

Оптимизация метода витрификации меристем картофеля

Т.Ф. СТРИБУЛЬ, Н.А. ШЕВЧЕНКО, Л.Ф. РОЗАНОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Optimizing Method for Potato Meristem Vitrification

T.F. STRIBUL, N.A. SHEVCHENKO, L.F. ROZANOV

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Представлены сравнительные данные криоконсервирования меристем картофеля по разным протоколам замораживания. Исследована возможность варьирования условиями подготовки апексов (верхушечных точек роста) к криоконсервированию с использованием метода витрификации. Предложен витрифицирующий раствор модифицированного состава PVSN. Установлена возможность исключения некоторых этапов предварительной подготовки меристем к замораживанию без потери сохранности криоконсервированного материала.

Ключевые слова: картофель, меристема, криоконсервирование, витрификация, витрифицирующий раствор.

Представлено порівняльні результати криоконсервування меристем картоплі за різними протоколами заморожування. Досліджена можливість варіювання умовами підготовки апексів до криоконсервування з використанням методу вітрифікації. Запропоновано розчин модифікованого складу PVSN, який вітрифікується. Установлена можливість виключення деяких етапів попередньої підготовки меристем до заморожування без втрати цілості криоконсервованого матеріалу.

Ключові слова: картопля, меристема, криоконсервування, вітрифікація, розчин для вітрифікації.

Comparative data of potato meristem cryopreservation according to different freezing protocols are shown. The possibility to vary conditions for apices (shoot-tips) preparing to cryopreservation using vitrification method was investigated. There was proposed a vitrification PVSN solution with modified composition. A possibility to exclude some steps of preliminary meristem preparing to freezing with no loss in integrity of cryopreserved material was established.

Key-words: *Solanum tuberosum*, meristem, cryopreservation, vitrification, vitrification solution.

В последнее время при длительном хранении вегетативно размножающихся и тропических видов растений широко применяется криоконсервирование на основе метода витрификации [15]. Для разработки метода криоконсервирования растений, размножающихся клубнями, модельным объектом является картофель *Solanum tuberosum*. Существует много методов замораживания меристем картофеля, однако наиболее часто используются капельный метод (меристемы после высечения помещают в капельки 10%-го ДМСО на открытую пластину и замораживают прямым погружением в жидкий азот [8, 13]) и 2-этапный (контейнеры с меристемами, насыщенными 10%-м ДМСО, охлаждают со скоростью 0,3-0,5°C/мин до -40°C и затем погружают в жидкий азот) [19]. Метод витрификации для криоконсервирования меристем картофеля используется редко, что связано со сложностью подготовки материала к замораживанию.

При криоконсервировании биологических объектов методом витрификации используют смеси различных криопротекторов. В Японии группой Sakai разработана серия растворов PVS (plant vitrification solution): раствор PVS1 – для замораживания клеточной суспензии и меристемальных тканей *Asparagus* [20], раствор PVS2 изначально был предложен для криоконсерви-

Cryopreservation, based on vitrification method has been recently applied for a long-term storage of clonal and tropic plant species [15]. *Solanum tuberosum* potato is a model object to develop cryopreservation method for tuber-bearing plant. There are many methods for potato meristem freezing, but the most often applied is a droplet one (meristems after cutting are placed in 10% DMSO drops on an open plate and frozen by a direct immersion into liquid nitrogen [8, 13]) and 2-step one (containers with 10% DMSO-saturated meristems are cooled with 0.3-0.5°C/min rate down to -40°C and then immersed into liquid nitrogen [19]). Vitrification method for potato meristem cryopreservation is not frequently used due to a difficult material preparing to freezing.

When cryopreserving biological objects using vitrification method one uses mixtures of different cryoprotectants. In Japan the Sakai's group has developed PVS (plant vitrification solution): PVS1 solution to be applied for freezing cell suspension and *Asparagus* meristematic tissues [20]; PVS2 was initially proposed to cryopreserve citrus cell culture [16], but now it is successfully applied for apices of more than 200 plant species, including potato [7]; PVS3 solution is for *Wasabi*, *Asparagus*, *Allium* meristem cryopreservation [9], and PVS4 for *Wasabi* meristems [12]. In USA the group of researchers headed by

Адрес для корреспонденции: Стрибуль Т.Ф., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Stribul T.F., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

рования культуры клеток цитрусовых [16], однако сейчас успешно применяется для криоконсервирования апексов более 200 видов растений, включая картофель [7]; раствор PVS3 – для криоконсервирования меристем *Wasabi*, *Asparagus*, *Allium* [9], а PVS4 – меристем *Wasabi* [12]. В США группой исследователей под руководством Steponkus разработан раствор, включающий несвойственный растениям компонент – бычий альбумин, который используется для криоконсервирования клеточной суспензии *Brassica*, протопластов риса [11], гвоздики [10], батата, меристем картофеля [5]. Группа Towill для замораживания меристем мяты и батата применяет раствор, содержащий высокомолекулярный криопротектор ПЭО-8000 [18].

