

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

ПРИСТАЛОВ АНТОН ІГОРОВИЧ

УДК 581.82:57.043:547.42

**ВПЛИВ СКЛАДУ КРІОЗАХИСНОГО СЕРЕДОВИЩА ТА МЕТОДІВ
ОХОЛОДЖЕННЯ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ГЕРМПЛАЗМИ ВИНОГРАДУ**

03.00.19 – кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
Кулешова Лариса Георгіївна,
Інститут проблем кріобіології і
кріомедицини Національної академії наук України,
м. Харків
провідний науковий співробітник
відділу низькотемпературного консервування.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
Колупаєв Юрій Євгенович,
Харківський національний аграрний
університет ім. В. В. Докучаєва
Міністерства освіти і науки України, м. Харків
завідувач кафедри ботаніки і фізіології рослин;

кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник,
Богуславський Роман Львович,
Інститут рослинництва імені В. Я. Юр'єва
Національної академії аграрних
наук України, м. Харків
провідний науковий співробітник лабораторії
інтродукції та зберігання генетичних ресурсів рослин.

Захист відбудеться «4» травня 2021 р. о 13³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Автореферат розісланий «___» квітня 2021 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01

О. В. Фалько

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. У зв'язку з масштабним скороченням світових рослинних ресурсів виникла проблема збереження генофонду культурних і дикорослих видів рослин (Rasl T. et al., 2020, Salomao A.N. et al., 2020, Wilms H. et al., 2020). Класичний метод збереження і оновлення генофонду цінних сортів винограду здійснюється шляхом створення і підтримки дублетних колекційних насаджень (Мондиарова В.О. и др., 2020). Однак створення і підтримання колекцій економічно дорого через велику вартість посадкового матеріалу і роботи по догляду за дорослими рослинами. Крім того, немає гарантії збереження унікальних генотипів внаслідок дії несприятливих екологічних, кліматичних, техногенних та антропогенних чинників (Maul E. et al., 2015, Wilms H. et al., 2020). Перспективним сучасним способом збереження гермплазми плодово-ягідних культур є кріоконсервування частин рослин (пагони, бруньки, меристеми, пилок і насіння) у рідкому азоті або його парах (Bettoni J. et al. 2016, Wang M.-R. et al., 2018). Для винограду існують методи кріоконсервування пилку, ембріональних клітин і меристем (Bi W-L. 2017). Однак для регенерації меристем у посадковий матеріал необхідно тривалий час, що включає зростання у стерильних умовах та акліматизацію до умов парника. Крім того, мають місце складнощі з процедурами культивування меристем. Все це вимагає створення спеціальної лабораторної бази, що тягне за собою значні фінансові витрати (Pathirana R. et al. 2016). Останнім часом особлива увага приділяється кріозбереженню бруньок і живців різних видів цінних рослин, які знаходяться у стані спокою (Rantala S. et al., 2019). Даних щодо кріоконсервування прищепних частин винограду (бруньки, живці) на даний момент немає.

Одним із простих для практичного застосування методів кріоконсервування генетичних ресурсів рослин, що не потребує дорогого устаткування, вважається метод вітрифікації, що включає високі швидкості охолодження і обробку зразків кріозахисними розчинами відповідного складу (Bekheet S.A. et al., 2020). Такі розчини отримали назву вітрифікуючих (PVS, plant vitrification solution). Невеликі рослинні експланти (пилки, насіння, меристеми) досить легко вітрифікуються з використанням підсушування і PVS (Tanaka D. et al., 2018). Однак зі збільшенням розмірів експлантів спостерігається неоднорідність насичення їх тканин, що вимагає більшого часу експозиції у PVS (Kalaiselvi R. et al., 2017). Тривалий контакт із концентрованими кріозахисними розчинами може призводити до загибелі поверхневого шару клітин, у той самий час як внутрішні шари тканин експлантів залишаються ненасиченими. Складнощі проходження кріопротекторів групи PVS у міжклітинний простір і клітини рослинних тканин пов'язані також із високою в'язкістю кріозахисних розчинів (Matsumoto T., 2017). Прискорення насичення рослинних експлантів продемонстровано з використанням методу vacuum infiltration vitrification (VIV) (Nadarajan J. et al., 2014). Актуальною задачею є розроблення методу вакуум-інфільтрації для насичення великих та гетерогенних рослинних об'єктів, якими є бруньки та живці винограду.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконана в рамках відомчих НДР лабораторії фітокріобіології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (ІПКіК НАН України) № 2.2.6.106 «Розробка теоретично – обґрунтованих підходів до кріоконсервування рослинних об'єктів різного рівня організації» (№ державної реєстрації 0116U003496). Де автор самостійно виконував окремі розділи як відповідальний виконавець. Отримані результати були включені до звіту відділу.

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – створити ефективні методи насичення живців та ізольованих бруньок винограду кріозахисними і живильними середовищами для підвищення їх збереженості при низькотемпературному або гіпотермічному зберіганні.

Для досягнення поставленої мети передбачалося вирішити наступні завдання:

1. Створити ампелографічну колекцію в умовах дослідної ділянки.
2. Визначити оптимальні методи і терміни зберігання живців винограду в гіпотермічних умовах.
3. Розробити ефективні способи насичення і відмивання живців і бруньок винограду живильними та кріозахисними середовищами.
4. Вивчити вплив різних способів дегідратації гермплазми винограду на її життєздатність з різним рівнем фізіологічної вологості.
5. Дослідити низькотемпературні фазові переходи і склування у бруньках винограду та в кріозахисних середовищах групи PVS.
6. Оцінити збереженість бруньок винограду після кріоконсервування з застосуванням розроблених методичних підходів щодо насичення їх кріопротекторами та відмивання.

