

Криосохранение гермоплазмы яблони в Казахстане

С.В. КУШНАРЕНКО, Н.В. РОМОДАНОВА

Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы, Казахстан

Cryopreservation of Apple-Tree Germ Plasma in Kazakhstan

S.V. KUSHNARENKO, N.V. ROMODANOVA

Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan

На территории Казахстана расположен один из центров происхождения культурной яблони [Вавилов, 1931]. Дикорастущие яблони, образующие естественные плодовые леса на склонах Заилийского и Джунгарского Алатау, отличаются исключительным разнообразием форм и обладают ценным комплексом хозяйственно-биологических признаков. В Казахстане произрастают три диких вида яблони: *Malus sieversii* (Leeb.) M. Roem. (Сиверса), *M. kirghisorum* Al. Et An. Theod. и *M. niedzwetzkyana* Dieck. (Недзвецкого), представляющих большую ценность для селекции, особенно при выведении засухо- и морозоустойчивых, устойчивых к заболеваниям и высоковитаминных сортов [Джангалиев и др., 2001]. К сожалению, в результате усиливающегося антропогенного воздействия происходит катастрофическое сокращение ареалов дикорастущих яблонь. Два из трех видов: яблоня Сиверса и яблоня Недзвецкого занесены в Красную книгу Казахстана.

В связи с этим нами начата разработка методов криоконсервации гермоплазмы яблони.

Для отобранных элитных форм, а также ценных гибридов и сортов яблони оптимизированы методы криосохранения апикальных меристем. Проведено сравнение эффективности трех методов: витрификации, инкапсуляции-дегидратации и медленного программируемого замораживания. Установлено, что наиболее подходящим и экономичным методом криосохранения апикальных меристем яблони является метод витрификации, включающий в себя несколько этапов, которые были нами оптимизированы. Апикальные меристемы (0,8–1,0 мм) выделяли из асептических растений, культивируемых на среде Мурасиге-Скуга (МС) с 0,5 мг/л бензиламинопурина (БАП) и 0,01 мг/л индолилмасляной кислоты и прошедших холодное закаливание в течение 3 недель. Изолированные меристемы культивировали на среде МС с 0,3 М сахарозой в течение 2 суток в условиях холодного закаливания, обрабатывали криопротектором PVS2 (80 мин при 0°C) и погружали в жидкий азот. Оттаивание меристем проводили в водяной бане: 1 мин при 45°C и 1 мин при 22°C. Регенерацию растений из криосохраненных меристем проводили на среде МС с 0,5 мг/л БАП.

Установлено, что одним из наиболее важных этапов криоконсервации меристем является холодное закаливание асептических побегов. Показано, что использование переменных в течение суток температур (8 ч при 22°C и освещении $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 16 ч при -1°C в темноте) по сравнению с постоянной температурой (4°C) повышало жизнеспособность криосохраненных меристем и регенерацию побегов с 45,8–52,5 до 58,1–79,5% у всех исследованных генотипов.

Для сохранения биоразнообразия диких яблонь проведен сбор семян из естественных мест их произрастания и проводится разработка методов их криоконсервации.

In the territory of Kazakhstan there is located one of the centres of origin of cultural apple-tree [Vavilov, 1931]. Wild apple-trees forming natural fruit forests on the flanks of Zailiysky and Dzhungarsky Alatau, are distinguished by the exclusive variety of forms and possess the valuable complex of economic-biological features. In Kazakhstan three wild apple-tree varieties grow: *Malus sieversii* (Leeb.), M. Roem (Sivers), *M. kirghisorum* Al. Et An. Theod. and *M. niedzwetzkyana* Dieck (Nedzvetski), representing a great value for the selection, especially at the raising of drought- and frost-resistant, resistant to the diseases and highly vitamin varieties (Dzangaliev et al., 2001). Unfortunately, in the result of strengthening anthropogenic effect there is catastrophic reduction of habitats of wild apple-trees. Two of three varieties: Sivers and Nedzvetski apple-trees are included into the Kazakhstan Red Book.

In this connection we started the development of the cryopreservation methods for apple-tree germ plasma.

For the selected elite forms as well as valuable hybrids and varieties of the apple-tree the methods of cryopreservation of apical meristems have been optimized. There were compared the efficiencies of three methods: vitrification, incapsulation-dehydration and slow programmable freezing. It has been established that the most appropriate and efficient cryopreservation method of apple-tree apical meristems is vitrification, including several stages which were optimized by us. Apical meristems (0.8–1.0 mm) were isolated from aseptic plants cultured in the medium Murashige-Skoog (MS) with 0.5 mg/l benzylaminopurine (BAP) and 0.01 mg/l indolebutyric acid (IBC) and underwent cold-hardening for 3 weeks. Isolated meristems were cultured in the MS medium with 0.3 sucrose for 2 days under cold-hardening, treated with PVS2 protectant (80 min at 0°C) and submerged into liquid nitrogen. The meristems were thawed on water bath: 1 min at 45°C and 1 min at 22°C. Regeneration of the plants from cryopreserved meristems was done on the MS medium with 0.5 mg/l BAP.

It has been established, that one of the most important cryopreservation stage for meristems is cold-hardening of aseptic sprouts. It was shown that use of variable within 24hrs temperatures (8 hrs at 22°C and illumination of $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 16 hrs at -1°C in dark) if compared with the constant temperature (4°C) increased the viability of cryopreserved meristems and regeneration of sprouts from 45.8–52.5% up to 58.1–79.5% in the studied gene types.

For biodiversity preservation of wild apple-trees the seeds from natural places of their growing were gathered and the methods of their cryopreservation are developed.