Многие исследователи получают высокий процент жизнеспособности при использовании раствора PVS2 по методике, которая стала классической. Метод основан на предварительном культивировании выделенных для замораживания меристем на питательных средах с повышенной концентрацией сахарозы, обработке криопротекторами и дегидратации меристем высокими концентрациями витрифицирующихся растворов при пониженных температурах с последующим отмыванием после оттаивания [17].

Предварительное культивирование высеченных апексов на питательных средах, обогащенных сахарозой (0,3-0,7 М), является первым этапом подготовки. Существует предположение, что на этом этапе происходит накопление сахаров, которые увеличивают стабилизацию мембран в условиях сильной дегидратации [4].

Помещение апексов непосредственно в PVS часто приводит к повреждению клеток из-за высокой осмотичности раствора. Чтобы избежать этого, проводят этап предварительного насыщения меристем криопротектором: апексы выдерживают при комнатной температуре в течение 20 мин в растворе, который состоит из 2 М глицерина и 0,4-0,6 М сахарозы [7]. На этом этапе наблюдается сильный плазмолиз клеток, который сопровождается незначительным проникновением глицерина в цитозоль [12]. Предполагается, что положительный эффект действия насыщающего раствора обусловлен концентрированием в клетке криопротекторных веществ, накопленных в течение предварительного культивирования с сахарозой и защитного действия первичного плазмолиза. Наличие насыщающего раствора в околопротопластном пространстве плазмолизированной клетки может также уменьшать механический стресс, вызванный сильной дегидратацией [12].

По стандартной методике [10, 12] дегидратацию проводят в два этапа. Сначала меристемы

Steponkus has developed the solution, including a non-inherent to plant component: bovine albumin, which is used to cryopreserve *Brassica* cell suspension, protoplasts of rice [11], pink [10], sweet potato, potato meristems [5]. Towill's group applies the solution, containing high molecular PEO-8000 cryoprotectant for mint and sweet potato meristem freezing [18].

Many researchers obtain high viability percentage when using PVS2 solution according to the technique, which became the standard one. The method is based on a preliminary culturing of isolated for freezing meristems in nutritive media with an increased sucrose concentration, the treatment with cryoprotectants and meristem dehydration with high concentrations of vitrification solutions at decreased temperatures with following washing-out after thawing [17].

Preliminary culturing of cut apexes in sucrose-enriched (0.3-0.7 M) nutritive media is the first stage of preparation. This step assumes the occurrence of accumulation of sugars, increasing membrane stabilisation under strong dehydration conditions [4].

Placing of apexes directly into PVS often results in their damages, caused by a high osmotic rate of solution. To avoid this a step of preliminary meristem saturation with cryoprotectant is carried-out: apexes are exposed at room temperature for 20 min in the solution, comprising 2 M glycerol and 0.4-0.6 M sucrose [7]. At this step a significant cell plasmolysis, accompanied by a slight glycerol penetration into cytosol is observed [12]. Even though the effect mechanism of treatment is unclear, a positive influence of saturating solution is considered to be a result of concentration in cell of cryoprotective substances, accumulated during preliminary cultivation with sucrose and a protective effect of primary hemolysis. Presence of saturating solution in adjacent to protoplast space of plasmolyzed cells can also reduce a mechanical stress, caused by a strong dehydration [12].

According to the standard methods [10, 12] a dehydration is carried-out in two steps: meristems are initially exposed into a half concentration of vitrification solution and then in 100% one. Two-step treatment was shown as enabling to increase the percentage of apex viability after cryopreservation [21].

Step of washing-out of cryoprotectant and sample's rehydration are the most often carried-out in a reverse order to the stage of preparing for cryopreservation.

Meristem cryopreservation using the method, proposed by Steponkus group as well as PVS2-based cryopreservation, assume the step of preliminary cultivation, but in cultivation medium one does not add sucrose but sorbitol. This method also comprises saturation step, but 1.5M ethylene glycol is used instead of glycerol and sucrose mixture. Conditions for sample exposure in cryoprotectant solution are various for different cultures [10, 11] (Table 1).

выдерживают в витрифицирующемся растворе 50%-й концентрации, а затем в 100%-й. Было показано, что 2-этапная обработка позволяет увеличить процент жизнеспособности апексов после криоконсервирования [21].

