

Корисна модель належить до кріобіології і може бути використана у сільському господарстві та в біотехнологічній галузі при розмноженні цінних і рідкісних культур рослин та виведенні нових сортів.

Відомий спосіб кріоконсервування меристем часнику методом вітрифікації, згідно з яким здійснюють попередню обробку меристем шляхом витримки їх протягом ночі при 25°C на живильному середовищі MS, після чого проводять дегідратацію в 2 етапи: на першому - в розчині кріопротекторів 2М гліцерину та 0,4М сахарози, на другому - в розчині, що вітрифікується - PVS 3, який містить кріопротектори 50% гліцерину та 50% сахарози на живильному середовищі. Заморожують шляхом занурення контейнерів з меристемами у рідкий азот. Відігрівають у водяній бані з температурою 40°C. Відмивають від кріопротекторів у 1,2М розчині сахарози, приготованому на середовищі MS [1].

Недоліком даного способу є низька життєздатність меристем часнику сорту «Мереф'янський білий» - 5-8%.

Відомий спосіб кріоконсервування меристем часнику методом вітрифікації, в якому попередню обробку проводять протягом 3 дб на середовищі MS зі вмістом сахарози 0,3М, при 10°C, дегідратацію здійснюють в два етапи: на першому - висушування в потоці стерильного повітря протягом 1 години, на другому - витримка протягом 150хв в розчині, що вітрифікується - PVS 3. Заморожують шляхом занурення контейнерів з меристемами у рідкий азот. Відігрівають у водяній бані з температурою 40°C.

Відмивають від кріопротекторів у 1,2М розчині сахарози, приготованому на середовищі MS [2].

Недоліком даного способу є низька (нижче 5%) життєздатність меристем часнику сорту «Мереф'янський білий» і складність його виконання, яка пов'язана з проведенням 2-етапної дегідратації.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб кріоконсервування меристем часнику методом вітрифікації, згідно з яким проводять попередню обробку меристем часнику шляхом культивування їх протягом ночі при 25°C на середовищі MS зі вмістом сахарози 0,3М, далі здійснюють дегідратацію в 2 етапи: на першому - в розчині, що містить 2М гліцерину та 0,4М сахарози, на другому - в розчині, що вітрифікується - PVS 3, після чого їх поміщують у контейнери і заморожують шляхом занурення контейнерів у рідкий азот. Відігрівають у водяній бані при 40°C. Відмивають від кріопротекторів у 1,2М розчині сахарози, приготованому на середовищі MS [3].

Недоліком цього способу кріоконсервування щодо меристем сорту «Мереф'янський білий», є їх низька життєздатність на пізніх стадіях розвитку, що зв'язано з утворенням калюсу при культивуванні збережених меристем, а також складність виконання способу через двоетапну дегідратацію.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити такий спосіб кріоконсервування меристем часнику сорту «Мереф'янський білий», в якому би, за рахунок зміни умов дегідратації та відмивання, забезпечувалась можливість підвищення показників життєздатності при одночасному спрощенні процедури кріоконсервування.

Ця задача вирішується тим, що у способі кріоконсервування меристем часнику сорту «Мереф'янський білий», який включає попередню обробку шляхом культивування меристем на середовищі MS зі вмістом 0,3М сахарози, дегідратацію розчином, що вітрифікується, поміщення в контейнери, заморожування у рідкому азоті, відігрів та відмивання від кріопротекторів розчином сахарози на середовищі MS, відповідно до корисної моделі, дегідратацію меристем проводять із застосуванням розчину, що вітрифікується PVS N, а відмивання від кріопротектора після розморожування проводять розчином 0,3М сахарози на середовищі MS.

PVS N являє собою розчин, що містить кріопротектори 1М сахарози, 2М гліцерину та 2,5М етиленгліколю на живильному середовищі [4].

Використання для дегідратації розчину, що вітрифікується - PVS N (замість класичного PVS 3), а для відмивання - розчину сахарози на середовищі MS з концентрацією 0,3М, дозволяє уникнути утворення калюсу і отримати прямиї рости пагонів із збережених після розморожування меристем сорту «Мереф'янський білий», що забезпечує підвищення їх життєздатності на 42%, а також виключити перший етап дегідратації і тим самим спростити процедуру кріоконсервування.