Об'єкт дослідження – життєздатність ізольованих та у складі живців бруньок винограду.

Предмет дослідження – реакція ізольованих та у складі живців бруньок винограду на дію кріозахисних середовищ, гіпотермію та охолодження.

Методи дослідження. В роботі використані сучасні кріобіологічні, біофізичні та біологічні методи: вакуум-інфільтрація, кріоконсервування бруньок винограду, низькотемпературна диференціальна скануюча калориметрія, термічний аналіз, колориметричний тест, культивування живців і бруньок винограду, світлова мікроскопія, конфокальна мікроскопія, статистичний аналіз.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційній роботі вперше створено дві ампелографічні колекції на території Слобожанщини державної власності при ІПКіК НАН України та вперше розроблені нові способи насичення живців та ізольованих бруньок винограду кріозахисними і живильними середовищами, що є надзвичайно важливим для ефективного польового, низькотемпературного і гіпотермічного зберігання генетичних ресурсів винограду. Вперше розроблено спосіб насичення рослинних об'єктів трубчасто-капілярної структури методом вакуум-інфільтрації і доведена його ефективність. Визначено оптимальні параметри тиску необхідного для насичення живців винограду з відкритими зрізами. Вперше встановлено, що метод вакуум-інфільтрації дозволяє прискорити насичення прищепної частини винограду стимулюючими середовищами

більш ніж в 10 разів, отже дозволяє виключити стадію вимочування живців і знизити можливість перенесення вірусних інфекцій.

Вперше проаналізовано вплив вакуум-інфільтрації для відновлення початкової вологості в живцях винограду в умовах холодильної камери на зміну їх рівня вологості і життєздатності при тривалому гіпотермічному зберіганні. Визначено кількісні значення оптимальних концентрацій сахарози для насичення сплячих бруньок винограду методом вакуум-інфільтрації та досліджено життєздатність бруньок і терміни їх пророщування залежно від ступеня вологості та часу насичення.

Вперше досліджено фазовий стан в інтервалі температур від $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ до повного плавлення у бруньках винограду, які були насичені кріозахисними середовищами групи PVS різними методами. Доведено можливість ефективного насичення ізольованих бруньок винограду методом вакуум-інфільтрації без втрати їх життєздатності та визначено умови якісного насичування бруньок розчинами PVS для подальшого кріоконсервування методом вітрифікації.

Практичне значення отриманих результатів. Результати роботи дозволяють поглибити уявлення про кріорезистентність бруньок винограду у стані спокою та розширюють можливості тривалого збереження життєздатності гермплазми винограду, забезпечення її генетичної стабільності, запобігання ризику ураження різними інфекціями і загибелі в результаті несприятливих чинників у лабораторних та польових умовах. Подальше використання отриманих у роботі даних можливо в області біотехнологій виноградарства та для поповнення асортименту банків рослин, оскільки робота з живцями і бруньками не вимагає стерильності і після деконсервування такий матеріал можна легко використовувати в дослідних умовах за допомогою щеплень і окуліровок. Розроблено спосіб для вакуум-інфільтрації живців плодово-ягідних культур, який полягає в застосуванні зниженого тиску для проходження рідини вздовж живців, що насичуються (патент України №85644). Удосконалення способу для насичення живців (патент України №121556) дозволяє водночас насичувати живильним або кріозахисним середовищем необхідну кількість живців. Розроблено спосіб відмивання живців від кріозахисних середовищ (патент України №136543) із застосуванням підвищеного тиску, який може бути використано як у лабораторних, так і у польових умовах. На підставі отриманих результатів може бути розроблена науково-обґрунтована стратегія для подальшої оптимізації способів кріоконсервування бруньок винограду. Одержані в роботі дані про фазовий стан розчинів PVS можуть бути використані під час розробки методичних підходів кріоконсервування інших видів рослин.

Результати роботи можуть бути рекомендовані для використання в учбовому процесі в навчальних закладах для підготовки спеціалістів у різних галузях біології, зокрема кріобіології, та сільськогосподарських наук.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійним і оригінальним науковим дослідженням здобувача. Основні результати роботи одержані здобувачем особисто. Автором разом із науковим керівником проведено патентно-інформаційне дослідження наукової проблеми, визначено тему, мету та задачі роботи.

Здобувачем отримані експериментальні дані у всіх розділах досліджень результати яких представлено в роботі. Статистична обробка, аналіз, інтерпретація та узагальнення одержаних результатів, формулювання основних положень і висновків проведено автором самостійно. В опублікованих із співавторами роботах особистий вклад здобувача полягає в плануванні та проведенні експерименту, обговоренні отриманих результатів та підготовці матеріалів до публікації.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи були представлені на XIX міжнародній конференції «Консервация генетических ресурсов» (Росія, Пушино, 2008); на міжнародній науково-практичній конференції «Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences» (Польща, Люблин, 2017); на 41, 44-й конференціях молодих учених ІПКіК НАН України спільно з кафедрою UNESCO «Холод в біології і медицині» (Україна, Харків, 2017, 2020); на IV міжнародній науково-практичній конференції студентів, магістрантів та аспірантів «Галузеві проблеми екологічної безпеки» (Україна, Харків, 2018); на V міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології» (Україна, Вінниця, 2018); на 13 всеукраїнській конференції молодих вчених (Україна, Київ, 2019); на міжнародній конференції «Смарт Біо» (Литва, Каунас, 2019); на міжнародній конференції «Europe biobanking week» (Німеччина, Любек, 2019).

