

Сохранность меристем винограда и картофеля при использовании режимов быстрого замораживания

Н.А. ШЕВЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Integrity of Grape and Potato Meristems Using Rapid Freezing Regimens

N.A. SHEVCHENKO

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

Исследовали влияние метода быстрого замораживания с использованием витрифицирующегося раствора PVS2 на меристемы картофеля и винограда. Приведены результаты сохранности меристем на 5-е сутки культивирования после криоконсервирования.

Ключевые слова: меристема, дегидратация, криоконсервирование, витрифицирующийся раствор, быстрое замораживание, плазмоллиз.

Досліджували вплив методу швидкого заморожування з використанням розчину для вітрифікації PVS2 на меристеми картоплі та винограду. Наведено результати цілості меристем на 5-ту добу культивування після криоконсервування.

Ключові слова: меристема, дегідратація, криоконсервування, розчин для вітрифікації, швидке заморожування, плазмоліз.

The effect of the rapid freezing method using PVS2 vitrifying solution on potato and grape meristems was under study. There were presented the results of meristem integrity to the 5th day of culturing after cryopreservation.

Key-words: meristem, dehydration, cryopreservation, vitrifying solution, rapid freezing, plasmolysis.

Для хранения генетической плазмы растений, размножающихся вегетативным путем, наиболее часто используют меристемы, из которых при успешном криоконсервировании можно получить образцы, свободные от вирусов, идентичные материнскому растению [1]. Существуют две основные группы методов криоконсервирования: классические, основанные на медленном охлаждении до определенной субнулевой температуры с дальнейшим погружением в жидкий азот; и методы, основанные на витрификации [2]. Особый интерес в наших исследованиях представляют методы быстрого замораживания.

По данным [11], при медленном замораживании необходим длительный этап культивирования после отогрева, так как возможен рост проростков через стадию каллусообразования, а при быстрых режимах замораживания все сохраненные меристемы образуют побеги. В работе использовали метод быстрого замораживания на основе витрифицирующихся растворов. Впервые высокие концентрации витрифицирующихся растворов применил Fahy для криоконсервирования эмбрионов животных [3]. Криопротекторы в высоких концентрациях существенно дегидратируют цитозоль без повреждений, так что он переходит в витрифицированное состояние при помещении в жидкий азот. Наиболее часто для криоконсервирования меристем используют малотоксичный витрифицирующийся раствор PVS2 (plant vitri-

To store genetic plasma of plants, whose propagation is vegetative, the meristems, able the producing of virus-free samples identical to mother plant, are used more frequently [1]. There are main cryopreservation methods: classic ones, based on slow cooling down to certain subzero temperature with following immersion into liquid nitrogen and those based on vitrification [2]. The methods of rapid freezing are of special interest.

According to the papers [11] under slow freezing the long stage of culturing after thawing is essential, because the growth of out-growings via the stage of callus-formation is feasible, and under rapid freezing regimens all survived meristems form the sprouts. In our research we used the method of rapid freezing basing of vitrifying solutions. For the first time high concentrations of vitrifying solutions were applied by Fahy to cryopreserve animal embryos [3]. Cryoprotectants under high concentrations significantly dehydrate cytosol without damages so that it getting vitrified when placing into liquid nitrogen.

Glycerol-based vitrifying solution of low toxicity is frequently used to cryopreserve meristems: PVS2 (plant vitrification solution), 30% glycerol+15% ethylene glycol+15% DMSO +0.4% sucrose in liquid nutrient that does not penetrate into cytosol during dehydration [11].

To strengthen the resistance to a strong dehydration the plants are treated. Cut apices of growing germs, hardened under lowered temperatures *in vitro*, are pre-cultured in the medium with high concentration of

Адрес для корреспонденции: Шевченко Н.А., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 777-42-84, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Shevchenko N.A., Institute for Problems of Cryobiology&Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str.,Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 777 4284, fax: +380 57 772 0084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

fication solution), имеющий глицериновую основу: 30% глицерина + 15% этиленгликоля + 15% ДМСО + 0,4М сахарозы в жидкой питательной среде, который не проникает в цитозоль в течение процесса дегидратации [11].

