



УДК 581.1.083: 634.7.723

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ГЕРМОПЛАЗМЫ ЧЁРНОЙ СМОРОДИНЫ (*RIBES NIGRUM L.*)

И.Ю. Ковальчук, Т.Т. Турдиев

kovalchuk_i_u@mail.ru

Институт биологии и биотехнологии растений Национального центра биотехнологии Республики Казахстан КН МОН РК, г. Алматы

Оптимизированы методы криоконсервации изолированных тканей чёрной смородины в жидком азоте. Оптимальная продолжительность холодовой акклиматизации для закаливания апикальных меристем составляла 3-5 недель. Акклиматизация при переменных температурах (8 час +22°C/16 час -1°C) была более эффективна, чем при постоянной температуре +4°C. Показано, что оптимальной предобработкой при использовании метода витрификации является культивирование меристем на среде с 0,3М сахарозой и обработка 2М глицерином. Лучшим криопротектором для предобработки является PVS2. На длительное криосохранение в дьюары с жидким азотом помещены апикальные меристемы 11 сортов и гибридов чёрной смородины.

Введение

Генофонд гермоплазмы растений является национальным достоянием каждой страны. В связи с этим, его изучению, сохранению, обогащению и рациональному использованию уделяется огромное внимание, что способствует интенсификации агропромышленного сектора экономики, росту благосостояния народа и служит основой для создания новых и улучшения существующих коммерческих сортов растений.

Чёрная смородина (*Ribes nigrum L.*) - одна из самых распространённых ягодных культур в Казахстане. В связи с острым дефицитом поливных земель в регионе площади полевых коллекций этой культуры сокращаются, и ценные, но временно неостребованные сорта уничтожаются. Чрезвычайно важно сохранить дикие разновидности и культурные сорта растений *ex situ* и *in situ*. Одна из стратегий сохранения *ex situ* генетического разнообразия – создание банка гермоплазмы биотехнологическими методами *in vitro*. Основные методы биотехнологии сохранения гермоплазмы для вегетативно размножаемых ягодных растений – микрклональное размножение верхушек побегов, хладохранение (+4°C) и

криоконсервация (-196°C). Метод криоконсервации в жидком азоте, позволяет неограниченно долго сохранять жизнеспособность, регенерационный потенциал и генетическую стабильность исходного материала. Коллекции гермоплазмы *in vitro* и полевые рассматриваются как взаимодополняющие.

За последнее время методы криоконсервации успешно развивались и применялись ко многим видам растений во всем мире. Разработанные стандартные методы получили достаточно широкое распространение. В результате было сохранено много различных видов и сортов растений. Для криоконсервации многих ягодных культур, включая культурные сорта и дикие разновидности чёрной смородины, использовались – контролируемое программное замораживание, методы витрификации, инкапсуляции-дегидратации и витрификации-дегидратации [1-3].

При размораживании образцов, хранившихся в жидком азоте, существует большая зависимость регенерации растений от генотипа и факторов культивирования. Стандартные методы криоконсервации хорошо зарекомендовали себя для сохранения эксплантов многих растений, однако они требуют модификации и оптимизации условий замораживания. В Казахстане до



настоящего времени коллекция чёрной смородины содержалась лишь в полевых условиях, криобанка не существует.

Данные исследования были проведены с целью усовершенствования биотехнологии криоконсервации изолированных тканей гибридов и сортов чёрной смородины для создания национального криобанка Казахстана.

Материалы и методы

В эксперименте использовали гибриды, отечественные, зарубежные сорта чёрной смородины из коллекции Помологического сада Института плодоводства и виноградарства Казахстана.

Изучали влияние продолжительности холодной акклиматизации (ХА) пробирочных растений на восстановление роста криосохраненных меристем, способы замораживания, определяли оптимальную для предобработки концентрацию сахарозы, состав криопротекторов, режимы вывода тканей из состояния глубокого замораживания и регенерации из них целых растений.