Этап отмывания от криопротектора и регидратацию образцов проводят в порядке, обратном этапу подготовки к криоконсервированию.

Криоконсервирование меристем методом, предложенным группой Steponkus, как и криоконсервирование на основе PVS2, предполагает наличие этапа предварительного культивирования, однако в среду культивирования добавляют не сахарозу, а сорбитол. Этап насыщения также присутствует в этом методе, но вместо смеси глицерина и сахарозы используется 1,5 М этиленгликоль. Условия выдерживания образцов в растворе криопротектора различны для разных культур [10, 11] (табл. 1).

Рассмотренные методы криоконсервирования имеют ряд недостатков: в составе PVS2 присутствует ДМСО, который, как известно, обладает мутагенным действием [6]. Кроме того, предложенные витрифицирующиеся растворы предполагают использование сложной процедуры подготовки объектов к криоконсервированию.

Все растворы готовятся на питательной среде (без сахарозы), которая используется для культивирования исходного материала [14].

Цель наших исследований – модификация раствора PVS: исключение из его состава ДМСО без потери высокой криозащитной эффективности среды и определение возможности упрощения протокола криоконсервирования при использовании модифицированного раствора PVS.

Материалы и методы

В работе использовали картофель сорта Косынь. Материал для исследования получали введением в культуру верхушек этиолированных проростков клубней картофеля [1] и выращиванием *in vitro* растений на искусственной питательной среде, включающей соли по Murashige and Skoog [14], витамины B₁, B₆, никотиновую кислоту – по 1 мг/л. Значение pH питательной среды довели до 5,7-5,8. Затем среду стерилизовали автоклавированием, после этого добавляли стимуляторы роста: по 0,5 мг/л кинетина и индолилуксусной кислоты. Фитогормоны фильтровали через стерильные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

Условия выращивания побегов: температура 24-26°C, освещённость 2-3 тыс. лк, фотопериод 16 ч день / 8 ч ночь [9, 19]. Через 7-8 недель вырастали побеги с 5-8 междоузлиями. Размножали растения микрочеренкованием первичных побегов картофеля и затем последующим выра-

Таблица 1. Состав различных витрифицирующихся растворов, используемых для криоконсервирования растительного материала

Table 1. Composition of different vitrification solutions used for plant material cryopreservation

Раствор Solution	Состав Composition
PVS1	22% глицерина + 13% 1,2-ПА + 13% ЭГ + 6% ДМСО + 0,4 М сахарозы 20% glycerol + 13% 1,2-PD + 13% EG + 6% DMSO + 0.4 M sucrose
PVS2	30% глицерина + 15% ЭГ + 15% ДМСО + 0,4 М сахарозы 30% glycerol + 15% EG + 15% DMSO + 0.4 M sucrose
PVS3	50% глицерина + 50% сахарозы 50% glycerol + 50% sucrose
PVS4	35% глицерина + 20% ЭГ + 0,6 М сахарозы 35% glycerol + 20% EG + 0.6 M sucrose
Раствор Steponkus Steponkus solution	50% глицерина + 15% сорбитола + 6% бычьего альбумина + 0,4 М сахарозы 35% glycerol + 10% DMSO + 10% PEG-8000 + 0.4 M sucrose
Раствор Towill Towill solution	35% глицерина + 10% ДМСО + 10% ПЭГ-8000 + 0,4 М сахарозы 35% glycerol + 10% DMSO + 10% PEG-8000 + 0.4 M sucrose

All solutions are prepared in cultural medium (without sucrose), that is used for initial material cultivation [11, 12, 14].

The investigation was aimed to the PVS solution modification: excluding DMSO from its composition with no loss in a high cryoprotective medium efficiency and determination of a possibility to simplify the cryopreservation protocol when using modified PVS solution.

Materials and methods

“Kosyn” potato was used in the work. Material for investigation was obtained by introducing into culture the apices of potato tuber etiolated sprouts [1] and by *in vitro* cultivating plants with artificial nutritive medium, comprising salts according to Murashige and Skoog [14], vitamins B₁, B₆, nicotine acid by 1 mg/l. Nutritive media were brought up to 5.7-5.8 pH. Then the medium was sterilised by autoclaving and the following growth stimulators were added: 0.5 mg/l kinetin, 0.5 mg/l indoleacetic acid (IAA). Plant hormones were passed through sterile filters with 0.22 µm diameter.

