



УКРАЇНА

(19) UA (11) 47845 (13) U
(51) МПК (2009)
A01F 25/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДОВГОСТРОКОВОГО ЗБЕРЕЖЕННЯ ЖИВЦІВ ПЛОДОВО-ЯГІДНИХ КУЛЬТУР

1

2

(21) u200909222

(22) 07.09.2009

(24) 25.02.2010

(46) 25.02.2010, Бюл.№ 4, 2010 р.

(72) ГОРБУНОВ ЛЕОНІД ВОЛОДИМИРОВИЧ, РЯ-
БЧУН ВІКТОР КУЗЬМОВИЧ, ШИЯНОВА ТЕТЯНА
ПАВЛІВНА, САЛІНА АЛЛА СЕРГІЇВНА(73) ІНСТИТУТ РОСЛИННИЦТВА ІМ. В.Я. ЮР'ЄВА
УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК, ІН-
СТИТУТ ТВАРИННИЦТВА УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕ-
МІЇ АГРАРНИХ НАУК

(57) Спосіб довгострокового збереження живців плодово-ягідних культур, що включає збереження заморожених зразків при температурі рідкого азоту, який **відрізняється** тим, що збільшують об'єм робочої камери для заморожування живців плодово-ягідних культур в 10 разів (до 2 л) та зменшують градієнт температур до $0,1^{\circ}\text{C}/\text{см}$, швидкість охолодження при цьому змінюють від $0,1^{\circ}\text{C}/\text{год.}$ до $1^{\circ}\text{C}/\text{хв.}$

Корисна модель відноситься до галузі сільсько-го господарства, а саме, до способів збереження живців рослин в рослинництві.

Відомі способи кріозбереження верхівкових меристем пагонів [5-7]. Ці методи є найкращими способами збереження генофонду вегетативно розмножуваних рослин. Дані способи мають багато позитивних моментів, але зв'язаний з необхідністю створення спеціальної лабораторної бази, значною витратою часу кваліфікованих співробітників, складнощами процедури регенерації меристем, що за існуючими фінансовими і матеріальними умовами діяльності Національного генбанку України неможливо забезпечити для збереження існуючої розманітності зразків.

Також відомі способи охолодження зі швидкістю $1^{\circ}\text{C}/\text{год}$ від -5 до -30°C живців винограду, яблуні [4-6] і від -5 до -90°C смородини, агрусу [7] з наступним їхнім переміщенням у пари рідкого азоту. Недоліками їх є низькі показники життєздатності деконсервованих живців на рівні $20\div 30\%$ і необхідність застосування програмного заморожувача, який дорого коштує.

Для забезпечення життєздатності деконсервованих зразків проводиться їх висушування до $20\div 30\%$ вологості. У роботі [8] показано, що зниження вологості вищезгаданих зразків до рівня 30% приводить до значного зменшення життєздатності досліджуваних живців плодово - ягідних культур.

Найближчим до технічній суті є спосіб [10], ідо реалізується при застосуванні пристрою, який відрізняється тим, що він має порожні стінки і дно, у яких є можливість установа різного ступеня

розрідженості повітря, аж до вакууму, а також відкритості зовнішньої і внутрішньої стінок, завдяки цьому реалізується широкий діапазон швидкостей ($0,01\div 100^{\circ}\text{C}/\text{хв}$) і прискорень ($-2000\div +2000^{\circ}\text{C}/\text{хв}^2$) заморожування з мінімальним градієнтом температури ($1^{\circ}\text{C}/\text{см}$), застосування даного пристрою на основі транспортної посудини Дьюара Х-5 створює можливість його ручного транспортування і здійснення заморожування як у лабораторних, так і у польових умовах. Недоліком його є те, що використовується малий об'єм контейнера для заморожування біоматеріалу, який не придатний для кріоконсервування великої кількості живців плодово-ягідних культур.

В основу корисної моделі у поставлено ціль - збільшити об'єм робочої камери для заморожування живців плодово-ягідних культур в 10 разів (2л).

Для рішення цієї проблеми запропоновано спосіб довгострокового збереження живців у рідкому азоті.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином: 1 розфасовка і маркування живців; 2 сушіння і температурна адаптація; 3 заморожування; 4 зберігання при температурі рідкого азоту; 5 відігрівання; 6 регідратація; 7 контроль збереженості і життєздатності.

1. Розфасовка і маркування живців. Живці нарізають з однорічних пагонів та розділяють на окремі зразки по 10 ± 2 шт, довжиною від 5см до 12см та діаметром $0,5\text{см}-1,2\text{см}$. Живці мають від 2 до 5 вегетативних бруньок.

