

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 картоплі шляхом заморожування їх у краплях кріозахисного середовища (10% диметилсульфоксид (ДМСО), приготовлений на живильному середовищі), які наносять на алюмінієву пластину і занурюють у рідкий азот [1].

Але цей спосіб не забезпечує необхідного рівня захисту матеріалу від бактеріальної і фунгіальної контамінації. Крім того, існує загроза втрати матеріалу з поверхні відкритої пластини.

Відомий спосіб кріоконсервування меристем картоплі шляхом заморожування їх зі швидкістю 1000°C/хв на кінчику гіподермальної голки. Перед заморожуванням меристеми оброблюють кріозахисним розчином, який складається з 5% ДМСО, 5% гліцерину і 5% сахарози [2].

Недоліком даного способу є низька збереженість меристем після відігріву - 26%.

Найближчим до заявленого способу, є спосіб кріоконсервування меристем картоплі, який полягає в тому, що меристеми насичують 10% ДМСО, приготовленого на живильному середовищі, і у краплях цього розчину наносять на алюмінієві пластини, які занурюють у контейнери, попередньо заповнені рідким азотом. Потім контейнери герметично закривають і поміщають на зберігання у рідкий азот. Відігрів матеріалу проводять шляхом занурення контейнерів у водяну баню з температурою 40°C. Збереженість кріоконсервованих даним способом меристем різних сортів картоплі складає від 55±28% до 72±26% [3].

Недоліком цього способу є можливість контамінації матеріалу на етапі заморожування - відігрівання, через те, що заморожуваний об'єкт, безпосередньо контактує в контейнері з рідким азотом. Іншим недоліком даного способу є складність його виконання, обумовлена тим, що меристема поміщається спочатку на алюмінієву пластину, а потім - у контейнер.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити такий спосіб кріоконсервування меристем картоплі, який би, за рахунок зміни умов заморожування, забезпечував надійний захист матеріалу від контамінації, а також дозволяв спростити процедуру кріоконсервування.

Ця задача вирішується тим, що у способі кріоконсервування меристем картоплі, який включає насичення їх кріозахисним середовищем, поміщення в контейнери, що герметично закриваються, заморожування і зберігання у рідкому азоті, відповідно до корисної моделі, заморожування проводять у шугі (суміш твердої і рідкої фази) азоту протягом 1 хв.

Заморожування меристем картоплі в контейнерах, що герметично закриваються, виключає контакт матеріалу з рідким азотом, а, значить, дозволяє уникнути його контамінації.

Виключення проміжної стадії заморожування меристем на пластині забезпечує спрощення процедури кріоконсервування. При цьому збереженість матеріалу не нижча ніж у прототипі, оскільки під час заморожування меристем у шугі азоту досягається така ж швидкість заморожування, як і на пластинах, при зануренні у рідкий азот (Таблиця 1).

Спосіб здійснюють таким чином.

Меристеми виділяють у стерильних умовах, насичують розчином кріопротектора, поміщають у стерильні контейнери, що герметично закриваються, заморожують протягом 1хв шляхом занурення контейнерів з меристемами у шугу азоту, потім переносять у рідкий азот для довгострокового зберігання. Відігрівання матеріалу здійснюють зануренням контейнерів з меристемами на 1хв у водяну баню з температурою 40°C.

Приклад

Меристеми картоплі сорту Косинь виділяли у стерильних умовах із рослин, які вирощували *in vitro* в умовах лабораторії, поміщали на живильне середовище MS [4], без фітогормонів і витримували на ньому 48 годин при температурі 22°C, освітленні 2 тис. люкс, 16-годинному фотоперіоді. За цей час нежиттєздатні меристеми, які були пошкоджені при виділенні з проростків загинули. Потім меристеми насичували протягом 60хв кріозахисним розчином, що містив 1,5 моля або ДМСО, або етиленгліколю (ЕГ), або 1,2-пропандіолу (1.2-ПД) і поміщали в алюмінієві контейнери з відповідним кріозахисним середовищем. Контейнери занурювали на 1 хв у шугу азоту, після чого переносили у рідкий азот на зберігання. Відігрівання здійснювали шляхом занурення контейнерів з меристемами у водяну баню на 1 хв. Відмивання від кріопротектору проводили протягом 40хв шляхом дворазової заміни живильного середовища. Культивування меристем проводили на середовищі MS з 0,1М сахарозою та фітогормонами (кінетин - 1мг/л, індолилцетова кислота - 1мг/л). Збереженість меристем після заморожування оцінювали шляхом мікроскопії. Меристеми вважали збереженими, якщо були пошкоджені тільки клітини субапикальної тканини, якщо пошкодження поширювалося і на клітини апікального конусу, їх вважали загубленими, тому що у подальшому культивуванні такі меристеми виявлялися нежиттєздатними. Меристеми, які зберегли зелене забарвлення після заморожування і мали позитивну динаміку росту протягом подальшого культивування на живильному середовищі, вважали збереженими. Результати збереженості меристем на 5-й день культивування представлені у Таблиці 2. Як видно з таблиці, збереженість меристем після заморожування не поступається показникам прототипу.

Таблиця 1

Швидкість охолодження
меристем у різних холодоагентах.

Умови охолодження	Швидкість охолодження, °C/хв.
На алюмінієвій пластині, яка занурюється у рідкий азот	12900±1100
У алюмінієвому контейнері, який занурюється у рідкий азот	7100±870

У алюмінієвому контейнері, який занурюється у шугу азоту	13000±1700
--	------------

Таблиця 2

Збереженість меристем
картоплі після заморожування у шугі азоту.

Кріо-протектори	Концентрація кріопротектора в живильному середовищі	Збереженість, %	
		Незамо-rozenі	Замо-rozenі
ДМСО	1,5 М	92±2	81±8
ЭГ		92±4	84±5
1,2-ПД		90±3	88±2

Джерела інформації:

1. Schäfer-Menuhr A., Schumacher H.M., Mix-Wagner G. Long-term storage of old potato varieties by cryopreservation of shoot-tips in liquid nitrogen // Plant Genetic Resources Newsletter. - 1997, - Vol.111. - P.19-24.
2. Bajaj Y.P.S. Tuberization in potato plants regenerated from freeze-preserved meristems // Crop Impr. - 1978, - Vol.5. - P.137
3. 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, №3. - P.33-41.
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid grown and bioassay with tobacco tissue culture // Physiologia Plantamm. - 1962. - Vol.15. - P.473-497.