Сохранность меристем винограда в процессе низкотемпературного консервирования

Ю.С. Лысак
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Integrity of Grape Meristems During Low-Temperature Preservation

Yu.S. Lysak
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Данное исследование направлено на разработку методов низкотемпературного консервирования меристем винограда с использованием быстрых режимов замораживания и витрифицирующих криозащитных сред на основе криопротекторов ряда диолов, полиолов и их смесей.

Для исследования токсического действия криопротекторов на меристемы их помещали в растворы криопротекторов на 30 мин, затем отмывали путем 2-кратной смены среды 1/2 MS в течение 40 мин. Сохранность меристем винограда оценивали на 5-й день культивирования путем подсчета количества живых меристем к общему их количеству.

Исследовали следующие криозащитные среды: 1 М раствор 1,2-пропандиола (1,2-ПД) на среде 1/2 MS; 7%-й раствор поливинилпирролидона (ПВП) с молекулярной массой 24000 на среде 1/2 MS; раствор 1,2-ПД в концентрации 1 М и ПВП в концентрации 3,5% на среде 1/2 MS; раствор 1,2-ПД в концентрации 1 М и ПВП в концентрации 7% на среде 1/2 MS; раствор этиленгликоля в концентрации 1 М и ПВП в концентрации 3,5% на среде 1/2 MS.

Криоконсервирование осуществляли следующим способом: меристемы в течение 30 мин насыщали криопротекторами, далее помещали их в пленочные тонкостенные контейнеры, изготовленные на основе фторопласта, и замораживали прямым погружением в жидкий азот. Отогрев проводили на водяной бане с температурой воды 35°С в течение 5–10 с. После отогрева меристемы отмывали от криопротекторов, помещали на среду 1/2 MS и выдерживали в темноте в течение 24 ч. Затем их переносили в фитотрон для дальнейшего культивирования, на 5-й день определяли сохранность. Живыми считались меристемы, проявляющие тенденцию к росту и приобретающие зеленую окраску.

Из исследованных криопротекторов наиболее эффективным и наименее токсичным оказался 1,2 ПД (90% сохранности), тогда как применение ПВП дало 55% сохранных меристем на этапе экспозиции. После замораживания-отогрева сохранность меристем для 1,2-ПД и ПВП составила 45 и 10% соответственно. При использовании смесей криопротекторов в криозащитных средах наиболее эффективной оказалась комбинация 1 М раствора 1,2 ПД и 7% раствора ПВП (сохранность меристем после размораживания составила 80%).

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что использование смесей криопротекторов в криозащитных средах для замораживания меристем винограда является более эффективным по сравнению с применением отдельных криопротекторов.

This research is directed to development of low-temperature preservation methods of grape meristems using rapid regimens of freezing and cryoprotective vitrifying media based on cryoprotectants of diol and polyol series and their mixtures.

In order to study the cryoprotectant toxic effect on meristems they were placed into cryoprotectant solutions for 30 min, then washed by 2-fold change of medium 1/2 MS during 40 min. Survival of grape meristems was evaluated to the 5th day of culturing by calculation of a number of vital meristems in relation to their total number.

We studied the following cryoprotective media: 1 M solution of 1,2-propane diol (1,2-PD) in the medium 1/2 MS; 7% polyvinyl pyrrolidone (PVP) of 24,000 molecular mass in the medium 1/2 MS; solution of 1 M 1,2-PD and 3.5% PVP in the medium 1/2 MS; solution of 1 M 1,2-PD and 7% PVP in the medium 1/2 MS; ethylene glycol of 1 M concentration and 3.5% PVP in the medium 1/2 MS.

Cryopreservation was performed by the following method: meristems were saturated with cryoprotectants during 30 min, then placed into plastic thin-walled containers made of fluoroplasts, and frozen by direct plunging into liquid nitrogen. The thawing was carried-out in water bath under temperature of 35°C during 5–10 sec. After thawing the meristems were washed to remove cryoprotectants, placed into the medium 1/2 MS and kept in the darkness for 24 hrs. Then they were transfered into phytotron for further culturing and by the 5th day the survival was assessed. Meristems manifesting tendency to growth and colored green were considered as viable ones.

Among the investigated cryoprotectants the most effective and the least toxic was 1,2-PD (90% survival), whereas the application of PVP resulted in 55% survival after exposure stage. After freeze-thawing the survival of meristems in the cases with 1,2-PD and PVP made 45 and 10%, accordingly. When using mixed cryoprotective media the most effective was the combination of 1 M 1,2-PD and 7% PVP (survival of meristems after freeze-thawing was 80%).

The results of performed researches testify to the fact that the using of cryoprotectant mixtures in cryoprotective media for freezing of grape meristems is more effective if compared with application of single cryoprotectants.