Conditions for sprout cultivation were as follows: 24-26°C, 2-3 thous. lux light intensity, 16 hrs day/8hrs night photoperiod [9, 19]. In 7-8 weeks sprouts with 5-8 internodes grew. Plants were propagated by micrografting primary potato sprouts and then cultivated under the same conditions up to the sprout obtaining with 5-8 internodes from each microshoot. The procedure of micropropagation was repeated.

щиванием в аналогичных условиях до получения проростков с 5-8 междоузлиями из каждого микрочеренка. Процедуру микроразмножения повторяли до получения необходимого количества материала.

Материалом для криоконсервирования служили пазушные и верхушечные меристемы картофеля, выделяемые из *in vitro* выращенных растений. Апексы размером 0,2-0,5 мм вычленили в стерильных условиях под бинокляром, помещали в чашки Петри с питательной средой и добавляли 0,2 мг/л гиббереллиновой кислоты (ГК₃). Затем меристемы культивировали в стандартных условиях в течение суток.

Нами было исследовано несколько вариантов подготовки апексов к замораживанию (табл. 2). Проведено криоконсервирование по классическому методу витрификации с PVS2 и прохождением всех этапов подготовки к замораживанию; исследована возможность использования модифицированного нами состава PVS (PVSN: 1 М сахарозы + 2 М глицерина + 2,5 М ЭГ) со всеми этапами предварительной подготовки к криоконсервированию или исключением некоторых из них, например этапа предварительного культивирования с сахарозой и/или этапа насыщения 50%-м раствором PVSN.

После подготовки меристемы помещали в контейнеры для замораживания. Контейнерами служили алюминиевые ячейки цилиндрической формы (высотой около 2 мм, диаметром ≈5 мм), состоящие из двух половинок, которые завальцовывали по диаметру. В каждый контейнер помещали по 3-4 апекса на кружке из фильтровальной бумаги, смоченной раствором криопротектора на питательной среде. Все этапы подготовки к криоконсервированию меристем проводились в стерильных условиях.

Alar and apical potato meristems, isolated from *in vitro* cultivated plants were material for cryopreservation. Apexes of 0.2-0.5 mm size were separated in sterile conditions under binocular, then placed in Petri dishes with nutritive medium and added 0.2 mg/l of hybberellin acid (HA₃). Afterwards meristems were cultivated under standard conditions for a day.

We investigated some variants of apex preparation to freeze (Table 2). Cryopreservation according to the standard vitrification method with PVS2 use and by realising all preparation steps to freezing was carried-out; a possibility to use the modified by us PVS composition (PVSN: 1M sucrose+2M glycerol+2.5 M ethylene glycol) with all steps of preliminary preparation to cryopreservation or excluding some of them, for example the step of preliminary cultivation with sucrose and/or saturation step with 50% PVS solution, was investigated.

After preparation the meristems were placed into containers for freezing. Aluminium cylinder shape-like wells (of about 2 mm height, ≈5 mm diameter), consisting of two halves, expanded by diameter, served as containers. In each container there were placed by 3-4 apexes on a filter paper circle, moistened with a cryoprotective solution in nutritive medium. All steps of meristem preparation to cryopreservation were carried-out under sterile conditions.

Freezing was performed by immersing containers with meristems directly into liquid nitrogen. At the same time cooling rate reached 6200±500°C/min. After exposure into nitrogen for 1-24 hrs meristems were thawed by a rapid container removal out of a liquid nitrogen into 40°C (25°C) water bath and exposed there for 1 min. Thawing rate was 14000±1600°C/min.

After thawing meristems were washed-out of cryoprotectants as follows: apexes after removal out of container were placed into a half PVSN solution,

Таблица 2. Варианты протоколов криоконсервирования меристем
Table 2. Variants of cryopreservation protocols for meristems

Варианты протоколов криоконсервирования Variants of cryopreservation protocols	Предварительное культивирование (1-й этап) Preliminary cultivation (1 st step)	Предварительное насыщение (2-й этап) Preliminary saturation (2 nd step)	Дегидратация (3-й этап) Dehydration (3 rd step)
I (классический метод) (standard method)	0,1М сахарозы – 3 сут, затем 0,7 М сахарозы – 1 сут 0.1M sucrose – 3 days then 0.7 M sucrose – 1 day	2 М глицерина + 0,4 М сахарозы – 20 мин, T=20°C 2M glycerol + 0.4 M sucrose – 20 min, T=20°C	50%-й PVS2 – 30 мин, T=20°C, 100%-й PVS2 – 30 мин, T=8°C 50% PVS2 – 30 min, T=20°C, 100% PVS2 – 30 min, T=8°C
II	0,5 М сахарозы – 1 сут 0.5 M sucrose – 1 day	50%-й PVSN – 60 мин, T=20°C 50% PVSN – 60 min, T=20°C	100%-й PVSN – 70 мин, T=8°C 100% PVSN – 70 min, T=8°C
III	0,5 М сахарозы – 1 сут 0.5 M sucrose – 1 day	Отсутствует Absent	100%-й PVSN – 70 мин, T=20°C 100% PVSN – 70 min, T=20°C
IV	Отсутствует Absent	50%-й PVSN – 70 мин, T=20°C 50% PVSN – 70 min, T=20°C	100%-й PVSN – 70 мин, T=8°C 100% PVSN – 70 min, T=8°C
V	Отсутствует Absent	Отсутствует Absent	100%-й PVSN – 35 мин, T=20°C 100% PVSN – 35 min, T=20°C