Для усиления устойчивости к сильной дегидратации растения подвергают обработке. Высеченные апексы закаленных или незакаленных пониженными температурами *in vitro* растущих проростков предварительно культивируют на среде с высокой концентрацией сахарозы [7, 10]. Часто после предварительного культивирования апексы обрабатывают насыщающим раствором: 2М глицерина + 0,4М сахарозы [6, 9].

Применяли двухэтапную дегидратацию [9] с различными методами предварительного культивирования.

Материалы и методы

В работе использовали меристемы картофеля (*Solanum tuberosum*) и винограда (*Vitis vinifera* L). Апикальные почки брали от материнских растений и культивировали на среде Мурасиге и Скуга [1] в условиях фитотрона при температуре $23\pm 2^\circ\text{C}$, фотопериоде 16 ч день/8 ч ночь и интенсивности освещения 1-2 тыс. люкс.

Проростки картофеля на 4-й неделе культивирования подвергали действию пониженных температур $8\pm 2^\circ\text{C}$ ночью и $23\pm 2^\circ\text{C}$ днем и фотопериоду 16 ч ночь/8 ч день в течение 18 сут. Боковые меристемы с 2-3 листовыми примордиями высекали для эксперимента. Высеченные апексы предварительно культивировали 3 сут в 0,1М и 1 сут в 0,7М растворах сахарозы. После этого меристемы подвергали двухэтапному дегидратированию: апексы помещали в 50%-й PVS2 при 10°C на 30 мин, затем в PVS2 при 10°C на 60 мин.

Проростки винограда не подвергали воздействию пониженных температур. Высеченные апексы помещали в 0,3М раствор сахарозы на 20 ч, затем насыщали раствором 2М глицерина + 0,4М сахарозы 30 мин при 25°C . После этого меристемы дегидратировали 30 мин в 50%-м PVS2 и 60 мин в PVS2 при 3°C .

Дегидратированные меристемы обеих культур на кусочках фильтровальной бумаги, смоченной PVS2, помещали в плоские алюминиевые ячейки для ДСК ($d=5$ мм и $h=1$ мм), служившие контейнерами, и затем замораживали прямым погружением в жидкий азот. Для отогрева контейнеры помещали в водяную баню при 37°C . Отмывание от криопротектора проводили ступенчато: сначала в 50%-м PVS2 20 мин при 10°C для картофеля и 3°C для винограда, затем 60 мин в растворе сахарозы для картофеля и в растворе сахарозы с глицерином

sucrose [10, 7]. After pre-culturing the apices are often treated with saturating solution: 2M glycerol+0.4 sucrose [9, 6].

In our research two-stage dehydration was used [9] with various pre-culturing methods.

Materials and methods

In research potato (*Solanum tuberosum*) and grape (*Vitis vinifera*) meristems were used. Apical buds derived from mother plants were cultured in the medium of Murashige and Scoog [1] under phytotron conditions at $23\pm 2^\circ\text{C}$, photoperiod of 16 hrs (day)/ 8 hrs (night) and illumination intensity of 1-2 thousand luxes.

Potato germs to the 4th week of culturing were exposed to lowered temperatures $8\pm 2^\circ\text{C}$ in the night and $23\pm 2^\circ\text{C}$ during the day and photoperiod of 16 hrs night/8 hrs day for 18 days. Side meristems with 2-3 leaf primordia were cut for the experiment. Cut apices were pre-cultured for 3 days in 0.1M and for 24hrs in 0.7M sucrose solutions. Afterwards the meristems were subjected to two-stage dehydration: apices were placed into 50% PVS at 10°C for 30 min and then in PVS2 at 10°C for 60 min.

Grape germs were not exposed to lowered temperatures. Cut apices were placed into 0.3M sucrose solution for 20hrs, then they were saturated with the solution of 2M glycerol+ 0.4M sucrose for 30 min at 25°C . Afterwards the meristems were dehydrated for 30 min in 50% PVS2 and for 60 min at 3°C .