Публікація матеріалів. Основні положення дисертації викладені у 21 науковій роботі, з них 2 статті у фахових виданнях України та 1 у закордонному спеціалізованому науковому виданні, 3 статті у збірниках матеріалів конференцій (загалом 2 наукові статті мають ідентифікатор DOI), 5 патентів України на корисну модель. Опубліковано 10 тез доповідей на міжнародних і вітчизняних конференціях.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 164 сторінках друкованого тексту, з яких 124 сторінки основного змісту. Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», 4 розділів з результатами власних досліджень, узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел літератури, а також 5 додатків. До списку літератури входять 185 джерел. Робота ілюстрована 37 рисунками і 14 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У розділі представлено аналіз даних літератури щодо сучасних підходів до збереження генофонду рослинного світу. Показано наявність методів кріоконсервування пилку, меристем та ембріональних клітин винограду. Проте ефективних методів кріоконсервування бруньок та живців винограду на даний час не існує. Аналіз біологічних особливостей винограду показав, що для розробки протоколів кріоконсервування його прищепних частин та для покращення існуючих методів гіпотермічного зберігання необхідна розробка методичних підходів до їх насичення кріозахисними та живильними середовищами. Обґрунтовано доцільність використання методу VIV для кріоконсервування бруньок винограду.

Матеріали і методи дослідження. У розділі приведена характеристика об'єктів, матеріалів і методів дослідження. Дослідження проводилися на базі наукових підрозділів ІПКіК НАН України (м. Харків).

Об'єктом дослідження були живці та бруньки винограду сортів Шевченко, Руський Конкорд, Ріпарія Рупестріс 101/14 (РР101/14), Загадка. Лозу збирали в осінньо-зимовий період зі створених дослідних ампелографічних колекцій, які були закладені столовими, винними та універсальними сортами винограду різного терміну визрівання. Для вивчення кінетики насичення живців винограду різного розміру використовували гліцерин і сахарозу (х.ч. «Merck», Німеччина) в концентраціях 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %. В роботі використовували ряд розчинів PVS: PVS1 (22 % гліцерину + 13 % 1,2-пропандіолу (1,2-ПД) + 13 % етиленгліколю (ЕГ) + 6 % диметилсульфоксиду (ДМСО) + 14 % сахарози); PVS2 (30 % гліцерину + 15 % ЕГ + 15 % ДМСО + 14 % сахарози); PVS3 (44 % гліцерину + 44 % сахарози); PVS4 (35 % гліцерину + 20 % ЕГ + 20 % сахарози) і PVSН (15 % гліцерину + 15 % ЕГ+34 % сахарози). Всі розчини виготовляли на живильному середовищі Мурасіге-Скуга (МС).

Для насичення живців винограду використовували прилади для вакуум-інфільтрації. Ефективність насичення живців оцінювали візуально за інтенсивністю забарвлення зрізів розчином еозину (0,8 г/л). В якості контролю використовували дані інтенсивності проникнення барвника при використанні живців, насичених за методом вимочування. Для парафінування зрізів живців застосовували суміш, яка складалась із 80 % парафіну, 10 % окисненого воску та 10 % не окисненого воску. Перед закладкою на зберігання живці винограду обробляли ледь рожевим розчином перманганату калію.

Імовірність можливого пошкодження живців винограду після вакуум-інфільтрації оцінювали по життєздатності і часу розвитку бруньок на живцях, які порівнювали з групою контролю. Відсоток життєздатності зразка оцінювали як відношення кількості живців з розкритими бруньками до загальної їх кількості у зразку. Пророщування живців проводили у фітотроні з використанням ламп Osram Fluoa за температури 18–20 °С в пластикових контейнерах з використанням вермикуліту в якості ґрунту. Режим освітлення впродовж доби складав 16 год.

Фазові переходи і склування в області температур від –196 °С до повного плавлення досліджували методом низькотемпературної диференційної скануючої калориметрії (ДСК) з використанням калориметру, який було розроблено і виготовлено в ІПКіК НАН України. Кріозахисні розчини (маса = 1 г) або бруньки (без рідини) поміщали у калориметричну комірку. При дослідженні фазових переходів у бруньках для кращого теплообміну зразків зі стінками комірки застосовували порошок бронзи. Зразки охолоджували зануренням у рідкий азот. Термограми реєстрували на етапі нагріву зразків зі швидкістю 0,5 °С/хв.

У роботі порівнювали ефективність класичного пасивного насичення ізолюваних бруньок винограду (вимочування у кріозахисному розчині за нормального атмосферного тиску протягом 60 хв) і методу вакуум-інфільтрації. Для оцінки глибини проникнення речовин із розчину і рівномірності їх розподілення у різних шарах бруньок винограду проводили насичення бруньок розчинами барвників (0,8 г/л еозину; 0,5 г/л флуоресцеїн натрію). Флуоресцентні зображення

бруньок отримували на флуоресцентному конфокальному мікроскопі «LSM-510 Meta» («Carl Zeiss», Німеччина). Довжина хвилі збудження 488 нм. Фільтр емісії для флуоресцеїну натрію 505-526 нм, для хлорофілу 650-700 нм. Ефективність насичення бруньок розчинами PVS оцінювали методом ДСК за зміною температур фазових переходів, зниженням ентальпії кристалізації води і збільшенням стрибка теплоємності після склування. Збереженість меристематичних частин бруньок після кріоконсервування оцінювали на 2 добу методом забарвлення 1% розчином трифеніл-тетразолію хлориду. Життєздатність виноградних бруньок оцінювали візуально за часом їх набухання. У якості контролю використовували життєздатність ізольованих бруньок з нативною вологістю без насичення. Кожний експеримент повторювали не менше 6 разів.