Замораживание осуществляли погружением контейнеров с меристемами непосредственно в жидкий азот. При этом скорость охлаждения достигала $6200 \pm 500^\circ\text{C}/\text{мин}$. После выдержки в азоте в течение 1-24 ч, меристемы отогревали быстрым перемещением контейнеров из жидкого азота в водяную баню с температурой 40°C и выдерживали в ней в течение 1 мин. Скорость отогрева $14000 \pm 1600^\circ\text{C}/\text{мин}$.

После отогрева меристемы отмывали от криопротекторов следующим образом: апексы после изъятия из контейнера помещали в половинный раствор PVSN, затем в 0,5 М раствор сахарозы (в опытах с модифицированным PVSN) или в половинный раствор PVS2, затем в 0,7 М раствор сахарозы (в опытах с PVS2). И наконец меристемы возвращали на исходную среду для их культивирования.

В течение суток после размораживания меристемы находились в темноте, так как по данным [3] их культивирование после замораживания при сильном освещении усиливает процессы перекисного окисления. Затем меристемы помещали в фитотрон в стандартные условия культивирования растений картофеля. Сохранность криоконсервированного материала оценивали на 5-й день культивирования.

Сохранность апексов после криоконсервирования оценивали визуально по их внешнему виду. Меристемы, которые не изменили зелёной окраски сразу после размораживания и в течение 5 последующих суток культивирования их *in vitro* на питательной среде, считали сохранными. За это время живые меристемы, как правило, несколько увеличивались в размерах. Однако контрольные (не подвергавшиеся замораживанию) меристемы за время наблюдения развивались лучше и по размерам превышали опытные примерно в 1,5 раза.

Статистическая обработка результатов проведена по методу Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Как следует из табл. 3, при использовании в подготовке к криоконсервированию классического витрифицирующегося раствора PVS2, результаты сохранности меристем картофеля сорта Косынь оказались относительно низкими не только для криоконсервированных апексов (20%), но и для контрольных (прошедших только обработку криозащитной средой) образцов (50%). В работе [2] при использовании данного витрифицирующегося раствора были получены более высокие показатели сохранности криоконсервированного материала. Однако побеги картофеля, из которых выделялись меристемы для эксперимента, предварительно были подвергнуты холо-

then into 0.5M sucrose solution (in experiments with modified PVSN) or in 0.7M sucrose one (in experiments with PVS2). And finally meristems were got back into initial medium for their cultivation.

Meristems were placed into a dark for a day after freeze-thawing, because according to the data [3] their cultivation after freezing at an intense light strengthened the lipid peroxidation processes. Meristems were then placed into a phytotron under the standard conditions for potato plant culturing. Integrity of cryopreserved material was estimated to the 5th day of culturing.

Apex integrity after cryopreservation was visually evaluated by their external appearance. Meristems with no change in green colour right after freeze-thawing and for next 5 days of their *in vitro* culturing in nutritive medium were considered as the integral ones. Generally, for this time period the living meristems slightly increased in sizes. However the control (not subjected to freezing) meristems developed better during observation and exceeded the experimental ones in size approximately in 1.5 times.

Results were statistically processed using Student's method.

Results and discussion

As summarised in the Table 3, when using standard vitrification PVS2 solution in preparing to cryopreservation the results of integrity in "Kosyn" potato meristems occurred to be relatively low not only for cryopreserved apices (20%), but for the control (being treated only with cryoprotective medium) samples too (50%). In the work [2] higher indices of cryopreserved material integrity were obtained when using this vitrification solution. However the potato sprouts, from where the meristems were isolated by us for experiment, were preliminarily subjected to cold hardening, that apparently made them more resistant to the effect of both PBS2 solution and freezing [2].

As also detailed in the Table 3, the modified vitrification PVSN solution at all variants of meristem treatment protected the object more efficiently in comparison with the standard PVS2.