Приклад здійснення способу:

Зубки часнику сорту «Мереф'янський білий», що знаходились у стані спокою, дезинфікували, після чого з них в стерильних умовах виділяли меристеми, які піддавали попередній обробці. Для цього їх поміщали на живильне середовище MS, зі вмістом сахарози 0,3М і витримували на ньому 16 годин при температурі 25°C, в темряві. За цей час нежиттєздатні меристеми, які були пошкоджені при виділенні з проростків, загинули. Потім меристеми дегідратували протягом 120хв розчином, що вітрифікується -PVS N і поміщали в поліетиленові контейнери ємністю 1,8см³, які герметично закривали. Контейнери занурювали у рідкий азот. Відігрів здійснювали шляхом поміщення контейнерів з меристемами у водяну баню з температурою 40°C. Відмивання від кріопротекторів проводили у 0,3М розчині сахарози на живильному середовищі. Для порівняння здійснювали спосіб за прототипом (дегідратацію проводили в 2 етапи: на першому - в розчині 2М гліцерину та 0,4М сахарози, на другому - в розчині PVS 3; відмивання від кріопротекторів - у 1,2М розчині сахарози на живильному середовищі). Після цього меристеми переносили на середовище для культивування - MS з фітогормонами (кінетин - 1мг/л, індолилцтова кислота - 1мг/л) і витримували на ньому в темряві протягом ночі. Подальше культивування меристем проводили на цьому середовищі за стандартних умов. Збереженість меристем після заморожування оцінювали шляхом мікроскопії. Меристеми, які одразу після розморожування зберегли зелене забарвлення і мали позитивну динаміку росту протягом 5 днів подальшого культивування на живильному середовищі, вважали збереженими. Крім того, збережені меристеми або були повністю цілими, або у них були пошкоджені тільки клітини субапикальної тканини. Якщо пошкодження поширювалося і на клітини апікального конусу, їх вважали загиблими, тому що у подальшому культивуванні такі меристеми виявлялися нежиттєздатними. Життєздатність визначали шляхом спостереження за розвитком збережених меристем. Оскільки вихідний генотип гарантовано може бути відтворений лише з паростків, то життєздатними вважали меристеми, які після заморожування-відігріву перетворились не в калюс, а в пагони з листами і коренями. Результати збереженості та життєздатності меристем часнику представлені у таблиці. Як видно з таблиці, показники збереженості розморожених меристем на 5 день культивування в заявленому способі на рівні прототипу. На 90-й день культивування меристем, кріоконсервованих за прототипом, збереженість складала 53%, але всі вони утворювали калюс, тобто ці меристеми вважалися нежиттєздатними. При культивуванні меристем, кріоконсервованих за заявленим

способом, збереженими виявилися 42% апексів і всі вони відтворили одностеблеві паростки - тобто були життєздатними.

Таблиця

Збереженість та життєздатність меристем часнику
сорту «Мереф'янський білий» після кріоконсервування

Спосіб кріоконсервування	Збереженість, % (5-й день після розморожування)	Збереженість, % (90-й день після розморожування)	Життєздатність, % (90-й день після розморожування)	
			калюс	паростки
Прототип	92±3	53±3	53±3	0
Заявлений	92±5	42±7	0	42±7

Джерела інформації

1. Makowska Z., Keller E.R.J., Engelmann F. Cryopreservation of apices isolated from garlic (*Allium sativum* L.) bulbils and cloves /Cryo-Letters. - 1999. - Vol.20. - P.175-182.

2. Kim H.H., Cho E.G., Baek H.J., Kim C.Y., Keller E.R.J., Engelmann F. Cryopreservation of garlic shoot tips by vitrification: effects of dehydration, rewarming, unloading and regrowth conditions /Cryo-Letters. - 2004. - Vol.25. - P.59-70.

3. Keller E.R.J. Cryopreservation of *Allium sativum* L. (Garlic) /Biotechnology in Agriculture and Forestry. - 2002. - Vol.50. - P.37-47.

4. Стрибуль Т.Ф., Шевченко Н.А.Розанов Л.Ф. Оптимизация метода витрификации меристем картофеля. Проблемы криобиологии. - 2005. - т.15, №4. - С.657-664