2. Сушіння і температурна адаптація. Ступінь вологості для нативних живців змінюють від 50%

(13) U

(11) 47845

(19) UA

до 30%, на основі застосування сушки: за температури $-5\pm 2^{\circ}\text{C}$, вологості повітря $85\pm 5\%$, без примусового обдування [8].

Ступінь вологості визначають шляхом зважування зразків та розрахунку за такими формулами:

$$\eta_i = ((m_0 - m_k) / m_0) \times 100\%, \quad (1)$$

$$\eta_s = ((m_s / m_0) \times \eta_0 \times 100\%, \quad (2)$$

де: η_i - вологість зразка (%): $i=0$ нативного; $i=1$ після висушування; $i=2$ кріоконсервування; $i=3$ регідратації;

m_0 - початкова маса нативного зразка (г);

m_k - кінцева маса зразка після зневоднення до постійної маси (г);

η_s - вологість зразка на одному з етапів у процесі висушування (%);

m_s - маса зразка на одному з етапів в процесі висушування (г).

Для збереження остаточної вологості, живці перед охолодженням обробляють воском або парафіном з обох кінців.

3. Режими заморожування засновано на ступінчастому охолодженні із швидкістю $0,1^{\circ}\text{C}/\text{год}$ до температур -5°C до -20°C з інтервалом 5°C і витримкою одну та три діб, відповідно, при переміщенні зразків, розміщених в побутових термосах місткістю 2л в рефрижератори. Охолодження від температури -20 до -196°C реалізують безпосереднім зануренням зразка в рідкий азот із швидкістю $600^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до $800^{\circ}\text{C}/\text{хв}$.

4. Зберігання зразків проводять в посудинах Дьюара в парах азоту при температурі -160 до -180°C або в рідкому азоті -196°C .

5. Відтавання зі швидкістю $70^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ проводять при безпосередньому розміщенні зразка в примі-

щенні при температурі 20°C .

6. Регідратація. Для цього живці ставлять на гідратацію в ексікатор з дистильованою водою і витримують на протязі 12 днів при температурі 5°C .

7. Показник збереженості оцінюють за допомогою проведення гістологічних зрізів бруньок і живців які визначають за допомогою морфо-анатомічних досліджень з використанням біокуляру (розтин бруньок та деревини з визначенням їх пошкодження за кольором) [9].

Контроль життєздатності проводять пророщуванням в склянках з водою при температурі $t = 20^{\circ}\text{C}$ до 25°C та укоріненням живців в ґрунті. Набухання і розвиток бруньок вказувало на життєздатність досліджуваного зразка. Відсоток життєздатності зразка оцінюють, як відношення кількості живців з розкритими бруньками після пророщування до загальної їх кількості у зразку.

Корисна модель ілюструється прикладом.

Приклад 1

Об'єктом кріоконсервування були живці: чорної смородини (*Ribes nigrum* L.); вишні - Степова (*Prunus cerasus* L.), малини (*Rubus idaeus* L.). Контролем для обраних способів кріоконсервування застосовувалися живці берези (*Betula pubescens*).

Результати дослідів показали, що стовідсоткова життєздатність живців берези спостерігається при висушуванні зразків від 44% до 31% в діапазоні температур від 20°C до -4°C . Стовідсоткові результати збереженості і життєздатності біооб'єкту відповідали зміні температур в діапазоні від 5 до -196°C із швидкостями охолодження $0,1^{\circ}\text{C}/\text{год}$ і відігрівання $0,1^{\circ}\text{C}/\text{год}$ і $70^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ (табл. 1). Відсоток вологості до охолодження складав 36%, а після відігрівання від 20%.

Таблиця 1

Вплив ступінчастого охолодження живців берези на їх життєздатність при охолодженні із швидкістю $0,1^{\circ}\text{C}/\text{год}$ до температури -20°C і $800^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -196°C

Вологість після сушки, %	Охолодження до температури, $^{\circ}\text{C}$ (витримка, діб)	Вологість після відігрівання, %	Збереженість, $S \pm m$, %	Життєздатність, $V \pm m$, %
35,7	-20 (30)	22,3	100 ± 0	100 ± 0
35,5	-20 (90)	20	100 ± 0	100 ± 0
35,5	-20 (90) -196 (10)	20	100 ± 0	100 ± 0

Примітка: початкова вологість живців складає $\eta_0 = 40,0\%$; довжина 6 ± 1 (см), діаметр $0,4 \pm 0,2$ (см). Швидкість відігрівання $-70^{\circ}\text{C}/\text{хв}$.

