

Влияние криопротекторов и способов предобработок на жизнеспособность почек яблони при криоконсервации

*Б.Ж. Кабылбекова, И.Ю. Ковальчук,
Т.Т. Турдиев, З.Р. Мухитдинова*

Аннотация

В целях обеспечения долговременного хранения генетических ресурсов яблони, испытано влияние различных криопротекторов, а также способов и сроков предобработок на жизнеспособность спящих зимующих почек при криоконсервации в жидком азоте. Установлено, что применение криопротекторов PVS2 и 50% глицерин + 50% глюкоза повышает жизнеспособность почек яблони при замораживании в жидком азоте до 100 %. Лучшим способом является предобработка путём замачивания в криопротекторах на 3 часа после низкотемпературной акклиматизации. Результаты исследований могут использоваться при создании криобанков плодовых культур.

Ключевые слова: генетические ресурсы, криоконсервация, криопротектор, яблоня.

Введение

Казахстан является центром внутривидового разнообразия и одомашнивания яблони, где сосредоточены крупнейшие в мире ресурсы крабовых яблонь (*Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.) [1]. Сохранить эти генетические ресурсы в условиях расширения зон экологического бедствия и антропогенных действий - важная задача. Республика Казахстан ратифицировала Конвенцию о биологическом разнообразии 6 сентября 1994 г. Тем не менее, процесс сокращения популяций уникальных пород плодовых культур, а вследствие этого и сокращение генофонда до сих пор продолжается.

Для сохранения генофонда растений необходимо принять срочные меры, используя самые современные научные достижения и мировой опыт. Важной составной частью стратегии сохранения биоразнообразия растений является создание банка гермоплазмы с использованием биотехнологических методов. Для плодовых растений, размножаемых вегетативно, наиболее приемлемыми методами являются ограничение роста в условиях *in vitro* и криоконсервация изолированных тканей. Содержание коллекции таким путём менее затратно, чем поддержание в вегетирующем состоянии в садах.

Криосохранение – это метод глубокого замораживания и хранения растительного материала при сверхнизкой температуре в жидком азоте (-196°C). В настоящее время используются 3 основных метода: витрификация, инкапсуляция-дегидратация меристематических тканей и замораживание спящих зимующих почек. Используют также различные смешанные методы. Криоконсервация изолированных органов, тканей и клеток растений позволяет практически неограниченно долго сохранять их жизнеспособность и регенерационный потенциал без пассирования на свежую среду и одновременно снизить вероятность возникновения генетических изменений, возможных в пробирочной культуре при содержании в условиях положительных температурах [2, 3]. Кроме того, при необходимости из небольшого числа сохраняемых объектов в короткий срок можно получать большое число вегетативно размноженных *in vitro* растений [4, 5, 6]. Основные научные проблемы криобанка – разработка методов замораживания и восстановления жизнеспособности после криохранения, создание критериев оценки объектов, предназначенных к криоконсервации, и реинтродукция сохраненных видов в природу [7, 8, 9, 10].

Наиболее простым и менее затратным для плодовых культур

умеренного климата является метод замораживания спящих зимующих почек [11, 12]. Наиболее важным условием для успешной криоконсервации спящих почек является акклиматизация к холоду [13, 14, 15]. Другим фактором является влажность почек перед замораживанием. В частности, высокая выживаемость почек яблони может быть достигнута при влажности 25-30% [16]. Показано, что покоящиеся почки акклиматизированные к холоду при использовании метода контролируемого высушивания и медленного замораживания с последующим погружением в жидкий азот могут восстанавливать рост после криоконсервации с высоким процентом выживания (80-100%) [17].

Криогенная коллекция предназначена для решения проблемы долгосрочного хранения гермоплазмы вегетативно размножаемых растений. Большинство методов криоконсервации разработаны для одного или двух генотипов, однако не были применены для сохранения генетического разнообразия гермоплазмы больших коллекций. Для каждого отдельного генотипа в коллекции растений невозможно разработать технику криоконсервации, однако можно обеспечить успешную сохранность гермоплазмы, подобрав универсальный метод замораживания для большинства генотипов [18].

Материалы и методы исследования

Для проведения опытов по замораживанию спящих почек использовали модифицированную методику [19].