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакету програми «Statistica 10.0». Дані наведено як середнє значення \pm стандартне відхилення. Для перевірки статистичної значимості відмінностей використовували U-критерій Манна-Уїтні.

Результати власних досліджень та їх обговорення

Створення ампелографічних колекцій в умовах дослідних ділянок. Проведена робота по інтродукції 65 південних сортів на дослідній ділянці Біологічної станції ХНУ ім. В.Н. Каразіна та 75 сортів винограду на території ІПКіК НАН України, зокрема саджанців сортів нової генетики. Сорти винограду, які вирощуються на науково-дослідних ділянках мають різні генетично детерміновані ознаки (високопродуктивність, морозостійкість, комплексостійкість до різних хвороб та шкідників), різну промислову цінність (винні та столові). Також колекції містять новітні високо гетерозиготні гібриди, отримані за допомогою методів складної гібридизації. Все це дало можливість одержувати та контролювати власний дослідний матеріал упродовж всього вегетаційного періоду. Проведені роботи по створенню польових ампелографічних колекцій є передумовою створення низькотемпературної колекції, яка стане базою довготривалого зберігання генетичного різноманіття винограду.

Визначення ефективності методів насичення живців винограду. Для насичення рослинних об'єктів трубчасто-капілярної структури живильними та кріозахисними середовищами у роботі розроблено спосіб із застосуванням вакуум-інфільтрації і встановлено, що насичення живців з відкритими зрізами спостерігається вже при зниженому тиску 70 кПа. Час проходження розчину через однувузлові живці винограду досить короткий (табл. 1), що обумовлено анатомічною особливістю винограду, лоза якого має пористу структуру. У тривузлових живцях винограду час насичення розчином збільшувався у 10-20 разів порівняно з однувузловими живцями та у 4-8 разів порівняно з двовузловими. При збільшенні діаметра живців час насичення зменшується, що обумовлено збільшенням площі трубчасто-капілярної системи. Порівняння методу вакуум-інфільтрації з класичним пасивним насиченням живців винограду показало, що при пасивному насиченні розчин еозину проходить у тканини живців досить повільно, рівномірного розподілення барвника не спостерігається навіть через 12 год.

Час вакуум-інфільтрації живців винограду

Культура	Час насичення однотривузлового живця, с	Час насичення двотривузлового живця, с	Час насичення тривузлового живця, с
Виноград, ø 6 мм	10±2	25±5*	125±25*
Виноград, ø 9 мм	7±1	17,5±2,5*	100±20*

Примітка: * - відмінності достовірні порівняно з однотривузловими живцями (p=0,05), n=10.

При дослідженні часу активного насичення живців винограду розчинами сахарози і гліцерину методом вакуум-інфільтрації встановлено, що він збільшується при збільшенні концентрації розчинів і кількості бруньок на живцях (табл. 2). Час насичення однотривузлових живців становив менше однієї хвилини для всіх досліджуваних концентрацій гліцерину і сахарози, а зі збільшенням кількості бруньок на живцях розкид за часом значно збільшувався. Найвірогідніше це може бути пов'язано з відсутністю прямих провідних каналів у структурі живця.

Таблиця 2

Час насичення живців винограду розчинами сахарози і гліцерину різної концентрації методом вакуум-інфільтрації

Кількість бруньок	Розчин	Концентрація, %				
		10	20	30	40	50
		Час насичення, с				
1	Сахароза	10±2	14±3	21±5	26±5	40±6
2		25±6*	35±8*	50±10*	80±15*	105±20*
3		110±15*	120±15*	140±20*	180±25*	360±50*
1	Гліцерин	8±2	10±3	13±5	20±5	25±5
2		20±5*	25±7*	35±7*	50±10*	80±20*
3		95±8*	105±15*	120±15*	150±30*	270±60*

Примітка: * - відмінності достовірні порівняно з однотривузловими живцями (p=0,05), n=10.

Оцінка можливого пошкодження живців винограду методом вакуум-інфільтрації показала, що життєздатність бруньок за тестом культивування не змінювалася у порівнянні з контролем. Більш того, бруньки на таких живцях розвивалися на 2–4 дні раніше контрольних. Це свідчить про те, що метод вакуум-інфільтрації є безпечним та дозволяє ефективно наситити живці у короткі терміни і інактивувати продукти окислення, які були акумульовані у лозі за час зимівлі, мінаючи стадію вимочування, яка протікає до декількох діб.

Важливу роль у зберіганні живців винограду відіграє ступінь їхньої дегідратації. З метою встановлення мінімально допустимої межі зневоднення живців

сорту Шевченко досліджено зміну вологості та її вплив на їхню життєздатність живців (рис. 1).