When meristems underwent all 3 steps of preparation to freezing (Table 2) (variant II) the integrity of control and cryopreserved apices did not statistically and significantly differ within the limits of measurement error.

The highest percentage of damages is observed when excluding the 2nd step of preparation to freezing (Table 2, variant III). In this variant there was obtained a relatively low integrity of control apices. This is apparently related to the fact, that in the considered variant the dehydration with cryoprotective medium PVSN was carried-out not at a decreased (8°C), but at room temperature (20°C).

довой закалке, что, по-видимому, сделало их более устойчивыми как к действию раствора PVS2, так и к замораживанию [2].

Из табл. 3 также следует, что модифицированный витрифицирующий раствор PVSN при всех вариантах обработки меристем более эффективно защищал объект по сравнению с классическим PVS2.

Когда меристемы были подвержены прохождению всех 3-х этапов подготовки к замораживанию (вариант II, табл. 2), сохранность контрольных и криоконсервированных апексов достоверно не отличалась в пределах ошибки измерения. В остальных вариантах процент жизнеспособных меристем в контроле превышал этот показатель в опыте.

Наибольший процент повреждений наблюдался при исключении 2-го этапа подготовки к замораживанию (вариант III, табл. 2). В этом варианте получена относительно низкая сохранность контрольных апексов. По-видимому, это связано с тем, что в рассматриваемом варианте дегидратация криозащитной средой PVSN осуществлялась не при пониженной температуре (8°C), а при комнатной (20°C).

Вместе с тем в последнем варианте (V, табл. 2) при использовании одноэтапной дегидратации и исключении всех этапов предварительной подготовки к замораживанию результат сохранности после замораживания составлял 82% (табл. 3). В данном случае, хотя выдерживание меристем в смеси криопротекторов производилось и при комнатной температуре, однако время выдержки при этом было вдвое меньше, чем в варианте III (табл. 2), т. е. 35 мин.

Таким образом, в результате проведенного исследования по усовершенствованию метода сверхбыстрого замораживания меристем картофеля (на примере картофеля сорта Косынь) установлено, что при отсутствии предварительного закалывания растений, с которых вычлняются апексы для эксперимента, использование при подготовке к криоконсервированию модифицированного витрифицирующегося раствора PVSN имеет преимущество перед классическим PVS2.

Таблица 3. Сохранность криоконсервированных меристем картофеля после размораживания на 5-й день культивирования
Table 3. Integrity of cryopreserved potato meristems after freeze-thawing to the 5th day of culturing

Витрифицирующий раствор Vitrification solution	Протоколы криоконсервирования (согласно табл. 2) Cryopreservation protocols (according Table 2)									
	I		II		III		IV		V	
	contr	exp	contr	exp	contr	exp	contr	exp	contr	exp
PVS2	50±9	20±2*								
PVSN			90±6	79±8	75±8	57±6*	95±3	78±7*	95±5	82±6*

Примечания: contr – контроль: меристемы, подвергшиеся тем же этапам подготовки к замораживанию и той же процедуре отмывания от криопротекторов, что и соответствующие опытные (exp), но не замораживаемые;

* – различие достоверно по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$.

Notes: contr – are the control meristems, subjected to the same steps of preparation to freezing and the same procedure of washing-out of cryoprotectant as the corresponding experimental (exp) but not frozen ones;

* – difference is statistically significant in comparison with the control at $p \leq 0.05$

However in variant V (Table 2) when using one-step dehydration and excluding all steps of preliminary preparation to freezing the integrity result after freezing made 82%. In this case if though meristems were exposed in mixture of cryoprotectants and at room temperature, the exposure time was thereby twice lower than in the III variant, i.e. 35 min.

Thus, as a result of investigation on improving method for potato meristem ultrarapid freezing (with “Kosyn” potato as an example) it was established that without preliminary hardening of plants, from which one separated apexes for the experiment, the usage of modified vitrification PVSN solution in preparation for cryopreservation had the advantage of the standard PVS2. Cryopreservation procedure could be possibly simplified by exclusion of some steps of preparing to freezing. At the same time any loss of integrity in cryopreserved material in comparison with the same index in meristems, subjected to all recommended steps of preliminary treatment is not practically observed. In addition, the reduction of equilibration time with cryoprotectant at a final step of preparing to freezing can be used not at a decreased temperature, but under room temperature conditions.

The considered in this work methods for potato meristem cryopreservation, based on the possibility to exclude some steps of preparation to freezing when using PVSN can not be suggested as universal one because the investigations were done only in one potato breed.