Растительные материалы. Зимующие почки сортов яблони Голден Делишес и Восход из коллекции Помологического сада Казахского НИИ плодоводства и виноградарства. Материал был собран после снижения температуры окружающей среды до -17°C (январь). Черенки нарезают длиной не более 12-15 см, имеющие 5-7 почек.

Подготовка к замораживанию: влажность образцов определяли на влагомере KERN MLB 50-3, затем помещали для высушивания в холодильную камеру с температурой 5°C , доводя исходную влажность (48-56%) до необходимой – 20-35%, после чего проводили опыты по оптимизации методов криосохранения.

а) Процедура замораживания: черенки нарезают на сегменты с одной почкой размером 2 см, расположенной в середине, и помещали в криовайлы (2-5 сегментов). Акклиматизацию черенков к низкой температуре проводили перед помещением в жидкий азот до или после обработки криопротекторами. Для этого постепенно в течение 7 суток снижали температуру с -5°C до -25°C . При температуре -25°C почки содержали 24 часа. Затем проводили различные опыты по замораживанию.

б) Обработка криопротекторами: испытывали влияние различных способов предобработок и влажности почек

яблони на эффективность замораживания. Влажность почек варьировала от 19,7 до 37,2%.

1. Контроль 1 (без холодной обработки)
2. Контроль 2 (с холодной обработкой, без криопротекторов)
3. PVS2 (замачивание 3 ч)
4. 50% глицерин + 50% глюкоза (замачивание 3 ч)
5. PVS2 (инъекция + замачивание 1 ч)
6. 50% глицерин + 50% глюкоза (инъекция + замачивание 1 ч)
7. PVS2 (прокачка через черенок* + замачивание 3 ч)
8. 50% глицерин + 50% глюкоза (прокачка через черенок + замачивание 3 ч).

в) Процедура восстановления жизнеспособности: Криовайлы вынимали из жидкого азота и переносили на 24 часа в помещение с температурой $+4^{\circ}\text{C}$. Сегменты с почками извлекали из пакетов и криовайлов, промывали дистиллированной водой и помещали в чашки Петри с водой в термостат на 24 часа. Жизнеспособность почек проверяли путём гистологического анализа и окулировки на подвой. Для стерилизации использовали HgCl_2 0,1% 5 мин, затем «АСЕ» или «Белизну» в разведении 1:1 в течение 3-5 мин.

Диагностика жизнеспособности криосохранённых в жидком азоте спящих, зимующих почек яблони. Тестирование жизнеспособности почек после криозамораживания проводили, используя свойства живых и погибших тканей окрашиваться в различные цвета.

Для окрашивания использовали 1% раствор 2, 3, 5-Triphenyltetrazolium chloride (ТТХ) [20]. Раствор 1% ТТХ готовили в 1/15М N₂HPO₄ и 1/15М KH₂PO₄ (Буфер Зеренса). Черенки с почками погружали в теплую воду (25-30°C) на сутки в термостат. Затем почки срезали с черенка и погружали в 1% ТТХ с буфером Зеренса (рН 7,0-7,2). Для лучшего проникновения раствора почки отделяли от наружных покровов, меристему оставляли с 3-5 примордиальными листьями. После чего погружали в раствор ТТХ на 24 час в полной темноте, так как на свету ТТХ разлагается. Все процедуры проделывали быстро, изучаемые почки и

приготовленные срезы оставляли в полной темноте. По цвету окрашенных меристематических тканей определяли жизнеспособность у размороженных почек. Продольные срезы меристемной ткани готовили вручную и просматривали и фотографировали под цифровым стереомикроскопом (National Optical & Scientific Instruments Inc., San Antonio, Texas, USA.).

Часть почек с камбиальной тканью тестировали на способность восстановления после глубокого замораживания методом восстановления на искусственной питательной среде.

Результаты исследования

Для проведения экспериментов и создания криогенной коллекции спящих почек яблони, в январе-феврале, после установления стабильно низкой температуры (от -8 до -10°C), проведен сбор черенков двух районированных сортов яблони – Восход и Голден Делишес.