Вивчення зміни вологості живців винограду в залежності від часу утримання в умовах холодильної камери за температури 2 °С показало, що швидкість зневоднення досить висока у перші 4 доби і становить приблизно 1,5 % на добу (рис. 1, А). При подальшому зберіганні швидкість дегідратації знижується, що, ймовірно, пояснюється проявом водоутримуючих сил клітин. Фізіологічна вологість живців сорту Шевченко перед експериментом складала 52 % (рис. 1, Б). При зниженні вологості до 48 % життєздатність живців не знижувалася, а при досягненні вологості 44 % життєздатність падала приблизно на 10 %. За подальшої дегідратації до 37 % і 33 % життєздатність живців падала на 20 % і 40 % відповідно.

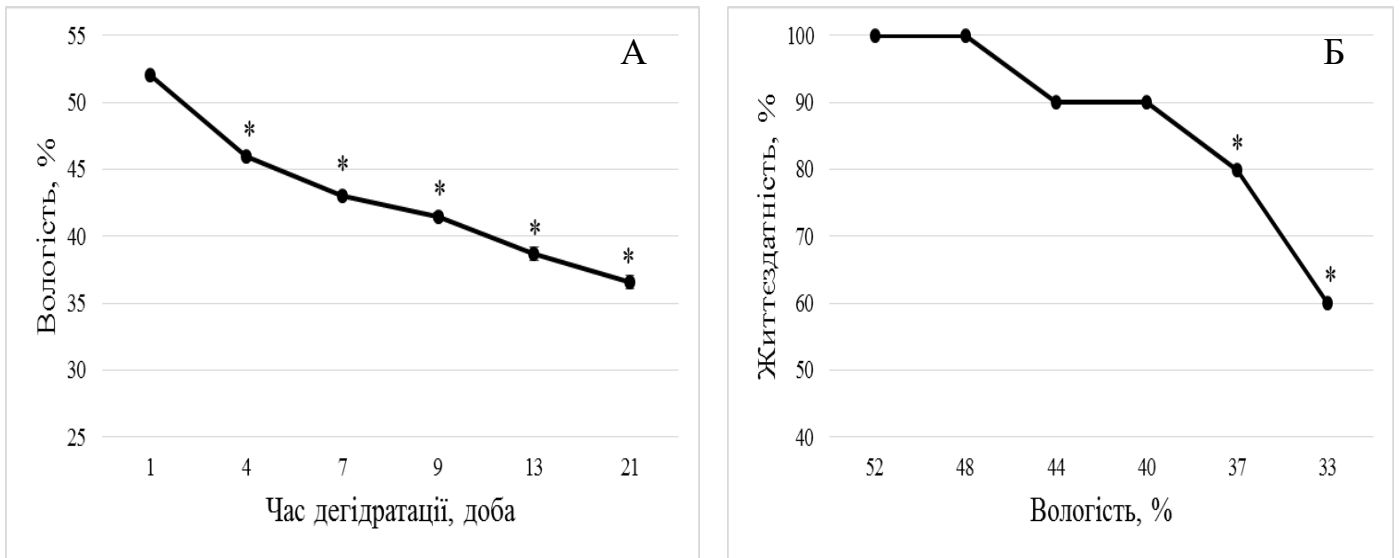


Рис. 1 Зміна вологості живців винограду (А) з відкритими зрізами та її вплив на життєздатність живців (Б) при зберіганні в умовах холодильної камери

Примітка: * – статистично значимі відмінності у порівнянні з контролем ($p < 0,05$), $n = 10$.

З метою максимального уповільнення дегідратації живців при гіпотермічному зберіганні протягом 9 місяців (листопад-серпень) було проаналізовано 4 варіанти підготовки зразків до закладки у холодильну камеру (табл. 3). У I варіанті випаровування відбувалося швидше за рахунок відкритих зрізів і до кінця травня наближалось до вологості 35 %. Рівень життєздатності при цьому знижується на 50 % (рис. 2). У II варіанті швидкість зневоднення була значно нижчою, ніж у контролі завдяки парафінуванню зрізів і мінімальний рівень дегідратації досягався у липні. У III варіанті вологість живців була вищою, ніж у інших варіантах, протягом усіх 9 місяців гіпотермічного зберігання. Використання методу вакуум-інфільтрації (IV варіант) для відновлення вологості живців дозволило отримати найкращі серед усіх варіантів дослідження показники життєздатності при тривалому гіпотермічному зберіганні.

Таблиця 3

Вплив різних способів та термінів зберігання на рівень вологості (%) живців винограду

Варіанти підготовки живців	Строки зберігання, міс.									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
I (контроль)	52	50	48,5 [#]	47 [#]	45 [#]	42 [#]	40 [#]	35 [#]	31 [#]	26 [#]
II	52	51	50	49 [#]	48,5 [#]	46,5 [#]	45 [#]	41 [#]	37 [#]	32 [#]
III	52	51,8	51,3	50,9	50,5	49 [#]	48 [#]	46 [#]	42 [#]	40 [#]
IV	52	51	50	49,5	47,5 [#] - 52(BI)	50,5	50	48 [#] - 52(BI)	50	47 [#] - 52(BI)

Примітки: I – живці з відкритими зрізами, загорнуті в поліетиленову плівку; II – живці з парафінованими зрізами, загорнуті в поліетиленову плівку; III – живці парафіновані повністю, загорнуті в поліетиленову плівку; IV – живці з парафінованими зрізами, загорнуті в поліетиленову плівку. При зниженні рівня вологості до 47–48 % у живцях у процесі зберігання відновлювали вихідний рівень вологості методом вакуум-інфільтрації. BI – використання методу вакуум-інфільтрації; # – статистично значимі відмінності у порівнянні з вихідною вологістю ($p < 0,05$), $n=10$.