Dehydrated meristems of both cultures on the pieces of PVS2 wetted filter paper were placed into flat aluminium wells for DSC ($d = 5$ mm and $h = 1$ mm), which served as the containers. Afterwards their freezing was accomplished by direct plunging into liquid nitrogen. To thaw the material the containers were put on water bath at 37°C . Cryoprotectant washing-out was performed stepwise: first in 50% PVS2 20 min at 10°C for potato and 3°C for grape, then 60 min in sucrose solution for potato and in the solution of sucrose with glycerol for grape at room temperature. Meristem survival was found on the integrity of apical dome and primordial leaves under microscope. Cut non-dehydrated meristems and those after dehydration with PVS2 served as the control.

Results and discussion

Integrity of potato meristem to the 5th day after freezing was 100% for the control (non-frozen) and non-treated apices. Dehydrated meristems, but not frozen, showed 90% survival and cryopreserved ones demonstrated 80%, that was supported with other results [6]. Hardened potato meristems were not subjected to treatment with saturating solution. There

для винограда при комнатной температуре. Сохранность меристем определяли по целостности апикального купола и примордиальных листьев под микроскопом. Контролем служили высеченные недегидратированные меристемы и меристемы после дегидратации PVS2.

Результаты и обсуждение

Сохранность меристем картофеля на 5-е сутки после замораживания составляла 100% для контрольных (незамороженных) и необработанных апексов. Меристемы, прошедшие этап дегидратации, но незамороженные, показали 90%-ю сохранность, а криоконсервированные – 80%-ю, что вполне согласуется с результатами [6]. Закаленные меристемы картофеля не подвергали обработке насыщающим раствором. Существуют разные мнения о влиянии пониженных температур на меристемы картофеля и необходимой при этом предварительной обработке. Одни авторы [5] считают, что картофель относится к растениям, которые не переносят действия пониженных температур, другие, что закаливание, совмещенное с обработкой насыщающим раствором, улучшает жизнеспособность криоконсервированного материала [6]. Известно, что на этапе закаливания в растениях синтезируются углеводы, абсцизовая кислота, аминокислоты, которые выполняют роль эндогенных криопротекторов [8]. Поэтому мы решили не обрабатывать закаленные апексы картофеля насыщающим раствором. При предварительном выращивании апексов, высеченных из закаленных материнских растений, на питательной среде с высокой концентрацией сахарозы происходит умеренный плазмолиз клеток, который способствует улучшению устойчивости меристем к дегидратации витрифицирующим раствором [5] и концентрирования накопленных при закаливании эндогенных веществ [4].

Сохранность меристем винограда на 5-е сутки культивирования после криоконсервирования составляла 75%. Контрольные (незамороженные) апексы, обработанные PVS2, показали 80%-ю сохранность. У высеченных, контрольных меристем сохранность составляла 100%, данные не противоречат результатам [9].

Растения винограда не подвергались действию низких положительных температур, поэтому основным этапом криозащиты служила обработка насыщающим раствором, которая приводила к проникновению в клетку криопротектора (глицерина) совместно с умеренным плазмолизом, вызванным сахарозой.

Витрификационное состояние при замораживании как картофеля, так и винограда достигается концентрированием криопротекторных

are various opinions about the effect of lowered temperatures on potato meristems and essential in this case pre-treatment. Some authors believe that potato is referred to the plants, not surviving the effect of lowered temperatures, others consider that hardening combined with treatment by saturating solution improves the viability of cryopreserved material [6]. It is known that at the stage of hardening in plants there are synthesised carbohydrates, abscise acid, amino acids, which act as endogenic cryoprotectants [8]. Therefore we decided do not treat hardened potato apices with saturating solution. During preliminary growing of apices, cut out of hardened mother plants, on a nutrient medium with high sucrose concentration there is moderate cell plasmolysis, which contributes to the improvement of meristem resistance to dehydration by vitrifying solution [5] and concentrating of accumulated during hardening endogenic substances [4].

Integrity of grape meristems to the 5th day of culturing after cryopreservation made 75%. Control (unfrozen) PVS2-treated apices showed 80% survival. In cut control meristems the integrity made 100%, the data are not in contradiction with other results [9].

Grape plants were not subjected to the effect of low positive temperatures, therefore their treatment with saturating solution served as the main stage of cryoprotection. This treatment results in cryoprotectant (glycerol) penetration into a cell jointly with moderate sucrose-caused plasmolysis.

