

УДК 581.1.083:634.10.13

И.Ю. Ковальчук\*, Т.Т. Турдиев, С.Н. Фролов, Г.А. Мадиева, Ж.Б. Жумагулова  
 Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы, Казахстан  
 \*e-mail: Kovalchuk\_i\_u@mail.ru

### Оптимизация условий криоконсервации изолированных меристем груши в жидком азоте

Определено влияние длительности закаливания пробирочных растений и способов размораживания на восстановление роста криосохраненных меристем груши. Оптимальным закаливанием является 3-4 недели с переменными температурой и освещенностью (8 час. 22°C, освещенность  $7 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , затем 16 час. -1°C, без освещения). Изучено влияние различных криопротекторов на жизнеспособность меристем после замораживания в жидком азоте. Лучшим для криосохранения изолированных меристем груши является криопротектор IBBR-1 (50% глицерин и 50% глюкоза). Разработан состав восстановительной питательной среды для регенерации *in vitro* криосохраненных меристем груши.

**Ключевые слова:** Криоконсервация, груша, меристема, криопротектор, акклиматизация.

I.Y. Kovalchuk, T.T. Turdiev, S.N. Frolov, G.A. Madiyeva, Zh.B. Zhumagulova

### Optimization of conditions for cryopreservation of isolated pear meristems in liquid nitrogen

The effect of the duration of hardening of test-tube plants and thawing methods on growth recovery of cryopreserved pear meristems was defined. Optimum hardening is 3-4 weeks with varying temperature and irradiance (8 h, at 22°C, with  $7 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  irradiance, followed 16 h at -1°C without irradiance). The effect of different cryoprotectants on the viability of meristems after freezing in liquid nitrogen was studied. The best cryoprotectant for cryopreservation of isolated pear meristems is IBBR-1 (50% glycerol and 50% glucose). Recovering nutrient medium composition for regeneration *in vitro* cryopreserved pear meristems was developed.

**Keywords:** Cryopreservation, pear, meristem, cryoprotectant, acclimation.

И.Ю. Ковальчук, Т.Т. Турдиев, С.Н. Фролов, Г.А. Мадиева, Ж.Б. Жумагулова

### Алмұрттың бөліп алынған меристемаларының криосақтау жағдайларын оптимизациялау

Криосақталған алмұрт меристемаларының қалпына келуіне пробиркалық өсімдіктерді суықпен өңдеу және еріту тәсілдерінің әсері зерттелді. Суықпен өңдеудің қолайлы жағдайлары 3-4 апта ауыспалы температурада және жарықта (8 сағ. 22°C, жарық  $7 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , одан кейін 16 сағ. -1°C, жарықсыз) өсіру болып табылады. Сұйық азотта мұздатылған меристемалардың тіршілік қабілетіне әр түрлі криопротекторлардың әсері зерттелді. Алмұрт меристемаларын криосақтауда ең қолайлы криопротектор IBBR-1 (50% глицерин және 50% глюкоза) болды. Алмұрттың *in vitro* криосақталған меристемаларының регенерациясы үшін қалпына келтіру қоректік ортасының құрамы тандалды.

**Түйін сөздер:** Криосақтау, алмұрт, меристема, криопротектор, акклиматизация.

Одна из стратегий сохранения генетического разнообразия *ex-situ* является создание банка гермоплазмы с использованием биотехнологических методов *in vitro*. Основными методами биотехнологического сохранения банка гермоплазмы для вегетативно размножаемых растений являются хранение (+4°C) и криоконсервация (-196°C). Разработанные за последнее время методы хранения и криоконсервации успешно применяются для многих видов растений во всем мире [1].

Представленные исследования были проведены для усовершенствования

биотехнологии криоконсервации изолированных апикальных меристем груши.

### Материалы и методы

Эксперименты проводили на сортах груши из коллекции Помологического сада КазНИИ плодоводства и виноградарства.

Асептические побеги размножали в течение 3 недель в светокультуральном помещении при 23-25°C, освещенности  $25 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 16-ти часовом фотопериоде. Изучали влияние длительности закаливания пробирочных растений на восстановление роста криосохраненных меристем. Для этого через 3 недели культивирования растения помещали в климатическую камеру «Lab-Line Environette» с

режимом: 8 час. 22°C, освещенность 7  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , затем 16 час. -1°C без освещения, длительность закаливания составляла от 1 до 6 недель или при +4°C, 8 часовом фотопериоде и освещенности 7  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  в течение 3 мес. Контролем служили не закаленные побеги *in vitro*.

