

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF AGRICULTURAL SCIENCES

ISSN 2224-526X

Volume 6, Number 24 (2014), 34 – 38

CRYOPRESERVATION OF MERISTEMS OF DIFFERENT PEAR VARIETIES

Zh. B. Zhumagulova¹, S. N. Frolov², G. A. Kampitova

¹Kazakh National Agrarian University, Almaty, Kazakhstan,

²Institute of Plant Biology and Biotechnology, Kazakhstan

Key words: meristems, cryoprotectants, regrowth, cold acclimation, liquid nitrogen, cryopreservation.

Abstract. The results of investigations are presented about cryopreservation of pear meristems. The optimal method of cryopreservation of meristems suitable for all pear varieties is a modified method of vitrification - vitrification with 0.3 M sucrose, glycerol 2M + cryoprotectant RVS3. On the restoration of growth meristems 3 and 4 week hardening variable temperature before freezing in liquid nitrogen is positively affected.

УДК 575.1:634.10.13

КРИОСОХРАНЕНИЕ МЕРИСТЕМ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ ГРУШИ

Ж. Б. Жумагулова¹, С.Н. Фролов², Г.А. Кампитова

¹Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан,

²Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: меристемы, криопротекторы, жизнеспособность, закаливание, жидкий азот, криосохранение.

Аннотация. Для определения оптимального метода криосохранения меристем были испытаны модифицированные методы витрификации: 0,3М сахароза, 2М глицерин + криопротектор PVS3, 0,3М сахароза + криопротектор PVS3, 5% ДМСО, а также метод инкапсуляции-дегидратации. Изучено влияние длительности закаливания пробирочных растений на восстановление роста криосохраненных меристем. Оптимальным методом криосохранения меристем груши, подходящим для всех сортов, являлся модифицированный метод витрификации – витрификация с 0,3М сахарозой, 2М глицерин + криопротектор PVS3. На восстановление роста меристем положительно повлияло 3 и 4 недельное закаливание переменной температурой перед замораживанием в жидком азоте.

Для создания устойчивых и высокопродуктивных сортов и подвоев, а также улучшения существующих необходимо сохранить генетические ресурсы. Традиционные способы сохранения генофонда имеют определенные недостатки: живые коллекции содержат лишь случайно представленную часть генома; возрастает риск переопыления с родственными видами, что может привести к утере специфичности генотипа; коллекции могут подвергаться действию неблагоприятных факторов; для содержания полевых генных банков необходима большая площадь земли и большие материальные затраты. Указанные недостатки обусловили необходимость разработки биотехнологических методов сохранения генофонда.

Наиболее эффективным методом сохранения растительных тканей является криосохранение, что позволяет неограниченно долго сохранять жизнеспособность, ограждает коллекции от экстремальных факторов, снижает вероятность генетических изменений, снижает затраты и облегчает интродукцию растений из карантинных регионов [1, 2]. Обычно для криосохранения

используют апикальные меристемы, что обеспечивает регенерацию точных генетических копий исходных растений [3].

В мире давно проводятся исследования по криоконсервации и хладохранению гермоплазмы и создаются криобанки растений. По данным ФАО функционируют 1750 генбанков, в которых содержится более 6 млн. образцов гермоплазмы. Около 90% из них сохраняется в виде семян при низких температурах, остальную часть составляют криогенные коллекции клеточных и тканевых культур [4]. При хранении растений *in vitro* возникает необходимость частого пассирования на свежую питательную среду, что повышает стоимость хранения и увеличивает риск инфицирования. Использование низких положительных температур и криоконсервация позволяет увеличить сроки хранения растительного материала *in vitro* [5, 6]. Для подготовки к криоконсервации используется акклиматизация растений в условиях, схожих с условиями зимнего сезона, как запуск природных механизмов устойчивости к низким температурам [7].