Асептические побеги культивировали в светокультуральном помещении при 16-часовом фотопериоде, интенсивности освещения $25 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ и контролируемой температуре 25°C . В эксперименте было использовано около 3000 асептических растений чёрной смородины. Растения, выращенные на питательной среде Мура-сиге и Скуга (МС), рекультивировали на свежую среду каждые 3 недели. В конце 3-недельного цикла растения были помещены на холодовую акклиматизацию. Акклиматизацию побегов проводили в течение 1-6 недель в климатической камере (Lab-Line Environette, Melrose Park, IL, USA) при чередующемся режиме: 8 час $+22^\circ\text{C}$ (интенсивность освещения $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), затем 16 час -1°C (без освещения). А также в течение 1-3 месяцев при постоянной температуре $+4^\circ\text{C}$ 8-часовом фотопериоде (интенсивность освещения $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Апикальные верхушки побегов с меристематической частью (в дальнейшем

меристемы) с 3-4 листовыми примордиями (от 0,8 до 1,0 мм) были вычленены из акклиматизированных побегов и после соответствующей обработки помещены в жидкий азот.

Испытывали 4 метода криоконсервации эксплантов в жидком азоте:

1) Витрификация с прекультивированием на среде с 0,3 М сахарозой. Метод для предобработки, предложенный Matsumoto T. и Sakai A. [4]. Вычлененные апикальные меристемы для ХА прекультивировали в условиях ХА на среде МС с 0,3 М сахарозой, в течение 2 сут. (а не 3 сут) при 25°C , как в рекомендованном методе. Меристемы были помещены в раствор 2 М глицерина в 0,4 М сахарозе на 20 мин, а затем помещены в криопробирки на льду с 1 мл PVS2 (30% глицерин, 15% этиленгликоль (ЭГ), 15% диметилсульфоксид (ДМСО) в жидкой среде МС с 0,4 М сахарозой при pH 5,8) на 80 мин. После этого они были помещены в жидкий азот.

Размораживание образцов было проведено в водяной бане при температуре 45°C в течение 1 мин, затем 1 мин. в воде при 22°C . Верхушки побегов промывались жидкой средой МС с 1,2 М сахарозой дважды, высушены на фильтровальной бумаге и помещены на питательную среду для регенерации.

2) Витрификация с прекультивированием на среде с 0,3 М сахарозой без 2 М глицерина. Стандартный метод был нами модифицирован, вычлененные апикальные меристемы для ХА, прекультивировали в течение 2 сут в условиях ХА на среде МС с 0,3 М сахарозой, также из предобработки был исключён 2 М глицерин, растворённый в 0,4 М сахарозе. Затем меристемы помещали в криопробирки на льду с 1 мл PVS2 в жидкой среде МС с 0,4 М сахарозой при pH 5,8 на 80 мин. После этого они были помещены в жидкий азот.

Размораживание образцов было выполнено так же, как в первом методе криоконсервации.

3) Витрификация с прекультивированием на среде с 5% ДМСО. Эта техника



витрификации была разработана для меристем *Ribes* [5]. Вычлененные меристемы были прекультивированы в течение 2 суток в условиях ХА на среде МС, содержащей 5% ДМСО. После предобработки 1% бычьим сывороточным альбумином (БСА) в среде МС на 2 часа верхушки побегов были помещены в криопробирки на льду с 1 мл криопротектора PVS2 на 20 мин. После чего криопробирки были помещены в жидкий азот.

Размораживание образцов было выполнено так же, как в первом методе криоконсервации.

4) Инкапсуляция-дегидратация. Использовали метод, разработанный J. Dereuddre и др. [6] и модифицированный M. Reed [7]. Вычлененные меристемы для ХА были помещены в альгинат (3%, альгинат в жидкой среде МС с 0,75 М сахарозой, рН 5,7). Альгинатные шарики полимеризовали 20 мин. в насыщаемом растворе хлорида кальция и помещали на 18 час. в жидкую среду МС с 0,75М сахарозой при постоянном перемешивании на шейкере. После обработки сахарозой альгинатные капли были высушены и помещены в стерильные чашки Петри под ламинарный поток воздуха в боксе на 4 часа. После высушивания до 20% содержания влаги они были помещены в криопробирки и опущены в жидкий азот.

Размораживание криопробирок проводили при комнатной температуре в течение 20 мин. Верхушки побегов в альгинатных шариках повторно гидратировали в жидкой среде МС в течение 5 мин.