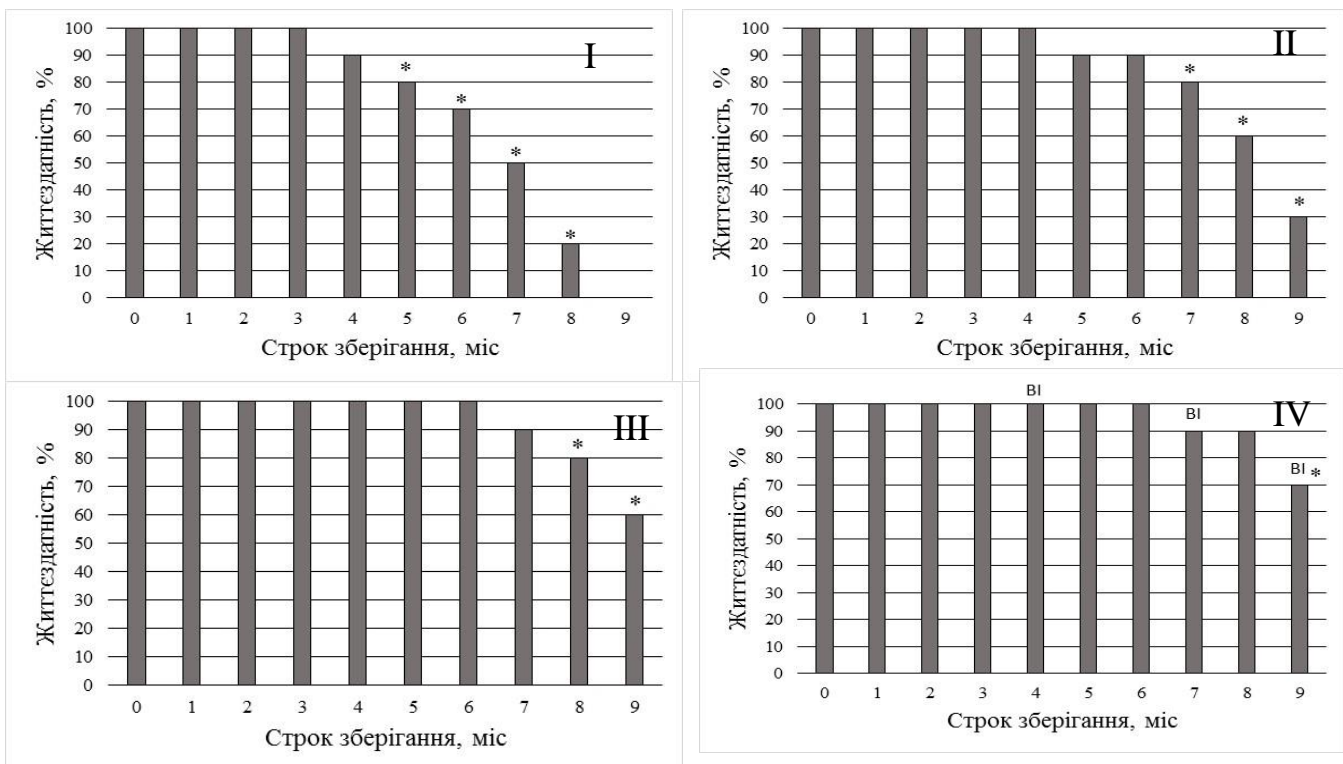


Рис. 2 Вплив строку зберігання на життєздатність живців винограду при різних варіантах підготовки живців (пояснення у примітках таблиці 3)

Примітка: * – статистично значимі відмінності порівняно до контролю ($p < 0,05$), $n=10$.

Дослідження впливу сахарози на гермплазму винограду в умовах дегідратації. Визначено оптимальні концентрації сахарози та терміни експонування живців винограду сорту Шевченко в розчинах сахарози різного процентного складу. Високий рівень життєздатних бруньок відзначався після 2-добової експозиції насичених розчинами 0,75 М сахарози (рис. 3). Більш високі концентрації призводили до зниження енергії проростання і відсотка життєздатних експлантів. Після 3-добової експозиції оптимальні концентрації сахарози становили 0,25 М і 0,5 М, у той час як більш високі концентрації зменшували кількість життєздатних бруньок. Зі зростанням концентрації розчинів сахарози після насичення бруньок винограду і часу експозиції, час пробудження бруньок збільшувався до 4 разів у порівнянні з контрольною групою (табл. 4). Показано, що вплив розчинів сахарози збільшує стан спокою зразків без втрати життєздатності. Цей факт був врахований нами при кріоконсервуванні ізольованих бруньок винограду.