Изучено влияние закаливания на жизнеспособность спящих, зимующих почек яблони при криоконсервации в жидком азоте. Была сравнена жизнеспособность обезвоженных до содержания влаги 37,2% и 19,7-23,3% закалённых (снижение температуры от -5°C до -25°C, 3°C в сутки) и не закалённых почек (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние закаливания на жизнеспособность почек яблони при криозамораживании

Сорт	Варианты	Влажность почек, %	Заморожено, шт	Погибло, шт	Жизнеспособность	
					шт	%
Голден Делишес	не закалённые	23,3%	5	5	0	0
	закалённые		9	4	5	55,5
	не закалённые	37,2%	5	3	2	40
	закалённые		5	3	2	40
Восход	не закалённые	19,7%	5	5	0	0

	закалённые		10	4	6	60
	не закалённые	37,1%	5	5	0	0
	закалённые		5	5	0	0

В результате было определено, что не адаптированные к холоду почки яблони, обезвоженные до 23,3-37,2% содержания влаги, при замораживании в жидком азоте погибают. На восстановление жизнеспособности замороженных почек существенное влияние оказывает низкотемпературное закаливание. При скорости закаливания 3°С в сутки с -5°С до -25°С, жизнеспособность частично обезвоженных почек при замораживании в жидком азоте повышается до 55,5-60%. Результаты эксперимента доказывают, что для успешного криозамораживания необходимо частичное обезвоживание почек и постепенное низкотемпературное закаливание.

Однако проведённые исследования показали, что частичное обезвоживание и предварительное закаливание не гарантирует достаточно высокую степень выживаемости почек при

замораживании в жидком азоте приведённых в работах российских ученых [21]. В связи с этим нами проведён ряд экспериментов по установлению влияния различных предобработок на повышение выживаемости тканей.

Для подготовки спящих зимующих почек к криоконсервации изучено влияние криопротекторов на жизнеспособность почек при замораживании в жидком азоте. Была установлена эффективность замораживания в зависимости от состава криопротекторов (PVS2 и криопротектор 50% глицерина и 50% глюкозы), способа предобработки (замачивание в криопротекторе в течение 3 час и инъекция криопротектором в почку, прокачивание криопротектора по сосудам черенка с почками) и сроков предобработки криопротекторами (до закаливания или после закаливания от -5°С до -25°С) (рис. 1- 4).

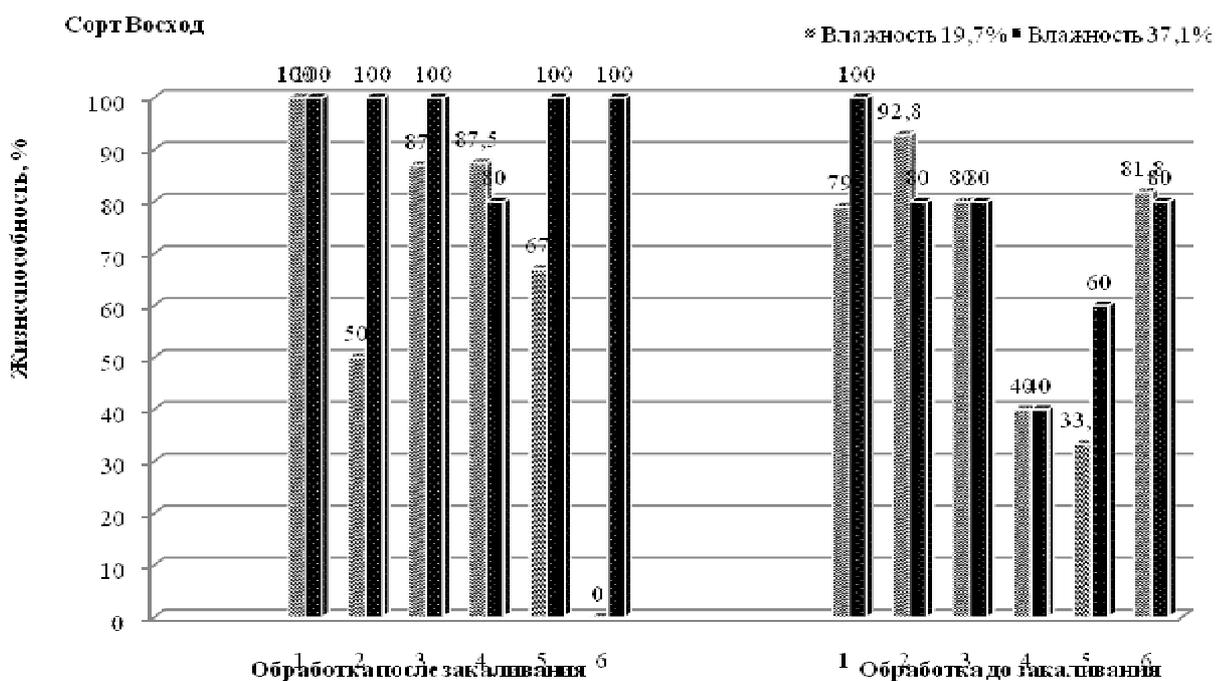


Рисунок 1 – Влияние способов предобработки различными криопротекторами и содержания влаги на эффективность замораживания почек яблони Восход