Для предобработки испытывали следующие криопротекторы: а) PVS 2 (30% глицерин + 15% ЭГ + 15% ДМСО + 0,4М сахароза); б) PVS 3 (50% глицерин + 50% сахароза); в) PVS 4 (35% глицерин + 20% ЭГ + 0,6М сахароза); г) раствор Towill (35% глицерин + 10% ДМСО + 10% полиэтиленгликоль (ПЭГ) – 8000) + 0,4М сахарозы.

Для восстановления роста меристемы после размораживания высаживали на питательную среду МС, содержащую на 30% меньше нитратов, 20 г/л глюкозы, 50 мг/л аскорбиновой кислоты, 0,1 мг/л

6-бензиламинопурина (БАП), 0,2 мг/л гибберелловой кислоты (ГК).

На длительное криосохранение были помещены две криопробирки каждого генотипа, по 20 меристем в каждом. Одна криопробирка с меристемами была извлечена и использована в качестве контроля для установления жизнеспособности после замораживания в течение 24 часов. Оставшиеся криопробирки были оставлены на длительное хранение.

Результаты и обсуждение

Холодовая акклиматизация

Предварительная холодная акклиматизация растений, приводит к запуску природных механизмов устойчивости растений к низким температурам [2]. Поэтому способы и продолжительность холодной акклиматизации играют исключительно большую роль при замораживании меристем в жидком азоте.

В ходе экспериментов по криосохранению определили, что жизнеспособность меристем чёрной смородины после криосохранения в значительной степени зависит от акклиматизации к холоду. У неакклиматизированных растений выживали лишь единичные меристемы. Постоянная положительная низкая температура +4°C способствовала некоторому увеличению выживаемости меристем: при акклиматизации в течение одного месяца восстановление жизнеспособности меристем после замораживания составляло 30,0%, двух месяцев – 43,2%, трёх – 61,1%.

Влияние переменной температуры было более эффективным. Холодовая акклиматизация в течение одной недели положительно влияла на выживаемость меристем (рис. 1). Две недели ХА улучшали регенерацию растений у сорта Муравушки до 56,6%, у гибрида 4-44-81 - до 33,5%. Увеличение продолжительности ХА до 3 недель приводило к резкому увеличению жизнеспособности до 92,1% и 76,9% меристем у исследуемых сортов. Через 4 недели



акклиматизации регенерационная способность сорта Муравушка начала снижаться, а гибрида 4-44-81 ещё возросла до 77,8%, а на 5 неделе до 80,1%, затем начала понемногу снижаться. После 6 недель ХА жизнеспособность меристем уменьшилась до 47,4 и 30,9% в зависимости от сорта. Таким образом, три недели ХА были оптимальны для восстановления роста сорта Муравушки, в то время как 3–5 недель были лучшими для гибрида 4-44-81. То есть эффективная продолжительность холодной акклиматизации для чёрной смородины находилась в пределах от 3 до 5 недель. Поэтому все дальнейшие эксперименты по предобработке различных генотипов чёрной смородины были проведены после 3-недельной акклиматизации холодом. Регенерация контрольных меристем (без замораживания в жидком азоте) всегда была 80-100%.

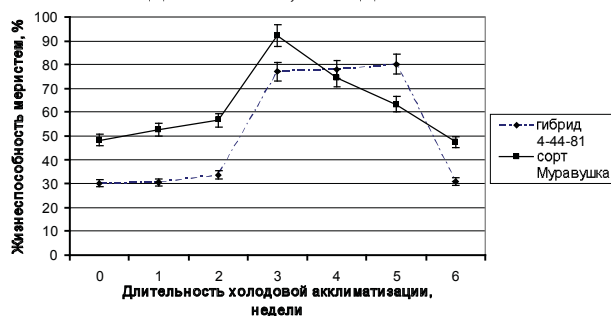


Рис. 1. Регенерация меристем чёрной смородины при акклиматизации переменной температурой в течение от 0 до 6 недель с использованием метода криосохранения с PVS2 и 0,3М сахарозой.

Подобные результаты были получены при холодной акклиматизации верхушек побегов груши, при этом отмечался большой диапазон изменчивости среди сортов [8]. Длительная ХА улучшала восстановление после криоконсервации, но время обработки холодом было индивидуально для каждого проверяемого генотипа и зависело от приобретенной выносливости каждого генотипа к холоду [9]. Для криоконсервации верхушек побегов мяты, также, как и в нашем эксперименте, чередование температуры при акклиматизации, было более эффективным, по сравнению с постоянной низкой температурой [10]. Palonen and

Junttila [11] определили, что предобработка сахарозой в течение 14 дней при ХА приводила к еще большему эффекту выносливости растений малины, чем постоянная температура +4°C.