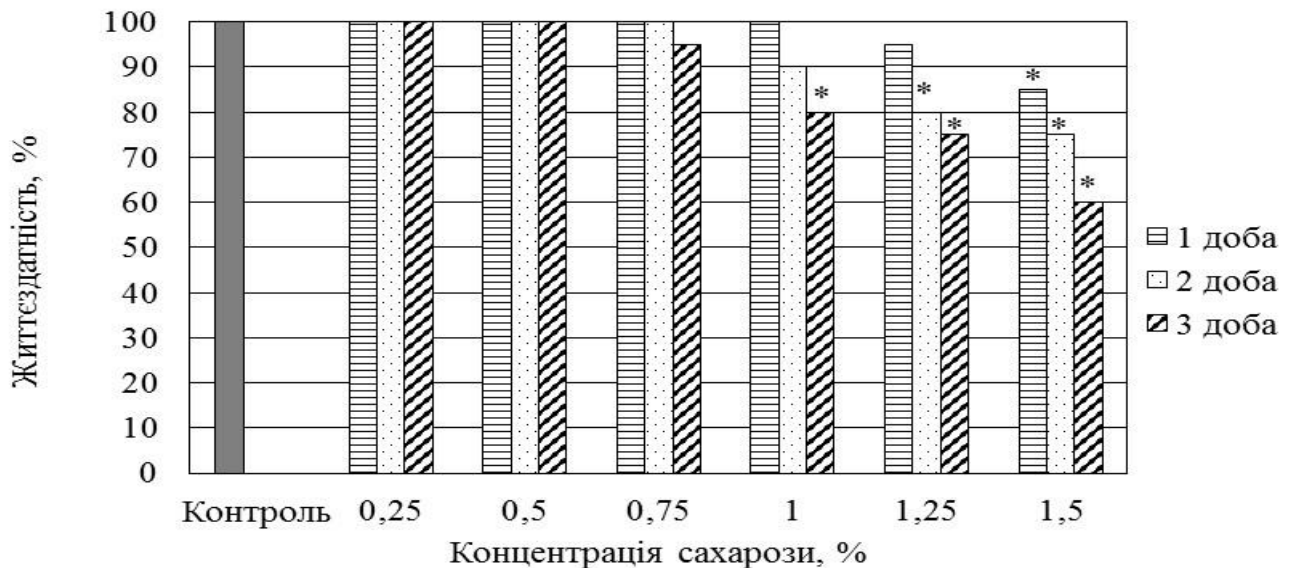


Рис. 3 Життєздатність живців винограду після насичення розчинами сахарози різної концентрації методом вакуум-інфільтрації і різним часом експозиції в середовищі такої ж концентрації

Примітка: * – статистично достовірні відмінності у порівнянні з контролем ($p=0.05$), $n=20$.

Вивчено вплив сахарози на життєздатність живців винограду сорту Шевченко з різним рівнем вологості. Живці винограду насичували розчинами сахарози концентраціями 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 М методом вакуум-інфільтрації з подальшим зневодненням до 50–52 % (варіант 1), 39–42 % (варіант 2), 30–33 % вологості (варіант 3). Життєздатність зразків оброблених сахарозою у варіанті 1 не змінювалась від контролю і становила 100 % (табл. 5), що свідчить про відсутність вираженої токсичної дії сахарози у діапазоні концентрацій 0,1 – 0,7 М на живці винограду з вологістю ~ 50 %. У варіанті 2 життєздатність бруньок винограду в інтервалі концентрацій сахарози 0,5 – 0,7 М суттєво зросла, що демонструє захисну дію сахарози при дегідратації живців у межах 40 % і нижче. У варіанті 3, де вологість зразків становила близько 30 %, вплив сахарози не давав захисної дії, а

прийнятний відсоток життєздатності показано лише у контролі і в групі оброблення 0,1 М розчином сахарози. Зниження життєздатності бруньок у зразках оброблених розчинами сахарози в концентраціях 0,3 – 0,7 М імовірно пов'язано з додатковим зневодненням.

Таблиця 4

Початок набрякання бруньок після насичення живців винограду розчинами сахарози різної концентрації методом вакуум-інфільтрації з різним часом експозиції в середовищі такої ж концентрації

Концентрація сахарози, М	Експозиція, діб		
	1	2	3
Контроль	6,5 ± 0,5	--	--
0,25	7 ± 1	7 ± 1	7,5 ± 0,5
0,5	9,5 ± 1,5	10 ± 1*	11 ± 1*
0,75	11 ± 1*	14 ± 2*	14,5 ± 1,5*
1,0	14 ± 2*	16 ± 2*	16,5 ± 1,5*
1,25	18 ± 2*	22 ± 2*	23 ± 3*
1,5	22 ± 2*	24,5 ± 1,5	26,5 ± 1,5*

Примітка: * – статистично значимі відмінності у порівнянні з життєздатністю живців з фізіологічною вологістю ($p < 0,05$), $n = 20$.

Таблиця 5

Оцінка життєздатності бруньок винограду в залежності від рівня вологості і насичення розчинами сахарози різної концентрації

Вологість живців	Контроль МС	Сахароза 0,1 М+МС	Сахароза 0,3 М+МС	Сахароза 0,5 М+МС	Сахароза 0,7 М+МС
%	Життєздатність, %				
51 ± 1.0	100	100	100	100	100
40,5 ± 1.5	90	80*	80*	100	100
31,5 ± 1.5	60*	80*	60*	60*	60*

Примітка: * – статистично значимі відмінності у порівнянні з життєздатністю живців з фізіологічною вологістю ($p < 0,05$), $n = 10$.

