скуг қоректік ортасында 1 тәулік өсірілді, одан кейін жүйелі түрде 0,4 М сахароза қосылған 2 М глицерин ерітіндісінде 20 мин және PVS2 криопротектор ерітіндісінде 30 мин бойы бөлме температурасында өңделіп, сұйық азотқа салынды. Криосақтаудан кейінгі картоптың ұштық түзуші ұлпаларының өміршеңдігі генотипіне қарай 43,1%-дан 59,8%-ға дейін болды. Ұштық түзуші ұлпаларды криосақтаудың әзірленген хаттамасы картоптың қазақстандық және шетелдік сорттары мен будандарының криогенді банкін құру үшін пайдаланылады.

Негізгі сөздер: картоп, криосақтау, ұштық түзуші ұлпалар, PVS2-витрификация әдісі, криогенді банк.