Предобработка: 1 – PVS2 (замачивание 3 ч); 2 – 50% глицерин + 50% глюкоза (замачивание 3 ч); 3 – PVS2 (инъекция + замачивание 1 ч); 4 – 50% глицерин + 50% глюкоза (инъекция + замачивание 1 ч); 5 – PVS2 (прокачка + замачивание 3 ч); 6 – 50% глицерин + 50% глюкоза (прокачка + замачивание 3 ч)

На рисунке 2 и 4 представлены почки, окрашенные в различные цвета в зависимости от жизнеспособности тканей после криозамораживания. Живые ткани почек – меристема,

примордиальные листья, клетки прокамбиального слоя были интенсивно окрашены в карминно-красный цвет (а, б), а погибшие ткани в коричневый (б, в).

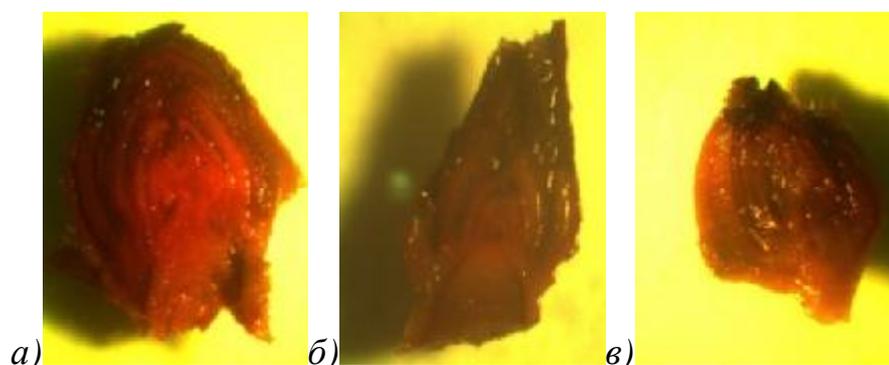


Рисунок 2 – Оценка жизнеспособности замороженных в жидком азоте почек яблони сорта Восход методом окрашивания живых тканей (влажность 19,7%)

а) живые; б) частично погибшие; в) погибшие

Представленные результаты показывают, что при замораживании в жидком азоте почки яблони обоих сортов с различной влажностью и обработанные криопротекторами выживают. Применение криопротекторов повышает жизнеспособность почек. У яблони сорта Восход лучшие результаты были получены при обработке криопротекторами после закаливания и содержания 37,1% влаги в почках. При обработке до закаливания с различными процентами влажности показатели были средние и жизнеспособность почек была не выше 33,2%. При 37,1% влажности почек обработка криопротекторами после закаливания способствовала 100% выживанию почек в вариантах 1, 2, 3, 5 и 6, а в опытах по обработке до закаливания в варианте 1. При 19,7% влажности почек предобработка криопротектором PVS2 путём замачивания на 3 часа, проведённого после низкотемпературного закаливания, жизнеспособность составила 100%.

Также 3-часовое замачивание в 50% глицерин + 50% глюкоза до закаливания сохранило жизнеспособность на 92,8%. В наших исследованиях в среднем, при различных обработках криопротектором PVS2 (замачивание на 3 часа, инъекция и прокачка с последующим замачиванием) сохранили жизнеспособность 82,2% спящих зимующих почек, а криопротектором 50% глицерин + 50% глюкоза – 69,3%. Также, содержание влаги в почках оказало влияние на их жизнеспособность, средний показатель жизнеспособности при 37,1% влажности составил – 85%, а при 19,7% – 66,5%. Меристематическая часть почки погибала при прокачке криопротекторо 50% глицерин + 50% глюкоза с последующим замачиванием на 3 часа. При определении жизнеспособности отмечено живые, частично живые и полностью погибшие почки (рис. 2,4).