Vitrification state during freezing of both potato and grape is achieved by the concentrating of cryoprotective substances in apical cells as the result of dehydration when placing meristems into vitrifying solution [5].

Conclusions

1. Use of the mentioned regimens to prepare potato and grape meristems to freezing enables to obtain high integrity indices after cryopreservation.
2. For further optimisation of cryopreservation conditions it is necessary to examine the viability indices of meristems.

References

1. *Rudishin S.D.* Bases of biotechnology of plants. – Vinnytsya, 1998. – 224 p.
2. *Engelmann F.* Importance of cryopreservation for conservation of plant genetic resources // Book of Abstracts of the JIRRCAS/IPGRI International Workshop "Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application". – Tsukuba, Japan, 1998. – P. 8-20.
3. *Fahy G.M., MacFarlan D.R., Angell C.A., Meryman H.T.* Vitrification as an approach to cryopreservation // *Cryobiology.* – 1984. – Vol.21. – P. 407-426.
4. *Fujikawa S., Jitsuyama Y.* Ultrastructural aspects of freezing adaptation of cells by vitrification // Book of Abstracts of the JIRRCAS/IPGRI International Workshop "Cryopreservation of

веществ в апикальных клетках в результате дегидратации при помещении меристем в витрифицирующийся раствор [5].

Выводы

1. Использование данных режимов подготовки меристем картофеля и винограда к замораживанию позволяет получить высокие показатели сохранности после криоконсервирования.

2. Для дальнейшей работы по оптимизации условий криоконсервирования необходимо определить показатели жизнеспособности меристем.

Литература

1. Рудишин С.Д. Основы биотехнології рослин.– Вінниця, 1998.– 224 с.
2. Engelmann F. Importance of cryopreservation for conservation of plant genetic resources // Book of Abstracts of the JIRRCAS/IPGRI International Workshop "Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application".– Tsukuba, Japan, 1998.– P. 8-20.
3. Fahy G.M., MacFarlan D.R., Angell C.A., Meryman H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation // Cryobiology.– 1984.– Vol.21.– P. 407-426.
4. Fujikawa S., Jitsuyama Y. Ultrastructural aspects of freezing adaptation of cells by vitrification // Book of Abstracts of the JIRRCAS/IPGRI International Workshop "Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application".– Tsukuba, Japan, 1998.– P. 36-43.
5. Grospietsch M, Stodulkova E, Zamechnik J. Effect of osmotic stress on dehydration tolerance and cryopreservation of *Solanum tuberosum* shoot tips // CryoLetters.– 1999.– Vol. 20.– P. 339-346.
6. Hirai D., Sakai A. Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of potato by encapsulation-vitrification // Book of Abstracts of the JIRRCAS/IPGRI International Workshop "Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application".– Tsukuba, Japan, 1998.– P. 205-211.
7. Kyesmu P.M., Takagi H., Yashima S. Cryopreservation of white yam (*Dioscorea ratundata*) shoot apices by vitrification // Proceedings of Annual Meeting of Molecular Biology.– Kumamoto, Japan, 1997.– P.162.
8. Luo J., Reed B.M. Abscisic acid – responsive protein, bovine serum albumin and proline pretreatments improve recovery of *in vitro* currant shoot-tips meristems and callus cryopreserved by vitrification // Cryobiology.– 1997.– Vol. 34.– P. 240-250.
9. Matsumoto T., Sakai A. Cryopreservation of grape *in vitro* axillary shoot tips by three-step vitrification // Book of Abstracts of the JIRRCAS/IPGRI International Workshop "Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application".– Tsukuba, Japan, 1998.– P. 424-425.
10. Niino T., Sakai A., Nojiri K. Cryopreservation *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification // Plant Cell, Tissue and Organ Culture.– 1992.– Vol. 28.– P. 261-266.
11. Sakai A. Development of cryopreservation techniques. Cryopreservation of tropical plant germplasm // Book of Abstracts of the JIRRCAS/IPGRI International Workshop "Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application".– Tsukuba, Japan, 1998.– P. 1-7.

Accepted in 27.04.2004

Поступила 27.04.2004