Сравнение методов криосохранения

Испытание различных методов криоконсервации проводили с целью установления наиболее эффективного для наших условий и генотипов метода и использования его при создании криогенной коллекции гермоплазмы. Для установления оптимального метода замораживания в жидком азоте испытаны стандартные методики: два метода витрификации, метод инкапсуляции-дегидратации [12]. А также модифицированный нами метод витрификации. Исследование проводили на 3 генотипах чёрной смородины: сортов Оджебин, Муравушка и гибрида 4-44-81 (рис. 2).

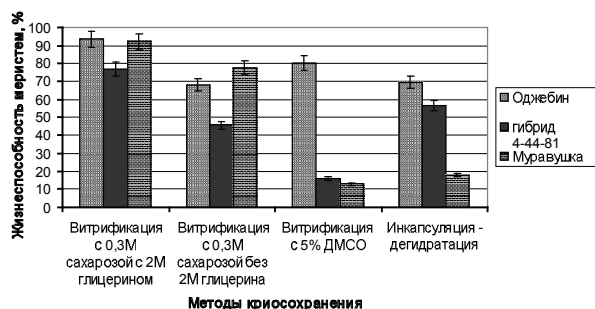


Рис. 2. Влияние методов криосохранения на жизнеспособность меристем трех генотипов чёрной смородины

Сравнение методов показало, что в проводимых экспериментах сорт Оджебин имел лучшее восстановление жизнеспособности после замораживания в жидком азоте. Все четыре метода были приемлемы для этого сорта, в отличие от других сортов, которые реагировали по-разному. Восстановление роста у всех сортов после жидкого азота было лучше при использовании метода витрификации с криопротектором RVS2, с 0,3М сахарозой и обработкой 2М глицерином в среде МС с 0,4М сахарозой (регенерация сорта Оджебин 93,5%, сорта Муравушка – 92,1%, гибрида 4-44-81 – 76,9%). Криоконсервация другими методами



была менее успешной, и восстановление жизнеспособности у сортов чёрной смородины не всегда превышало 40%-й минимальный рубеж регенерации, требуемой для безопасного хранения [13]. Для сорта Оджебин также неплохие результаты получены с применением метода витрификации с 5% ДМСО (регенерация 80,4%), меньшее восстановление роста наблюдалось с применением метода инкапсуляции-дегидратации (69,5%). Подобные результаты были отмечены при использовании метода витрификации, исключая обработку 2М глицерином в среде МС с 0,4М сахарозой (68,3%).

У гибрида 4-44-81 применение метода инкапсуляции-дегидратации приводило к регенерации 56,6% меристем, при использовании метода витрификации без глицерина, растворённого в 0,4 М сахарозе – 45,7%. При использовании метода витрификации с 5% ДМСО регенерация составляла только 15,9%.

Криосохранение сорта Муравушка методом витрификации без глицерина приводило к регенерации 77,9%, инкапсуляция-дегидратация – 17,8%, витрификации с % ДМСО – 12,9% (рис. 2).

Таким образом, было определено, что длительную криоконсервацию гермоплазмы чёрной смородины в наших условиях эффективнее проводить методом витрификации с 0,3М сахарозой и обработкой 2М глицерином в среде МС с 0,4М сахарозой.

Полученные результаты отличаются от экспериментов с другими видами растений. Так, успешное хранение генотипов *Rubus* было проведено В. Reed [12] при стандартной технике инкапсуляции-дегидратации, регенерация составила 60-100%, было сохранено 25 генотипов, принадлежащих к 9 видам. Криосохранение методом инкапсуляции-дегидратации, включающее обработку 0,4М сахарозой и 2М глицерином, в альгинатных шариках было очень эффективно для семи сортов *Rubus idaeus* (регенерация 55%) [15]. Использование метода витрификации с предобработкой 5%-ным ДМСО было

успешным для четырех генотипов (регенерация 71%) после 4 недель ХА [16].