Методы исследования

Эксперименты проводили на сортах груши Нагима, Любимица Клаппа, Карындас, Талгарская Красавица, Лесная Красавица из коллекции Помологического сада КазНИИ плодоводства и виноградарства. Сравнение различных методов предобработки при криосохранении проводили для определения наиболее эффективного для наших условий генотипов и метода использования его при создании криобанка гермоплазмы.

Для проведения экспериментов асептические побеги в условиях *in vitro* размножали на модифицированных нами питательных средах в течение 3 недель в светокультуральной комнате при 23-25°C, освещенности 25 мкмол·м⁻²·с⁻¹, 16-ти часовом фотопериоде. Через 3 недели растения помещали на трехнедельную акклиматизацию холодом в климатическую камеру «Lab-Line Environette» при переменной температуре: 8 час при 22°C, освещенности 10 μmol m⁻²s⁻¹/ и 16 час при -1°C в темноте. Выделяли апикальные верхушки побегов с 2-3 листовыми примордиями, размером 0,8-1,0 мм. Затем меристемы на среде МС, содержащей 0,3М сахарозу, помещали на 48 часов в климакамеру с переменной температурой.

Результаты исследования

Для определения оптимального метода криосохранения груши испытаны метод витрификации, состоящих из 4х модификаций: 0,3М сахароза, 2М глицерин + криопротектор PVS3, 0,3М сахароза + криопротектор PVS3, 5% ДМСО, а также метод инкапсуляции-дегидратации.

Восстановление роста после криосохранения было лучше при использовании метода витрификации с 0,3М сахарозой, 2М глицерином. Для сорта Нагима жизнеспособность составила 88,5% (рисунок 1). Криоконсервация методами инкапсуляции и витрификации с 5% ДМСО была менее успешной и восстановление жизнеспособности у груши не всегда превышало 40%-ый минимальный рубеж регенерации, требуемой для безопасного хранения.

Полученные результаты свидетельствуют, что оптимальным методом криоконсервации меристем груши, подходящим для всех сортов, является модифицированный метод витрификации – витрификация с 0,3М сахарозой, 2М глицерином + криопротектор PVS3 (рисунок 2).

Для успешного криозамораживания меристем необходимо предварительное закаливание, которое используется для запуска природных механизмов устойчивости растений к холодной погоде (рисунок 3).

Из приведенного рисунка видно, что наблюдается одинаковая реакция при закаливании переменными температурами для груши сортов Нагима и Талгарская Красавица. На восстановление роста меристем положительно влияет 3 и 4 недельное закаливание переменной температурой перед замораживанием в жидком азоте. В этом случае жизнеспособность составляет у сорта Нагима 88 и 84%, у сорта Талгарская Красавица 79 и 73%. Не закаленные растения после замораживания в жидком азоте не выживают. Закаливание в течение 1 недели приводит к выживаемости 12% сорта Нагима, 17% сорта Талгарская Красавица. Постепенно, с возрастанием периода закаливания после 5 недель жизнеспособность меристем после криоконсервации начинает снижаться.