Conclusions

1. Usage of modified vitrification PVSN solution as a cryoprotective medium for cryopreserving

Для упрощения процедуры криоконсервирования допустимо исключить некоторые этапы подготовки к замораживанию. При этом практически не наблюдается потери сохранности криоконсервированного материала по сравнению с аналогичным показателем у меристем, подвергнутым всем рекомендуемым этапам предварительной подготовки. Кроме того, сокращение времени эквипирации с криопротектором на последнем этапе подготовки к замораживанию может быть использовано не при пониженной температуре, а в условиях комнатной температуры.

Рассмотренные в данной работе методы криоконсервирования меристем картофеля, основанные на возможности исключения ряда этапов подготовки к замораживанию при использовании PVSN, нельзя считать универсальными, так как исследования были проведены только на одном сорте картофеля.

Выводы

1. Использование модифицированного витрифицирующегося раствора PVSN как криозащитной среды для криоконсервирования меристем картофеля сорта Косын имеет преимущества перед классическим раствором PVS2.

2. При использовании PVSN для подготовки меристем к замораживанию допускается исключение ряда этапов предварительной подготовки без ущерба для сохранности криоконсервированных апексов.

3. Для криоконсервирования меристем исследованного сорта картофеля может быть рекомендован максимально упрощенный метод подготовки к замораживанию (V вариант), состоящий не из трех, а одного этапа подготовки: эквипирации в PVSN с сокращенным вдвое временем при комнатной температуре.

Литература

1. Гончаров Н.Д., Кожушко Н.С., Рудь В.Д. Применение методов биотехнологии для селекции, оздоровления и размножения картофеля. – Харьков, 1987. – 66 с.
2. Шевченко Н.А. Сохранность меристем винограда и картофеля при использовании режимов быстрого замораживания // Пробл. криобиологии. – 2004. – №4. – С. 30-33.
3. Benson E.E., Harding K., Smith H. Variation in recovery of cryopreserved shoot-tips of *Solanum tuberosum* exposed to different pre- and postfreeze light regims // *CryoLetters*. – 1989. – Vol. 10, N5. – P. 322-344.
4. Crowe J.H., Crowe L.M., Carpenter J.F. et al. Interaction of sugars with membranes // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1989. – Vol. 947. – P. 367-384.
5. Golmirzaie A.M., Panta A. Advances in potato cryopreservation at CIP // Proceedings of the JIRCAS/IPGRI Joint International Workshop 'Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application'. – Tsukuba, Japan, 1998. – P.205-211.

“Kosyn” potato meristems has the advantages of the standard PVS2 one.

2. When using PVSN for meristem preparing to freezing there is admitted to exclude some steps of preliminary preparation without damaging the cryopreserved apex integrity.

3. Maximally simplified method for preparation to freezing (variant V), consisting of one preparation step: equilibration with PVSN at twice reduced time at room temperature can be recommended to cryopreserve meristems of the investigated potato breed.

References

1. Goncharov N.D., Kozhushko N.S., Rud' V.D. Application of biotechnological methods for potato selection, recovery and propagation. – Kharkov, 1987. – 66 p.
2. Shevchenko N.A. Integrity of grape and potato meristems using rapid freezing regimens // *Problems of Cryobiology*. – 2004. – N4. – P. 30-33.
3. Benson E.E., Harding K., Smith H. Variation in recovery of cryopreserved shoot-tips of *Solanum tuberosum* exposed to different pre- and postfreeze light regims // *CryoLetters*. – 1989. – Vol. 10, N5. – P. 322-344.
4. Crowe J.H., Crowe L.M., Carpenter J.F. et al. Interaction of sugars with membranes // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1989. – Vol. 947. – P. 367-384.
5. Golmirzaie A.M., Panta A. Advances in potato cryopreservation at CIP // Proceedings of the JIRCAS/IPGRI Joint International Workshop 'Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application'. – Tsukuba, Japan, 1998. – P. 205-211.
6. Harding K., Staines H. Biometric analysis of phenotypic characters of potato shoot-tips recovered from tissue culture, dimethyl sulphoxide treatment and cryopreservation // *CryoLetters*. – 2001. – Vol. 22, N4. – P. 255-262.
7. Hirai D., Sakai A. Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of potato by encapsulation-vitrification // Proceedings of the JIRCAS/IPGRI Joint International Workshop 'Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application'. – Tsukuba, Japan, 1998. – P. 205-211.
8. Keller E.R.J., Dreiling M. Potato cryopreservation in Germany – using the droplet method for the establishment of a new large collection // *Plant Genetic Resources*. – 2003. – Vol. 623. – P. 193-200.
9. Kim H.H., Cho E.G., Back H.J. et al. Cryopreservation of garlic shoot tips by vitrification: effects of vitrification, rewarming, unloading and re-growth conditions // *CryoLetters*. – 2004. – Vol. 25, N1. – P. 59-70.
10. Langis R., Schnabel-Preikstas B., Early E.D., Steponkus P.L. Cryopreservation of carnation shoot tips by vitrification // *Cryobiology*. – 1990. – Vol. 27, N6. – P. 657-658.
11. Langis R., Steponkus P.L. Vitrification of isolated Rye protoplasts: protection against dehydration injury by ethylene glycol // *CryoLetters*. – 1990. – Vol. 12. – P. 107-112.
12. Matsumoto T., Sakai A., Nako Y. A novel precutting for enhancing the survival of *in vitro* grown meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) cooled to -196°C by vitrification // *CryoLetters*. – 1998. – Vol. 19. – P. 27-36.
13. Mix-Wagner G., Schumacher H.M., Cross R.G. Recovery of potato apices after several years of storage in liquid nitrogen // *CryoLetters*. – 2003. – Vol. 24, N1. – P. 33-41.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid grown and bioassay with tobacco tissue culture // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.