После акклиматизации выделяли апексы побегов с меристематической частью и 2-3 листовыми примордиями (меристема), размером 0,8-1,0 мм которые помещали на среду МС с 0,3М сахарозой в климакамеру с переменной температурой на 48 часов. Криосохранение проводили методом витрификации с 0,3М сахарозой. Устанавливали эффективность замораживания в зависимости от состава криопротекторов, в качестве которых использовали серию растворов PVS: PVS2 (30% глицерин + 15% ЭГ + 15% ДМСО + 0,4М сахароза); PVS3 (50% глицерин + 50% сахароза); PVS4 (35% глицерин + 20% ЭГ + 0,6М сахароза); а также раствор Towill (35% глицерин + 10% ДМСО + 10% ПЭГ-8000 + 0,4М сахароза) и криопротектор IBBR-1 (50% глицерин + 50% глюкоза).

Для вывода тканей растений груши из состояния глубокого замораживания и регенерации из них целых растений изучали влияние различных способов размораживания на жизнеспособность криозамороженных меристем.

С целью оптимизации состава питательных сред для регенерации эксплантов в культуре *in vitro* изучали влияние гормонального состава сред на регенерационную способность груши после замораживания в жидком азоте. Исследования проводили на основе среды Мурасиге и Скуга (МС), с различным содержанием 6-бензиламинопурина (БАП),  $\beta$ -индолил-3-масляной кислоты (ИМК) и гибберелловой кислоты (ГК).

### Результаты и их обсуждение

*Определение продолжительности акклиматизации меристем груши для замораживания в жидком азоте.* Для успешного криозамораживания меристематических тканей необходимо предварительное закаливание (акклиматизация), которое используется для запуска природных механизмов устойчивости растений к холодной погоде [2]. Эксперименты

показали, что на регенерацию меристем положительно влияет

3-х и 4-х недельное закаливание переменной температурой и освещенностью (8 час. +22°C, освещенность 7  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , затем 16 час -1°C, без освещения). В этом случае жизнеспособность, в зависимости от числа недель закаливания, составляет у сорта Нагима 88,0 и 84,0%, у сорта Талгарская Красавица 79,0 и 73,0% соответственно. Жизнеспособность не закаленных растений после замораживания не превышает 8,0%. Закаливание в течение 1 недели приводит к выживаемости 12,0% меристем сорта Нагима и 17,0% меристем сорта Талгарская Красавица. Постепенно, с возрастанием периода закаливания через 5 недель жизнеспособность меристем после криоконсервации начинает снижаться (рисунок 1).



**Рисунок 1** – Влияние времени акклиматизации переменной температурой на жизнеспособность меристем груши, замороженных в жидком азоте

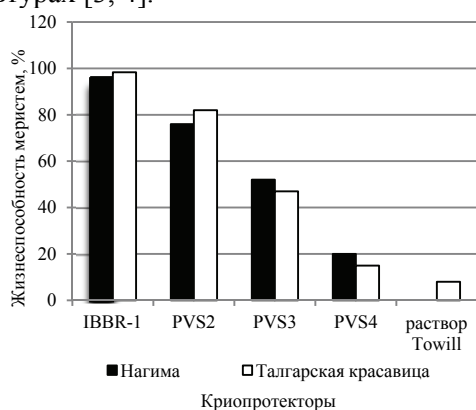
Закаливание при постоянной температуре (+4°C), 8 часовом фотопериоде и освещенности 7  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  менее эффективно, и у сорта Нагима составляет 58,0%, а у сорта Талгарская Красавица – 65,5%. Таким образом, оптимальным закаливанием груши для успешной криоконсервации является акклиматизация переменными температурами в течение 3-4 недель.

*Определение эффективных способов предобработки криопротекторами для замораживания меристем груши в жидком азоте.* Наибольшую опасность при замораживании растительных тканей представляет повреждение кристаллами льда и повышение концентрации остающихся внутри клетки солей, что приводит к денатурации

белка. Для предотвращения этих процессов применяют криопротекторы – вещества, которые максимально уменьшают повреждения клеток от осмотического и механического стрессов. При криоконсервации биологических объектов используются смеси различных криопротекторов. В частности, раствор PVS2 успешно применяется для криозамораживания апексов более 200 видов растений [3]. Главная задача предобработки – обезвоживание клеток и стабилизация клеточных мембран. Целью настоящих исследований являлся подбор криопротекторов при криоконсервации апикальных меристем груши, произрастающей в условиях предгорий Заилийского Алатау.

Исследования показали, что при предобработке меристем груши сортов Нагима и Талгарская Красавица криопротектором IBBR-1 регенерация у сортов Нагима составляет 96,1%, Талгарская Красавица – 98,3%. Предобработка криопротектором PVS-2 приводит к выживаемости 76 и 82% меристем, PVS-3 – к 52 и 47%, а PVS-4 – к 20 и 15%, соответственно. Обработка раствором Towill приводит к гибели сорта Нагима и 8% выживаемости сорта Талгарская Красавица (рисунок 2).