Зберігання зразків впродовж 5 місяців привело до зниження життєздатності біооб'єкту до 30% при використанні низьких температур -5°C , і залишався на рівні ста відсотків при використанні наднизьких -160 до -196°C . Разом з тим, при використанні температури зберігання -28°C впродовж шести місяців, життєздатність біооб'єкту не змінювалася при рівні вологості, яка досягала 14%.

При сушці живців чорної смородини життєздатність зразків не змінювалася при зниженні їх вологості до рівня 42%. Охолодження зразків із шви-

дкістю $0,1^{\circ}\text{C}/\text{год}$ до температури -20°C і $800^{\circ}\text{C}/\text{год}$ до -196°C , відігрівання $-70^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ дало можливість одержати стовідсоткову життєздатність деконсервованих об'єктів (табл. 2). При цьому час витримки при температурах -20 і -28°C варіював від 10 до 60 діб. Вологість деконсервованих зразків, які мають стовідсоткову життєздатність варіювала, від 34 до 43%.

Таблиця 2

Вплив ступінчастого охолодження живців чорної смородини на їх життєздатність при охолодженні із швидкістю 0,1°C/год до температури -20°C і 800°C/хв до -196°C

Вологість після сушки, %	Охолодження до температури, °C (витримка, діб)	Вологість після відігрівання, %	Збереженість, S±m, %	Життєздатність, V±m, %
47,2	-20 (60)	42,5	100±0	100±0
48,2	-28 (10)	38,5	100±0	100±0
41,9	-20 (30); -196 (10)	33,7	100±0	100±0
41,9	-28 (10); -196 (10)	33,7	100±0	100±0

Примітка: початкова вологість живців складає $\eta_0=49,8\%$, життєздатність $V_0=100$; довжина 7 ± 1 (см), діаметр $0,4\pm 0,1$ (см). Швидкість відігрівання 70°C/хв.

Зберігання зразків впродовж 6 місяців не привело до зниження життєздатності живців при їх зберіганні при температурі -28 і -196°C. Тоді як, використання вищої температури -5°C приводило до зниження життєздатності зразків до 70-80%.

Максимальна життєздатність - 70% живців ма-

лини, після охолодження до температури -196°C, одержана при початковій вологості зразка 38% (табл. 3). При вологості 34% рівень життєздатності знизився до 57% у зв'язку з тим, що мінімально допустимий рівень після сушки, складає - 37%.

Таблиця 3

Вплив ступінчастого охолодження живців малини на їх життєздатність при охолодженні із швидкістю 0,1°C/год до температури -20°C і 600°C/хв до -196°C

Вологість після сушки, %	Охолодження до температури, °C (витримка, діб)	Вологість після відігрівання, %	Збереженість, S±m, %	Життєздатність, V±m, %
40,0	-5 (30); -20 (30)	31,1	100±0	100±0
38,0	-5 (30); -20 (30)	23,3	100±0	100±0
38,3	-20(30); -196(10)	-	80±15	70±16
34,3	-20 (30); -196 (10)	24÷29	70±16	63±16
34,4	-20 (30); -196 (10)	29,8	70±16	57±17

Примітка: початкова вологість живців складає $\eta_0=40,0\%$, життєздатність $V_0=100$; довжина 11 ± 1 (см), діаметр $0,6\pm 0,2$ (см). Швидкість відігрівання - 70°C/хв.

Життєздатність деконсервованих живців вишні після глибокого заморожування склала 75% при початковій вологості зразків 40÷42% (табл. 4). Після охолодження зразків життєздатність виявилася

дещо вище 44÷75% при такому ж рівні вологості 42%. Для вологості 31% життєздатність знизилася до 44%.

Таблиця 4

Вплив ступінчастого охолодження живців вишні на їх життєздатність при охолодженні із швидкістю 0,1°C/год до температури -20°C і 800°C/хв до -196°C, швидкість відігрівання 70°C/хв.

Вологість після сушки, %	Охолодження до температури, °C (витримка, діб)	Вологість після відігрівання, %	Збереженість, S±m, %	Життєздатність, V±m, %
40	-5 (25); -20 (3)	32,4	100±0	80±13
42	-5 (30); -20 (30); -28 (15)	30,3	100±0	80±13
42	-20 (30); -196(1)	-	80±12	75±14
31	-20 (30); -196(1)	-	90±10	44,4±14

Примітка: початкова вологість живців складає $\eta_0=42,0\%$, життєздатність $V_0=100$; довжина 5 ± 1 (см), діаметр $0,4\pm 0,1$ (см).