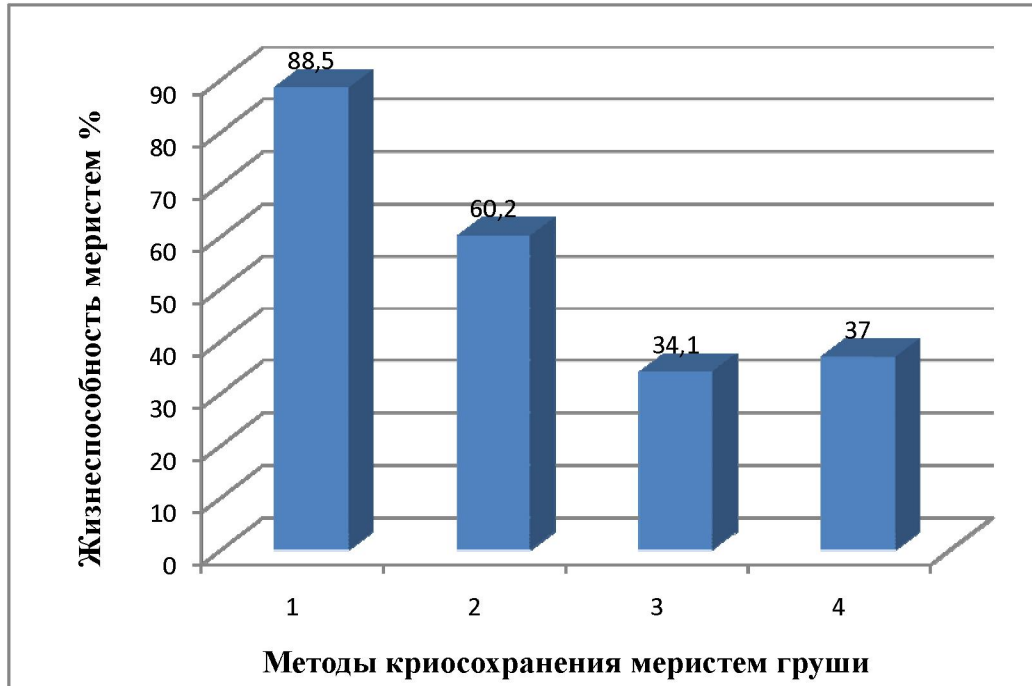


Рисунок 1 – Влияние методов криосохранения на жизнеспособность меристем груши (сорт Нагима). Методы криосохранения: 1 – витрификация с 0,3М сахарозой, 2М глицерином; 2 – витрификация с 0,3М сахарозой; 3 – витрификация с 5% ДМСО; 4 – инкапсуляция–дегидратация

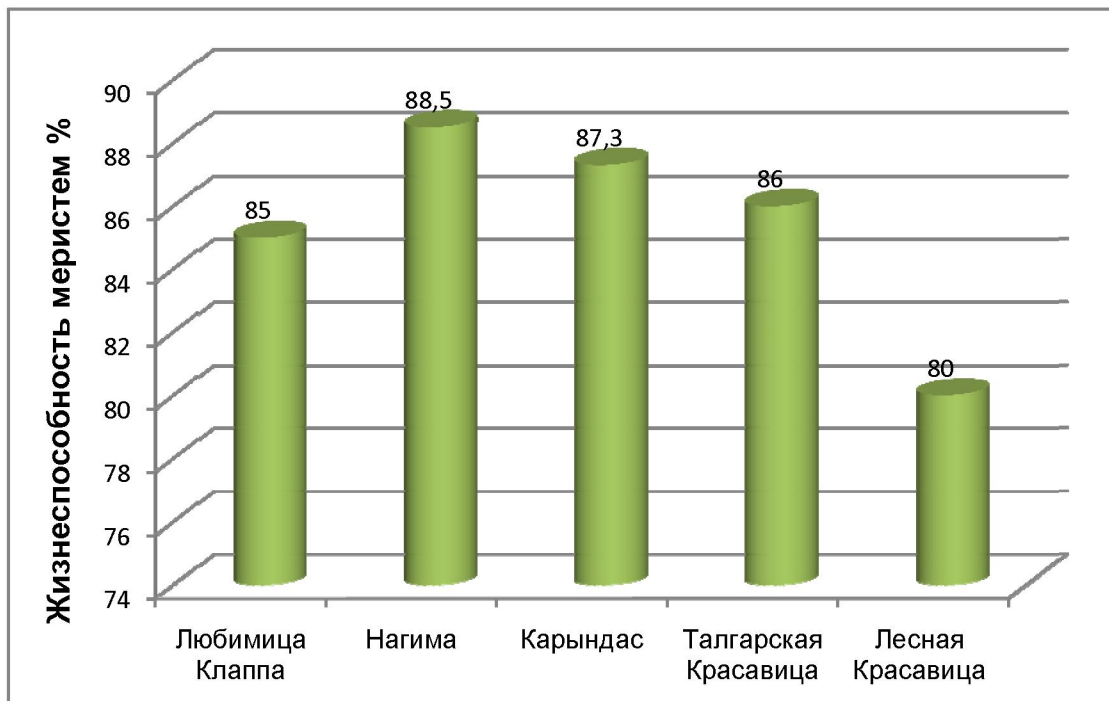


Рисунок 2 – Жизнеспособность меристем груши при витрификации с 0,3М сахарозой, 2М глицерином