То есть наиболее эффективной при подготовке апикальных меристем груши к замораживанию в жидком азоте является обработка криопротекторами IBBR-1 или PVS2, что соответствует результатам, полученным в Японии и Казахстане на других культурах [3, 4].

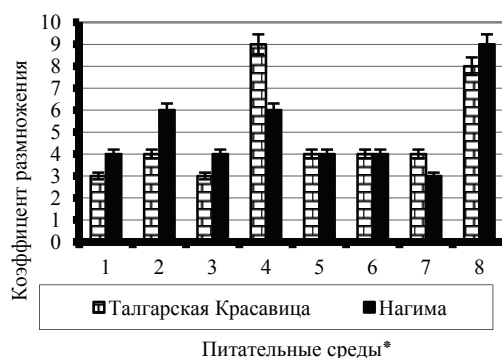


**Рисунок 2** – Влияние предобработки криопротекторами на жизнеспособность меристем груши, замороженных в жидком азоте методом витрификации

*Определение состава восстановительных питательных сред, оптимальных для регенерации эксплантов груши.* Одним из ключевых моментов в криоконсервации является подбор оптимальных сред для восстановления роста и последующего размножения в искусственных условиях. Испытывали различные концентрации регуляторов роста в среде МС (рисунок 3).

Исследования показали, что для регенерации эксплантов груши *in vitro* оптимальной является среда МС, содержащая 0, 6 мг/л БАП, 0, 1 мг/л ИМК, 0, 2 мг/л ГК.

*Оптимизация протоколов вывода тканей груши из состояния глубокого охлаждения и регенерации из них целых растений.* Исследования показали, что при использовании метода витрификации наиболее эффективным способом восстановления регенерационной способности меристем груши из состояния глубокого охлаждения является размораживание в воде в течение 1 мин. сначала при температуре +45°C, а затем при +25°C.



\* Среда МС: 1) 0, 5 БАП, 0, 1 ИМК; 2) 1, 0 БАП, 0, 1 ИМК, 0, 1 ГК; 3) 2, 0 БАП, 0, 1 ГК; 4) 0, 5 БАП; 5) 0, 5 БАП, 0, 01 ИМК, 0, 1 ГК; 6) 0, 5 БАП, 0, 5 ИМК, 0, 1 ГК; 7) 0, 5 БАП, 0, 25 ИМК, 0, 1 ГК; 8) 0, 6 БАП, 0, 1 ИМК, 0, 2 ГК

**Рисунок 3** – Оптимизация гормонального состава питательных сред МС для восстановления криосохранённых меристем груши в культуре *in vitro*, мг/л

Выживаемость меристем сортов Нагима составляет 98%, Талгарская Красавица – 95%. При оттаивании в воде с температурой +45°C в течение 1 мин. регенерация тканей сортов Нагима составляет 70%, Талгарская Красавица – 65%. При оттаивании в воде при температуре +25°C в течение 1 мин. регенерация тканей снижается до 25-45%. При размораживании в потоке стерильного воздуха при температуре

+25°C в течение 5 мин. выживаемость составляет от 10 до 20%. Для метода инкапсуляции-дегидратации лучший способ оттаивания – в потоке стерильного воздуха при температуре +25°C в течение 5 мин. Регенерация меристем сорта Нагима составила 97%, Талгарская Красавица – 90%.

В результате проведенных исследований оптимизированы условия криоконсервации изолированных меристематических тканей груши в жидком азоте (-196°C). Оптимальным закачиванием меристем груши является акклиматизация переменными температурами в

течение 3-4 недель. Эффективна для подготовки апикальных меристем груши к замораживанию в жидком азоте обработка криопротекторами IBBR-1 или PVS2. Для регенерации оптимальна среда МС, содержащая 0,6 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК, 0,2 мг/л ГК. При применении метода витрификации эффективно размораживать меристемы в воде в течение 1 мин. сначала при температуре +45°C, а затем при +25°C, при использовании метода инкапсуляции-дегидратации – в потоке стерильного воздуха при температуре +25°C в течение 5 мин.

### Литература

- 1 Reed B.M. Cryopreservation of Temperate Berry Crops // Plant Cryopreservation: A Practical Guide. – New York: Springer Science + Business Media LLC, 2008. – P. 333-364.
- 2 Chang Y., Reed B.M.. Extended cold acclimation and recovery medium alteration improve regrowth of *Rubus* shoot tips following cryopreservation // Cryo-Letters. – 1999. - № 20. – P. 371-376.
- 3 Hirai D., Sakai A. Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of potato by encapsulation-vitrification // Cryopreservation of tropical plant germplasm. – 2000. –V. 89. - P. 205-211.
- 4 Пат. 68746 Казахстан. Состав криопротектора для замораживания меристем черной смородины в жидком азоте / Турдиев Т.Т., Ковальчук И.Ю.; № гос. регистрации заявки 2010/0734.1 от 02.06.2010.