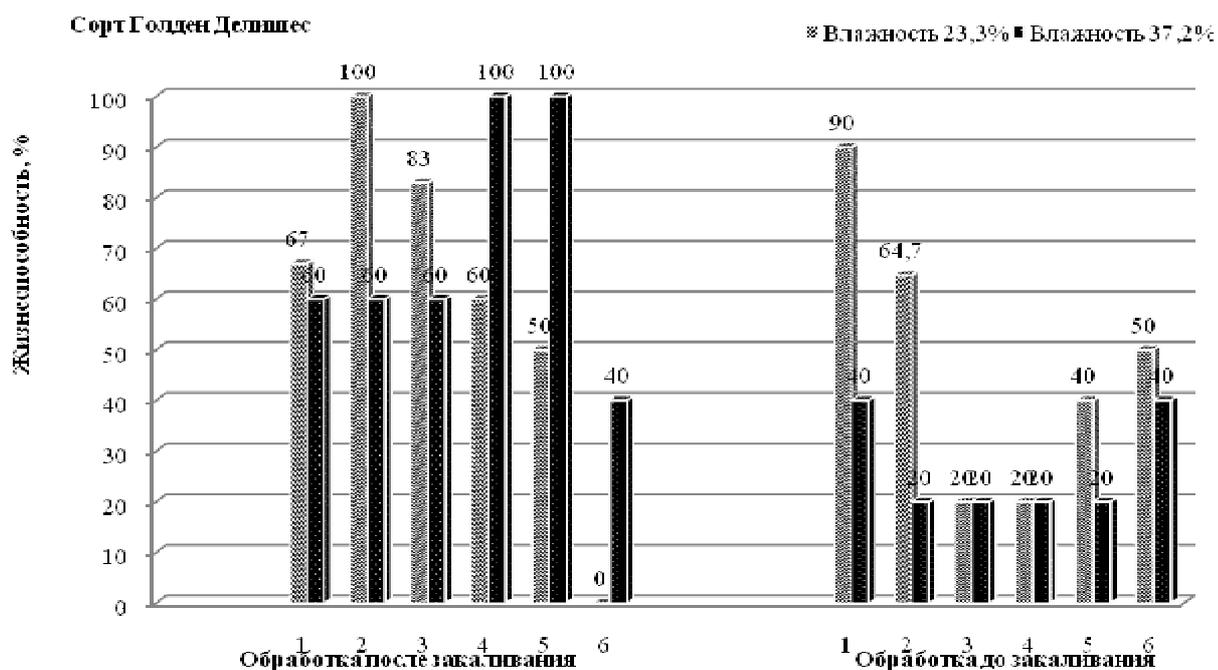


Рисунок 3 – Влияние способов предобработки различными криопротекторами и содержания влаги на эффективность замораживания почек яблони Голден Делишес

Предобработка: 1 – PVS2 (замачивание 3 ч); 2 – 50% глицерин + 50% глюкоза (замачивание 3 ч); 3 – PVS2 (инъекция + замачивание 1 ч); 4 – 50% глицерин + 50% глюкоза (инъекция + замачивание 1 ч); 5 – PVS2 (прокачка + замачивание 3 ч); 6 – 50% глицерин + 50% глюкоза (прокачка + замачивание 3 ч)

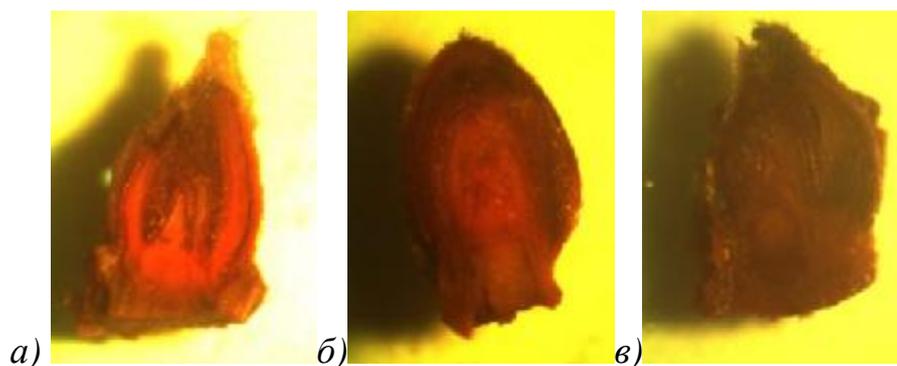


Рисунок 4 – Жизнеспособность замороженных в жидком азоте почек яблони сорта Голден Делишес в зависимости от предобработки (влажность 23,3%)