6. *Harding K., Staines H.* Biometric analysis of phenotypic characters of potato shoot-tips recovered from tissue culture, dimethyl sulphoxide treatment and cryopreservation // *CryoLetters*.– 2001.– Vol. 22, N4.– P. 255-262.
7. *Hirai D., Sakai A.* Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of potato by encapsulation-vitrification // Proceedings of the JIRCAS/IPGRI Joint International Workshop 'Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application'.– Tsukuba, Japan, 1998.– P.205-211.
8. *Keller E.R.J., Dreiling M.* Potato cryopreservation in Germany – using the droplet method for the establishment of a new large collection // *Plant Genetic Resources*.– 2003.– Vol. 623.– P. 193-200.
9. *Kim H.H., Cho E.G., Back H.J. et al.* Cryopreservation of garlic shoot tips by vitrification: effects of vitrification, rewarming, unloading and re-growth conditions // *CryoLetters*.– 2004.– Vol. 25, N1.– P. 59-70.
10. *Langis R., Schnabel-Preikstas B., Early E.D., Steponkus P.L.* Cryopreservation of carnation shoot tips by vitrification // *Cryobiology*.– 1990.– Vol. 27, N6.– P. 657-658.
11. *Langis R., Steponkus P.L.* Vitrification of isolated rye protoplasts: protection against dehydration injury by ethylene glycol // *CryoLetters*.– 1990.– Vol. 12.– P. 107-112.
12. *Matsumoto T., Sakai A., Nako Y.* A novel precutting for enhancing the survival of *in vitro* grown meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) cooled to –196°C by vitrification // *CryoLetters*.– 1998.– Vol. 19.– P. 27-36.
13. *Mix-Wagner G., Schumacher H.M., Cross R.G.* Recovery of potato apices after several years of storage in liquid nitrogen // *CryoLetters*.– 2003.– Vol. 24, N1.– P. 33-41.
14. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid grown and bioassay with tobacco tissue culture // *Physiologia Plantarum*.– 1962.– Vol. 15.– P. 473-497.
15. *Sakai A.* Development of cryopreservation techniques // Proceedings of the JIRCAS/IPGRI Joint International Workshop 'Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application'.– Tsukuba, Japan, 1998.– P. 1-7.
16. *Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I.* Cryopreservation of nuclear cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification // *Plant Cell Reports*.– 1990.– Vol. 9.– P. 30-33.
17. *Takagi H.* Recent development in cryopreservation of shoots apices of tropical species // Proceedings of the JIRCAS/IPGRI Joint International Workshop 'Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application'.– Tsukuba, Japan, 1998.– P.178-193.
18. *Towill L.E.* Cryopreservation of isolated mint shoot tips by vitrification // *Plant Cell Report*.– 1990.– Vol. 9.– P. 178-180.
19. *Towill L.E.* Survival at ultra-low temperatures of shoot-tips from groups Andigena, Phureja, Stenotomum, Tuberosum and other tuber-bearing S. species // *CryoLetters*.– 1984.– Vol. 5, N5.– P. 319-326.
20. *Uragami A., Sakai A., Nagai M.* Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L grown *in vitro* // *Plant Cell Report*.– 1990.– Vol. 9.– P. 328-331.
21. *Wu Y., Engelmann F., Zhao Y.* Cryopreservation of apple *in vitro* germplasm in China // Proceedings of the JIRCAS/IPGRI Joint International Workshop 'Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application'.– Tsukuba, Japan, 1998.– P. 473-475.

Accepted in 2.02.2004

Поступила 2.02.2004