Проведённые исследования показывают, что для лучшего восстановления роста растений после замораживания в жидком азоте необходима оптимизация методов криоконсервации. С этой целью проведены исследования по установлению оптимальной концентрации сахарозы при предобработке и лучшего криопротектора для замораживания в жидком азоте.

Определение оптимальной концентрации сахарозы в питательной среде для предобработки

Помещение апексов непосредственно в криопротекторы из-за высокой осмотичности раствора часто приводит к повреждению клеток. Чтобы этого избежать, проводят этап предварительного насыщения меристем криопротектором, для чего апексы выдерживают при комнатной температуре в течение 20 мин в растворе, который состоит из 2М глицерина и 0,4 – 0,6М сахарозы [17]. Концентрация сахарозы в питательной среде для предобработки зависит от вида растения и может существенно влиять на регенерацию меристем после замораживания в жидком азоте, являясь существенным фактором, способствующим максимальной выживаемости.

Проводили определение оптимальной молярности сахарозы в среде для предобработки замораживаемых меристем чёрной смородины. Молярность сахарозы в опыте варьировала от 0,1 до 0,5 (рис. 3).

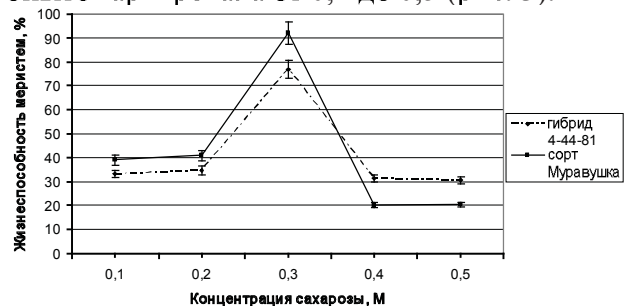


Рис. 3. Регенерация криосохраненных меристем после предобработки в среде с сахарозой различной концентрации (от 0,1 до 0,5 М)



Предобработка с 0,3 М сахарозой оказалась, очевидно, лучше для двух испытуемых сортов. Это схоже с результатами, полученными при криосохранении методом витрификации со многими другими видами растений, и показывает, что для растений чёрной смородины это наиболее подходящая концентрация сахарозы в среде.

Определение влияния состава криопротекторов на выживаемость меристем черной смородины после криосохранения методом витрификации с 0,3М сахарозой

Для предотвращения при криозамораживании повреждения мембран клеток образующимися кристаллами льда и осмотического шока, вызываемого повышением концентрации остающихся внутри клетки солей применяют предварительную обработку криопротекторами – веществами, которые на этапе замораживания должны максимально уменьшить повреждение клеток от осмотического и механического стрессов.

В Японии группой Sakai разработана серия растворов PVS (plant vitrification solution). Раствор PVS1 – для замораживания клеточной суспензии и меристемных тканей *Asparagus*, раствор PVS2 изначально был предложен для криоконсервирования культуры клеток цитрусовых, однако сейчас успешно применяется для криоконсервирования апексов более 200 видов растений, включая картофель; раствор PVS3 – для криоконсервирования меристем *Wasabi*, *Asparagus*, *Allium*, а PVS4 – меристем *Wasabi*. В США группой исследователей под руководством Steponkus P.L. разработан раствор, включающий несвойственный растениям компонент – бычий сывороточный альбумин, который используется для криоконсервирования клеточной суспензии *Brassica*, протопластов риса, гвоздики, батата, меристем картофеля [18]. Towill L.E. для замораживания меристем мяты и батата применял раствор, содержащий высокомолекулярный криопротектор полиэтилен гликоль (ПЭГ) –

8000 [19]. То есть для разных растений используют различные криопротекторы.

Для установления оптимального криопротектора для замораживания меристематических тканей чёрной смородины испытано 4 состава: а) PVS 2; б) PVS 3; в) PVS 4 и г) раствор Towill. Результаты показаны на рисунке 4.