а) PVS-2 (замачивание 3 ч.); б) PVS-2 (прокачка+1ч. замачивание); в) 50% глицерин + 50% глюкоза (инъекция + замачивание 1 ч)

У сорта яблони Голден Делишес хорошие результаты также были получены при обработке криопротекторами после

проведения низкотемпературного закаливания. Следует отметить, что при обработке криопротекторами до закаливания показали результаты ниже среднего. Меристемы также погибали при прокачке криопротектором 50% глицерин + 50% глюкоза с последующим замачиванием на 3 часа. При 19,7% содержании влаги в почках эффективность предобработки криопротектором 50% глицерин + 50% глюкоза путём замачивания на 3 часа после закаливания была 100%, до закаливания – 64,7%. При таком же содержании влаги, предобработка криопротектором PVS2 способом замачивания на 3 часа до закаливания также была эффективной. Жизнеспособность почек составила 90%, а инъекция с последующим замачиванием на 1 час после закаливания - 83%. При 37,1% содержания влаги в почках выделились варианты 4 и 5 это криопротектор 50% глицерин + 50% глюкоза (способ инъекция + замачивание 1 ч) и PVS2 (способ прокачка + замачивание 3 ч), жизнеспособность составила 100%. В среднем, при различных обработках криопротектором PVS2 (замачивание на 3 часа, инъекция и прокачка с последующим замачиванием) сохранили жизнеспособность 54,1% почек, а криопротектором 50% глицерин + 50% глюкоза – 47,9%. Также,

Обсуждение результатов

Известно много факторов, которые могут повлиять на жизнеспособность зимующих почек после криоконсервации. Эти факторы включают в себя вид,

содержание влаги в почках оказало влияние на их жизнеспособность, средний показатель жизнеспособности при 37,1% влажности составил – 48,3%, а при 23,3% - 53,7%.

В результате проведенных исследований было выявлено, что окрашивание размороженных тканей может служить в качестве экспресс-оценки всех проводимых экспериментов по криоконсервации почек в жидком азоте. Краситель ТТХ эффективно окрашивает в живые и погибшие ткани почек плодовых культур, прошедших криоконсервацию в жидком азоте и позволяет четко определить эффективность предобработки криопротекторами. Следует отметить, что полностью живые почки можно восстанавливать как путём прививки на подвой, так и на искусственных питательных средах. В случае гибели прокамбиального слоя, то есть частичного повреждения – только на средах. Для восстановления почек были проведены следующие процедуры: а) стерилизация от сапрофитной микрофлоры; б) помещение почек яблони на среду МС, содержащую 10 мг/ хелата железа, 0,1 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИМК + 0,25 мг/л ГК; 30 г/л сахарозы. Восстановление почек на такой среде составило 55,7% для обоих сортов.

генотип, реакцию на условия окружающей среды и процесс обработки [22]. Общие приемы технологии криосохранения это применение криопротекторов и

предобработка клеток перед замораживанием, соблюдение определенного режима замораживания в интервале от 0 до -40°C, специальные предосторожности при оттаивании и рекультивировании объектов. Целью этих приемов является предотвращение повреждения мембран кристаллами льда, а также ослабление осмотического шока, возникающего при обезвоживании клеток [23]. Взяв на основу литературные данные, в наших исследованиях из 3 основных методов криоконсервации использовался метод замораживания спящих зимующих почек для плодовых культур умеренного климата. Доводя исходную влажность до 20-35% и постепенно в течение 7 суток снизив температуру с -5°C до -25°C подтвердили выводы японского ученого Sakai A. [24], о предварительной холодной акклиматизации до -40°C - -50°C для успешного криозамораживания зимующих почек яблони. В качестве контроля были взяты варианты без обработки криопротекторами и холодной акклиматизации, где максимальная жизнеспособность составила 55,5-60%. Учитывая повышение процента жизнеспособности при обработке криопротекторами [21], были испытаны криопротекторы PVS2 и 50% глицерин + 50% глюкоза и способы обработки ими (замачивание, прокачка, инъекция). Как ранее сообщалось учеными [25], жизнеспособность закаленных почек с содержанием влаги до 30% и обработанных 3-часовым

замачиванием криопротекторами PVS2 и 50% глицерин + 50% глюкоза составляет 66-100%. Этот показатель был определен методом окрашивания живых тканей красителем ТТХ. В наших экспериментах, 3-часовая обработка криопротекторами PVS2 и 50% глицерин + 50% глюкоза показала хорошие результаты по двум сортам при 19,7-23,3% содержании влаги – 80,4%, а при влажности 37,2% - 70%.