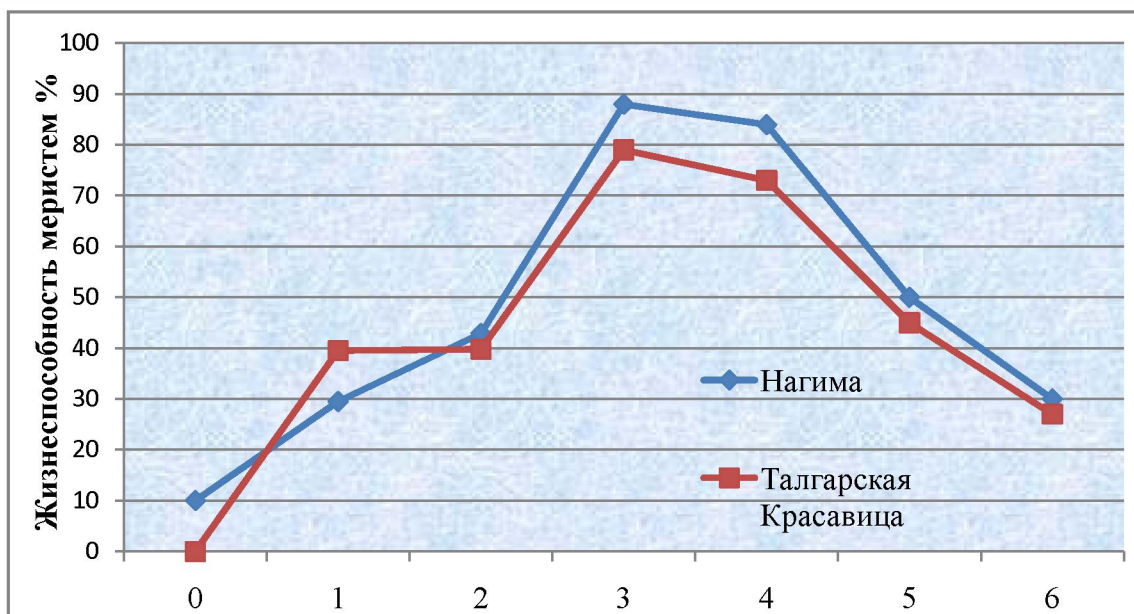


Рисунок 3 – Влияние продолжительности закаливания на регенерацию меристем группы при криоконсервации методом витрификации с PVS2 и 0,3М сахарозой

Таким образом, оптимальной длительностью закаливания переменными температурами для группы при криоконсервации является 3–4 недели.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Ковальчук И.Ю. Сохранение генофонда плодовых культур методом криоконсервации // Юбилейный сб. трудов КазНИИ пловодства и виноградарства. – Алматы, 2001. – Т. 16. – С. 29-34.
- [2] Kushnarenko S., Salnikov E., Nurtazin M., Mukhitdinova Z., Rakhimbaev I., Reed B.M. Characterization and Cryopreservation of *Malus sieversii* Seeds // The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology. – 2010. – Vol. 4. – P. 5-9.
- [3] Шевченко Н.А. Влияние криопротекторов и режимов криоконсервирования на сохранность меристемных тканей растений: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 2006. – 19 с.
- [4] Сафина Г.Ф. Влияние низких и сверхнизких температур на жизнеспособность семян плодовых и ягодных растений // Государственный научный центр РФ Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н. И. Вавилова РАСХН. – Санкт-Петербург, Россия, Вестник ВОГиС. – 2008. – № 4. – Т. 12. – С. 38-45.
- [5] Ковальчук И.Ю. Криосохранение гермоплазмы яблони методом замораживания спящих почек // Вестник НЦБ пищевой и перерабатывающей промышленности. – 2007. – № 2. – С. 33-35.
- [6] Chang Y., Reed B.M. Preculture conditions influence cold hardiness and regrowth of *Pyrus cordata* shoot tips after cryopreservation // 2001. – HortScience 36: 1329-1333).
- [7] Lynch P.T., Benson E.E., Harding K. Climate change: the role of ex situ and cryo-conservation in the future security of economically important, vegetatively propagated plants // J. Horticultural Science & Biotechnology. – 2007. – Vol. 82(2). – P. 157-160.