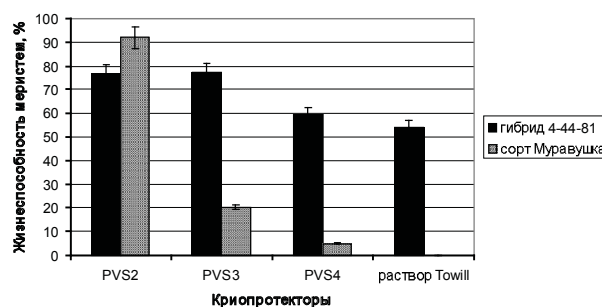


Рис. 4. Регенерация криосохранённых меристем черной смородины после предобработки различными криопротекторами

Результаты экспериментов свидетельствуют, что регенерация растений черной смородины после криосохранения методом витрификации с 0,3М сахарозой зависела от состава криопротектора. Так, регенерация гибрида 4-44-81 при использовании PVS 2 составляла в среднем 76,9%, PVS 3 – 77,1%, PVS 4 – 59,3% и раствора Towill – 54,2%. Регенерация сорта Муравушка при использовании PVS 2 в среднем составляла 92,1%, PVS 3 – 20,3%, и PVS 4 – 5,0%, применение раствора Towill не дало положительных результатов.

Результаты экспериментов показали, что обработка криопротектором PVS2 является более эффективной для криосохранения меристем обоих изучаемых сортов. Следует отметить, что обработка меристем гибрида 4-44-81 криопротектором PVS 3 также показала высокую выживаемость после криосохранения, в составе которого отсутствовал ДМСО. Однако для замораживания в жидком азоте при подготовке растительного материала чёрной смородины к криоконсервации на длительное хранение целесообразно проводить обработку криопротектором PVS 2, что является более эффективным для всех изучаемых генотипов.



Данные наших исследований соответствуют результатам, полученным в Японии Takagi H. [20], где высокий процент жизнеспособности был получен при использовании раствора PVS2 для предобработки тропических культур.

Заключение

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.

На основе проведённых исследований для длительного сохранения чёрной смородины в жидком азоте применён оптимальный метод – витрификации с 0,3М сахарозой, криопротектором PVS2 и 3-недельной акклиматизацией переменной температурой. На длительное криосохранение в дьюары

с жидким азотом помещены меристемы 11 сортов и гибридов чёрной смородины: Память Вавилова, Катюша, Алия, Азамат, Муравушка, Орловский Вальс, Лесковица, Оджебин, Boskoop Giant, 4-44-81, 4-44-138. Были сохранены две криопробирки каждого генотипа, по 20 меристем в каждом. Одна криопробирка с меристемами была извлечена и использована в качестве контроля для установления жизнеспособности после замораживания в течение 24 часов, которая составила от 61,5 до 95% в зависимости от генотипа. Оставшиеся криопробирки с образцами оставлены на длительное хранение.

Выводы

Результаты проведённых исследований показывают, что генофонд гермоплазмы чёрной смородины Казахстана может быть надёжно сохранен в жидком азоте как долгосрочная резервная коллекция *in vitro* в дополнение к активной полевой коллекции, поддерживаемой в помологических, ботанических садах и сортоучастках.

Криопробирки с образцами гермоплазмы сортов и гибридов, сохранённые в жидком азоте, являются основой криогенной коллекции чёрной смородины в Казахстане.

Литература

1. Chang Y, Reed B M Extended cold acclimation and recovery medium alteration improve regrowth of *Rubus* shoot tips following cryopreservation. *CryoLetters*. – 1999. – 20. – P. 371-376.
2. Reed B.M. Cryopreservation of Temperate Berry Crops / Reed B.M. (Ed) // *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. – New York: Springer Science + Business Media LLC, 2008. – P. 333-364.
3. Engelmann F., Gonzalez Arnao M.T, Wu Y, Escobar R.H. Development of Encapsulation Dehydration / Reed B.M. (Ed) // *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. – New York: Springer Science + Business Media LLC. – 2008. – P. 59-76.
4. Matsumoto T., Sakai A. Cryopreservation of grape *in vitro*-cultured axillary shoot tips by three-step vitrification / Engelmann F., Takagi H. (Eds) // *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current Research Progress and Application*. – Rome: Japan International Research Center for Agricultural Sciences and International Plant Genetic Resources Institute. – 2000. – P.424- 425.
5. Luo J., Reed B.M. Abscisic acid-responsive protein, bovine serum albumin, and proline pretreatments improve recovery of *in vitro* currant shoot-tip meristems and callus cryopreserved by vitrification // *Cryobiology*. – 1997. – N 34. – P. 240-250.
6. Dereuddre J., Scottez C., Arnaud Y., Duron M. Resistance of alginate-coated axillary shoot tips of pear tree (*Pyrus communis* L. cv. Beurre Hardy) *in vitro* plantlets to dehydration and subsequent freezing in liquid nitrogen // *C. R. Acad. Sci. Paris*. – 1990. – N 310 – P. 317-323.