По результатам исследований можно сделать следующие рекомендации и заключение: для успешного замораживания зимующих спящих почек яблони в жидком азоте (-196°C) необходимо постепенное низкотемпературное закаливание и предобработка криопротекторами PVS2 или 50% глицерин + 50% глюкоза, а также обезвоживание до 25-30% содержания влаги с последующим постепенным низкотемпературным закаливанием. Наиболее эффективна предобработка до низкотемпературного закаливания (от -5°C до -25°C) с постепенным снижением температуры. Для быстрого определения жизнеспособности почек после криоконсервации эффективен метод окрашивания живых тканей. Более информативный метод это восстановление развития растений на искусственных питательных средах. Более точный метод – восстановление развития растений на искусственных питательных средах.

Для сохранения богатого и ценного генофонда страны, криоконсервация вегетативных

почек может стать технологической основой криобанка – возможностью неограниченно

Источник финансирования

Исследования проводились по бюджетной программе: 255 «Создание условий для развития производства переработки, реализации продукции растениеводства» по подпрограмме 106 «Программно-целевое финансирование научных исследований и мероприятий в растениеводстве» по специфике 156 «Оплата консалтинговых услуг

долгого хранения генофонда растений.

и исследований». По научно-технической программе «Создание сортов плодовых, ягодных культур и винограда с повышенной стрессоустойчивостью, высокими качественными показателями с использованием мирового агробиоразнообразия и биотехнологии для высокопродуктивных интенсивных насаждений».

** Метод предложен сотрудником Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины Присталовым А..*

Список литературы

1. B.Sh. Alimgazinova, M.A. Yessimbekova. Plant genetic resources of Kazakhstan: Status and prospects // Russian Journal of Genetics: Applied Research. – 2013. - Volume 3, Issue 1, pp. 21–25.

2. Roca W.M., Bryan J.E., Roca M.R. Tissue culture for the international transfer of potato genetic resources // Amer Potato J. - 1979. - V. 56. N 1. – P. 1-10.

3. Wilkin C.P., Bengochea T., Dodds J.H. The use of in vitro methods for plant genetic conservation. // Outlook on Agriculture, 1982. V. 11, N 2. – P. 67-72.

4. Чернец А.М., Абраменко Н.М., Стаканова Р.В. Разработка метода длительного хранения in vitro безвирусных клонов плодовых пород и земляники // Тезисы докладов международной конференции: Биология культивируемых клеток и биотехнология. Новосибирск, 1988. – С. – 291-302.

5. Романова Н. П., Ульянова Е. К. К вопросу о хранении мериклонов земляники in vitro // Научно-технический бюллетень Научно-исследовательского института растениеводства имени Н. И. Вавилова. Л., 1990. - Вып. 204. - С. 75–79.

6. Вержук В.Г., Филипенко Г.И., Павлов А.В. Криоконсервация вегетативных почек черешни и вишни с использованием криопротекторов // Достижения науки и техники АПК. - 2015. - Т.29. №7. - С. 65-67.

7. Рахимбаев И.Р., Ковальчук И.Ю., Кушнарченко С.В. Биотехнология криосохранения гермоплазмы плодовых растений // Сохранение и устойчивое использование растительных ресурсов. – Бишкек, 2003. – С. 234-238.

8. 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. – V. 82 (2). – P. 157-160.

9. Reed B. M. The basics of in vitro storage and cryopreservation // National Clonal Germplasm Repository, Corvallis, O.R. USA. – 2002. – P.34-46.

10. Розанов С.И. Место генетических криобанков в решении проблемы сохранения биоразнообразия. // Биофизика живой клетки. 1994. - Т. 6. - С. 8.

11. B.M. Reed (ed.), Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Chapter Cryopreservation—Practical Considerations. Springer, 2008. - pp 3-13.