Аналіз одержаних результатів показує, що живці берези, чорної смородини зберігають початкову життєздатність в результаті застосування різних режимів сушки, ступінчастого охолодження із шви-

дкістю 0,1°C/год до температури -20÷-28°C, тривалого зберігання при температурах -160÷-196°C і подальшим відтаванням зі швидкістю 70°C/хв. Разом з тим, показано, що рівень вологості зразків

не повинен бути менше 32% для живців берези і 37% смородини, в позитивному діапазоні використовуваних температур. При негативних температурах $-28 \div -196^{\circ}\text{C}$ дана величина може знижуватися до 14 і 30%, відповідно. Нижче за дані критичних значень життєздатність досліджуваних зразків різко знижується внаслідок надмірного обезводнення клітин (ефект плазмолізу).

Слід зазначити, що ступінчасте охолодження дає можливість усунути необхідність попередньої сушки зразків, за допомогою використання низькотемпературної сублімації внутрішньоклітинної води.

Таким чином, визначення області допустимих значень вологості, швидкостей охолодження-відігрівання, температури і часу витримки перед зануренням в рідкий азот живців берези, смородини, малини, вишні дали можливість збільшити життєздатність деконсервованих зразків в 24-5 разів порівняно з існуючими способами криоконсервування [1, 2, 4-7]. Области допустимих значень параметрів, які забезпечують максимальну життєздатність досліджуваних живців: берези; чорної смородини; малина; вишні, відповідають вологості $32 \div 40\%$; $40 \div 50\%$; $37 \div 40\%$; $33 \div 45\%$ відповідно у позитивному діапазоні температур і $14 \div 28\%$, $30 \div 40\%$, 23% , 37% негативному. При використанні різних режимів сушки і охолодження із швидкістю $0,1^{\circ}\text{C}/\text{год}$ до -20°C з подальшим зануренням в рідкий азот можна реалізувати 100% рівень життєздатності деконсервованих живців смородини і берези, малина - 70%, вишні - 57%.

Цей спосіб дозволяє підвищити життєздатність деконсервованих зразків у 2-5 разів, без необхідності використання обладнання, яке дороге коштує, що дає можливість зберігати генофонд рослинних клітин необмежену кількість часу.

Перелік посилань:

1. Туманов И.И., Красавцев О.А., Хвалин Н.Н. Повышение морозостойкости березы и черной

смородины до -253°C путем закаливания // Докл. АН СССР. - 1959. - т. 127. - С. 1301.

2. Sakai A. Survival of the twig of woody plants at -196°C // Nature. - 1960. - v. 185. - P. 393.

3. Leigh E. Towill and Philip L. Forsline Cryopreservation of sour cherry (*prunus cerasus* L.) using a dormant vegetative bud method // Cryoletters. - 1999. - V. 20. - P. 215-225.

4. Yongjie Wu, Yanhua Zhao, Florent Engelman, Mingde Zhou, Deming Zhang and Shuangying Chen, Cryopreservation of apple dormant buds and shoot tips // Cryoletters. - 2001. - V. 22. - P. 375-380.

5. Popov A.S., Popova E.V., Nikishina T.V. and Vysotskaya O.N., Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences // International Journal of Refrigeration - 2006. - V. 29. - P. 403-410.

6. Вержук В.Г., Филиппенко Г.И., Тихонова Н.Г., Жестков А.С. Способы криосохранения генплазмы плодовых культур на примере смородины, жимолости и крыжовника // Биофизика живой клетки. - 2008. - Т. 9. - С. 35-36.

7. Горбунов Л.В., Шиянова Т.П., Рябчун В.К. Оптимізація умов дегідратації живців плодово-ягідних культур // Генетичні ресурси рослин. - 2008. - №5 - С. 182-187.

8. Соловьева М.А. Методы определения зимостойкости плодово-ягодных культур. Методическое пособие// Ленинград Гидрометеиздат. - 1982. - 35с.

9. Пат. 38781UA Україна, МПК А 61 D 19/02. Пристрій для криоконсервації об'єктів тваринного і рослинного походження / Горбунов Л.В., Міщенко А.Г.; заявник та патентовласник Інститут тваринництва УААН. - Інститут тваринництва УААН. - №а200602103; заявл. 27.02.2006; опубл. 26.01.2009; Бюл. №2. - 8 с.