REFERENCES

- [1] Koval'chuk I.Ju. Sohranenie genofonda plodovyh kul'tur metodom kriokonservacii. Jubilejnyj sb. trudov KazNII plodovodstva i vinogradarstva. Almaty, 2001. T. 16. S. 29-34.
- [2] Kushnarenko S., Salnikov E., Nurtazin M., Mukhitdinova Z., Rakhimbaev I., Reed B.M. Characterization and Cryopreservation of *Malus sieversii* Seeds. The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology. 2010. Vol. 4. P. 5-9.
- [3] Shevchenko N.A. Vlijanie krioprotektorov i rezhimov kriokonservirovanija na sohrannost' meristemnyh tkanej rastenij: Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk Har'kov, 2006. 19 s.
- [4] Safina G.F. Vlijanie nizkih i sverhnizkih temperatur na zhiznesposobnost' semjan plodovyh i jagodnyh rastenij. Gosudarstvennyj nauchnyj centr RF Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij institut rastenievodstva im. N. I. Vavilova RASHN. Sankt-Peterburg, Rossija, Vestnik VOGiS. 2008. N 4. T. 12. S. 38-45.
- [5] Koval'chuk I.Ju. Kriosohranenie germoplazmy jabloni metodom zamorazhivaniya spjashhhih pochek. Vestnik NCB pishhevoj i pererabatyvajushhej promyshlennosti. 2007. N 2. S. 33-35.

[6] Chang Y., Reed B.M. Preculture conditions influence cold hardiness and regrowth of *Pyrus cordata* shoot tips after cryopreservation. 2001. HortScience 36: 1329-1333).

[7] Lynch P.T., Benson E.E., Harding K. Climate change: the role of ex situ and cryo-conservation in the future security of economically important, vegetatively propagated plants. J. Horticultural Science & Biotechnology. 2007. Vol. 82(2). P. 157-160.

АЛМҰРТ СОРТТАРЫНЫҢ МЕРИСТЕМАЛАРЫН КРИОСАҚТАУ

Ж. Б. Жұмағұлова¹, С. Н. Фролов², Г. А. Кәмшитова

¹Қазақ ұлттық аграрлық университеті, Алматы, Қазақстан,

²Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, Алматы, Қазақстан

Тірек сөздер: меристемалар, криопротекторлар, тіршілік қабілеттілігі, суыққа бейімдеу, сұйық азот, криосақтау.

Аннотация. Мақалада алмұрт сорттарының меристемаларын әртүрлі модификацияланған витрификация әдістері арқылы криосақтау зерттеу жұмыстарының нәтижелері көрсетілген. Барлық алмұрт сорттарының меристемаларын криосақтау әдістерінің ішінде – 0,3М сахароза, 2М глицерин және PVS3 криопротекторы қосылған витрификация әдісі қолайлы екендігі анықталды. Сұйық азотта меристемаларды мұздатпас бұрын, 3-4 апталық суыққа бейімдеу факторы меристемалардың қайта қалыпқа келуіне оң әсерін тигізді.

Поступила 20.11.2014