12. B.M. Reed. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. // CryoLetters. – 2001. – 22. - pp. 97-104.

13. Towill LE, Forsline PL, Walters C, Waddell JW, Laufmann J Cryopreservation of Malus germplasm using a winter vegetative bud method: results from 1915 accessions. // CryoLetters. – 2004. - 25: - pp. 323-334.

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

15. Chang Y., Reed B.M. Preculture conditions influence cold hardiness and regrowth of Pyrus cordata shoot tips after cryopreservation. // HortScience. – 2001-36: - pp. 1329-1333.

16. Forsline PL, Towill LE, Waddell JW, Stushnoff C, Lamboy WF, McFerson JR Recovery and longevity of cryopreserved dormant apple buds. // J Amer Soc Hort Sci. – 1998. - 123: - pp. 365-370.

17. Seufferheld M.J., Fitzpatrick J., Walsh T.M., Stushnoff C. Cryopreservation of dormant buds from cold tender taxa using a modified vitrification procedure // Abstr. 28th Annual Meeting. - Cryobiology. – 1991. – V.28(6). – P.576.

18. И.Ю. Ковальчук, Т.Т. Турдиев. Оптимизация методов криоконсервации гермоплазмы чёрной Смородины (*Ribes Nigrum* L.) // Биотехнология. Теория и практика. - 2010. - №2. - Стр. 54-61.

19. Reed B.M., Lagerstedt H.B. Freeze preservation of apical meristems of rubus in liquid nitrogen // Hort. Science. – 1987. – Vol. 22, № 2. – P. 302-303.

20. Grabe D.F. (ed.). Tetrazolium testing handbook for agricultural seeds. / Contribution No.29. Handbook on Seed Testing ed Assn. of Official Seed Analysis. 1970. - 62 p.

21. Вержук В.Г., Павлов А.В., Тихонова О.А, Новикова Л.Ю. Жизнеспособность геноплазмы черной смородины (*Ribesnigrum* L.) обработанной криопротекторами и без них после хранения в парах жидкого азота. – Киев.,2012. - С. 417-421

22. Hofer M. Cryopreservation of winter-dormant apple buds: establishment of a duplicate collection of Malus germplasm// Plant Cell Tiss Organ Cult (2015) - 121: - pp. 647–656

23. Попов А.С. Некоторые механизмы криповреждений клеток растений *in vitro* и особенности их криосохранения // Физ. раст. – 1993. – Т. 40, № 3. – С. 485 – 496.

24. Sakai, A. and Nishiyama, Y., Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen, *HortScience*, 1978. – 13. – pp. 225–227.

25. Kovalchuk I, Turdiev T, Mukhitdinova Z, Frolov S, Reed BM, Koirova G New techniques for rapid cryopreservation of dormant vegetative buds. *Acta Horti* 2014. - 1039: - pp. 137–146.

ТҮЙІН

Алманың генетикалық ресурстарын ұзақ мерзімді сақтауды қамтамасыз ету мақсатында әр түрлі криопротекторлардың әсері, сонымен қатар криоконсервациялау кезінде қысқы тыныштық күйдегі бүршіктердің өміршеңдігіне ықпал ететін өңдеу тәсілдері және уақыты зерттелді. PVS2 және 50% глицерин + 50% глюкоза криопротекторларын қолдану криоконсервациялау кезінде алма бүршіктерінің өміршеңдігін 100% - ға дейін арттыратыны анықталды. Өңдеу тәсілдерінің ең тиімдісі төменгі температураға бейімдеуден кейін өсімдік материалын 3 сағат бойы криопротекторда батырып ұстау болып табылды. Зерттеу нәтижелерін жеміс дақылдарының криобанкін құруда қолдануға болады.

Кілт сөздер: генетикалық ресурстар, криоконсервация, криопротектор, алма.

SUMMURY

In order to ensure long-term storage of the genetic resources of apple, tested the effect of cryoprotectants, methods and timing of pre-treatment on the viability of winter dormant buds in cryopreservation in liquid nitrogen. It was found that the application of cryoprotectants PVS2 and 50% glycerin + 50% glucose increases the viability of apple winter buds in cryoconservation to 100%. The best way is pre-treatment by soaking in cryoprotectants for 3 hours after low-temperature acclimatization. The results of the research can be used to create cryobanks of fruit crops.

Key words: genetic resources, cryopreservation, cryoprotectant, apple.