7. Reed B. M. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants // *CryoLetters*. – 2001. – N 22. – P. 97-104.
8. Chang Y, Reed B M Effects of photoperiod and alternating temperature on the cryopreservation and cold hardiness of *in vitro*-grown *Pyrus* meristems. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. – 1998. – P. 34-61.
9. Chang Y, Reed B M Preculture conditions influence cold hardiness and regrowth of *Pyrus cordata* shoot tips after cryopreservation. *HortScience* – 2001. – N 36. – P. 1329-1333.
10. Senula A, Keller E R J, Sanduijav T, Yohannes T Cryopreservation of cold acclimated mint explants using a simple vitrification protocol. *CryoLetters*. - 2007. - N28. – P. 1-12.
11. Palonen P, Junttila O Cold hardening of raspberry plants *in vitro* is enhanced by increasing sucrose in the culture medium. *Physiologia Plantarum*. - 1999. - 106. – P. 386-392.
12. Reed BM Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer Science + Business Media LLC, New York. – 2008. – P. 513.
13. Reed B. M. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants // *CryoLetters/* – 2001. – N 22. – P. 97-104.
14. Dussert S, Engelmann F, Noirot M Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. *CryoLetters* – 2003. – N24. – P. 149-160.
15. Wang Q, Laamanen J, Uosukainen M, Valkonen JPT Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. *Plant Cell Reports* . – 2005. – N24. – P. 280-288.
16. Gupta S, Reed BM Cryopreservation of shoot tips of blackberry and raspberry by encapsulation-dehydration and vitrification. *CryoLetters*. – 2006. – N27. – P. 29-42.
17. Hirai D., Sakai A. Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of potato by encapsulation-vitrification // *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. Eds. Engelmann F& Takagi H., JIRCAS, Tsukuba & IPGRI, Rome. – 2000. – P. 205-211.
18. Golmirzaie A.M., Panta A. Advances in potato cryopreservation at CIP // *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. Eds. Engelmann F& Takagi H., JIRCAS, Tsukuba & IPGRI, Rome. – 2000. - P. 205-211.
19. Towill L.E. Cryopreservation of isolated mint shoot tips by vitrification // *Plant Cell Reports*. – 1990. – N9. – P. 178-180.
20. Takagi H. Recent development in cryopreservation of shoots apices of tropical species // *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. Eds. Engelmann F& Takagi H., JIRCAS, Tsukuba & IPGRI, Rome. – 2000. – P. 178-193.

Түйін

Қара қарақаттың оқшау алған ұлпаларын сұйық азотта криоконсервілеу әдістері үйлестірілді. Апикальды меристеманы суыққа бейімдеудің оңтайландырылған уақыты 3-5 апта аралығы. Тұрақты төменгі (+4°C) температураға қарағанда ауыспалы температурада (8 час +22°C / 16 час -1°C) суыққа бейімдеу тиімді. 0,3М сахароза қосылған витрификация әдісімен және 2М глицеринмен өңделген 0,4М сахароза бар МС қоректік ортада криоконсервілеу әдісі ұтымды болып көрінді. Өсімдік ұлпаларын криоконсервілеу үшін PVS2 криопротекторымен өңдеу ең тиімді болды. Қара қарақаттың 11 сортының және будандарының бұтақшаларының апикальды меристемалары сұйық азот құйылған дьюарда ұзақ уақыт сақтауға қойылды.

Summary

The methods of cryopreservation of isolated black currant tissue in liquid nitrogen were optimized. Optimal duration of apical meristems cold acclimation was 3-5 weeks. Acclimation by alternating temperatures (8 h at +22°C / 16 h at -1°C) was more effective than constant temperature (+4°C). The optimal pretreatment for vitrification method was preculture of meristem on medium with 0.3M sucrose and treatment by 2M glycerol. The cryoprotectant PVS2 was the best for cryopreservation. The apical meristems of 11 cultivars and hybrids of black currant were placed in Dewar vessels with liquid nitrogen for long-term cryopreservation.