

Криоконсервирование меристем чеснока в комбинированных криозащитных средах

Ю.С. ЛЫСАК, А.Т. ХОДЬКО, Т.Ф. СТРИБУЛЬ, А.М. КОМПАНИЕЦ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Garlic Meristem Cryopreservation in Combined Cryoprotective Media

YU.S. LYSAK, A.T. KHODKO, T.F. STRIBUL, A.M. KOMPANIETS

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В практике криоконсервирования меристем чеснока более широкое применение нашли режимы быстрого охлаждения.

Цель настоящей работы – исследование эффективности режима плавного замораживания меристем чеснока с использованием криозащитных сред на основе смесей криопротекторов ряда амидов, диолов, полиолов. Исследовали целесообразность использования этапа предварительной холодовой адаптации (закаливание) для повышения жизнеспособности меристем чеснока после криоконсервирования.

Меристемы чеснока (*Allium sativum*) выделяли из зубков на среду культивирования Murashige & Skoog (MS). Закаливание проводили в течение 5 суток при 10°C на среде MS без фитогормонов, с концентрацией сахарозы 0,3 М. Закаленные и незакаленные меристемы криоконсервировали. Использовали следующие растворы криопротекторов на среде MS: 1) 1,2-пропандиол (1,2-ПД) в концентрации 1 М и поливинилпирролидон (ПВП) с м.м. 24000 в концентрации 3,5%; 2) метилацетамид (МАц) 0,5 М и полиэтиленоксид (ПЭО)-6000 – 3,5%; 3) 1,2-ПД 1 М, МАц 0,5 М и ПВП–3,5%; 4) 1,2-ПД 1 М, МАц 0,5 М и ПЭО-6000 – 3,5%.

Была также исследована эффективность замораживания меристем без криопротекторов.

Замораживали меристемы в герметичных пленочных контейнерах в парах азота с последующим погружением в жидкий азот, отогревали их на воздухе при 20°C, отмывали от криопротекторов и культивировали в условиях фитотрона. Оценивали сохранность (5-е сутки культивирования) и жизнеспособность (30-е сутки) меристем.

Проведенные эксперименты показали, что во всех группах меристем сохранность после криоконсервирования была не ниже 80%.

Сохранность предварительно закаленных и криоконсервированных в 3-компонентных криозащитных средах меристем практически не отличалась от сохранности незакаленных (соответственно 90–95%). Для меристем, криоконсервированных в 2-компонентных средах, этот показатель составлял 80–85% для незакаленных и 90–95% – для закаленных. Показатели жизнеспособности криоконсервированных меристем по абсолютным величинам были меньше показателей сохранности, однако и в данном случае 3-компонентные криозащитные среды были более эффективны (75 и 60% живых меристем) по сравнению с 2-компонентными (50 и 25%).

Жизнеспособность меристем, замороженных без криопротекторов, составила 55% для незакаленных образцов и 70% – для закаленных. Это свидетельствует о хорошем состоянии объекта и эффективном режиме замораживания-отогрева.

The regimens of rapid cooling have become more widely applied in practice of garlic meristem cryopreservation.

This research aim was to study the efficiency of mild freezing regimen for garlic meristems with use of cryoprotective media, based on cryoprotectant mixtures of amide, diol and polyol series. The expediency of using the preliminary cold adaptation stage (hardening) to increase garlic meristem viability after cryopreservation was under study.

The garlic meristems (*Allium sativum*) were isolated from cloves in Murashige & Skoog (MS) culture medium. Hardening was implemented within 5 days at 10°C in MS medium without phytohormones, with 0.3 M sucrose concentration. The hardened and non-hardened meristems were cryopreserved. The following cryoprotective solutions were used on the base of MS medium: 1) 1,2-propanediol (1,2-PD) in 1 M concentration and polyvinylpyrrolidone (PVP) with m.m. 24000 in 3.5% concentration; 2) methylacetamide (MAc) 0.5 M and polyethylene oxide (PEO) – 6000 3.5%; 3) 1,2-PD 1 M, MAc 0.5 M and PVP 3.5%; 4) 1,2-PD 1 M, MAc 0.5 M and PEO-6000 3.5%.

The efficiency of meristems freeze-thawing without cryoprotectants was also assessed.

The meristems were frozen in sealed film containers in nitrogen vapor followed by immersion into liquid nitrogen, then thawed in air at 20°C, washed from cryoprotectants and cultured under phytotron conditions. There were assessed the integrity (5th day of culture) and viability (30th day) of meristems.

The experiments performed demonstrated the survival after cryopreservation in the all the meristem groups to be not lower than 80%. The integrity of pre-hardened and cryopreserved in 3-component cryoprotective media meristems almost did not differ from that in non-hardened ones (90–95%, correspondingly). For the meristems, cryopreserved in 2-component media, this index for non-hardened and hardened ones was 80–85% and 90–95%, correspondingly. The viability indices of cryopreserved meristems by the absolute values were lower than those of integrity, but in this case 3-component cryoprotective media were more efficient (75 and 60% of live meristems), compared to the 2-component ones (50 and 25%).

The viability of meristems, frozen without cryoprotectants for non-hardened and hardened samples made 55 and 70%, correspondingly. This testifies to a good state of the object and efficient regimen of freeze-thawing.