Кріоконсервування ізольованих сплячих бруньок винограду. Досліджено низькотемпературні фазові переходи і склування у перспективних для кріоконсервування бруньок винограду концентрованих і розведених розчинах PVS. Виявлено, що ніяких екзо- або ендотермічних піків на етапі нагріву після швидкого охолодження до -196 °С PVS1, PVS2 і PVS3 не реєструється (табл. 6), що вказує на відсутність кристалізації, як на етапі охолодження, так і на етапі нагріву. Це свідчить, що розчини PVS1, PVS2 і PVS3 на етапі охолодження повністю переходять у склоподібний стан з високою стабільністю аморфної фази, яка не

кристалізується навіть при повільному нагріві вище температури розклування. Для розчинів PVS4 та PVS_N зареєстровано піки кристалізації і плавлення, однак їх площа достовірно не відрізняється, що вказує про розвиток кристалізації тільки на етапі нагріву (рис. 4). Температурний інтервал між розклуванням зразка і розвитком кристалізації із рідкої фази, що з'явилась, у розчині PVS4 істотно більший, ніж PVS_N (табл. 6), що свідчить про більшу стабільність аморфної фази вітрифікуючого розчину PVS4. Розчини PVS2 і PVS3 мають високу склоутворюючу здатність навіть у 80 % концентрації (рис. 5). Таким чином, розчини PVS2 і PVS3 при охолодженні мають високу склоутворюючу здатність зі стабільною аморфною фазою, що робить їх перспективними при кріоконсервуванні різноманітних рослинних об'єктів.

Таблиця 6

Температури фазових переходів і склування у концентрованих і розведених розчинах PVS

Зразок	T _g , °C	T _c , °C	T _m , °C
PVS1	-109,0 ± 0,5	—	—
80 % PVS1	-116,2 ± 0,5	-72,0 ± 0,5	-45,7 ± 0,5
PVS2	-115,3 ± 0,5	—	—
80 % PVS2	-123,0 ± 0,5	-114,3 ± 0,5	-37,4 ± 0,5
PVS3	-93,9 ± 0,5*	—	—
80 % PVS3	-105 ± 0,5	-56,2 ± 0,5	-40,8 ± 0,5
60 % PVS3	-106,2 ± 0,5	-107 ± 0,5	-28,7 ± 0,5
PVS4	-111,5 ± 0,5	-64,0 ± 0,5 [#]	-50,5 ± 0,5
80 % PVS4	-117,4 ± 0,5	-103 ± 0,5	-43,9 ± 0,5
PVS _N	-110,0 ± 0,5	-70,9 ± 0,5	-50,0 ± 0,5
80 % PVS _N	-117,2 ± 0,5	-107,9 ± 0,5	-37,9 ± 0,5

Примітки: T_g – температура склування, T_c – температура кристалізації при нагріві, T_m – температура плавлення.

* – статистично достовірні відмінності у порівнянні з іншими PVS (p=0,05), n=5;

[#] – статистично достовірні відмінності у порівнянні з PVS_N (p=0,05), n=5.

У роботі було розроблено метод вакуум-інфільтрації для насичення ізольованих бруньок винограду розчинами PVS. Визначені оптимальні умови застосування вакууму для таких великих і гетерогенних зразків: обов'язковий етап дегазації бруньок і розчину, тиск 40 кПа та час 15-20 хв для ефективного насичення, поступове підвищення тиску до атмосферного (2-2,5 хв) для запобігання механічного пошкодження тканин бруньок. Проведено порівняльну оцінку ефективності методу вакуум-інфільтрації і пасивного інкубування при насиченні середовищами PVS бруньок винограду сорту Руський Конкорд.

Показано, що на термограмах бруньок насичених PVS крім розклування реєструються завершення кристалізації на етапі нагріву, передплавлення і плавлення (рис. 6). На термограмах ДСК бруньок при використанні методу VIV стрибок теплоємності при склуванні в два рази більше у порівнянні з пасивним вимочуванням, що свідчить про значуще більшу кількість склоподібної фази. Температура плавлення при використанні методу VIV на 4 градуси нижче, а ентальпія плавлення зв'язаної води вище в 2,9 разів у порівнянні з традиційним методом пасивного насичення. Значуще нижчою при цьому є ентальпія плавлення льоду. Отримані результати свідчать про значне збільшення концентрації кріозахисних речовин у бруньках винограду й істотне зменшення кількості вільної води, яка кристалізується при охолодженні під час використання VIV технології.

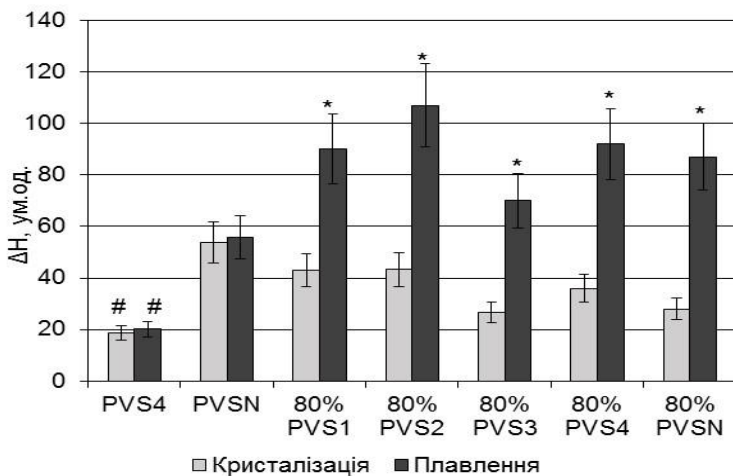


Рис. 4 Ентальпії (ΔH) кристалізації і плавлення розчинів PVS

Примітки: # – статистично достовірні відмінності у порівнянні з іншими PVS ($p=0,05$), $n=5$;

* – статистично достовірні відмінності у порівнянні з ентальпією кристалізації того ж PVS ($p=0,05$), $n=5$.

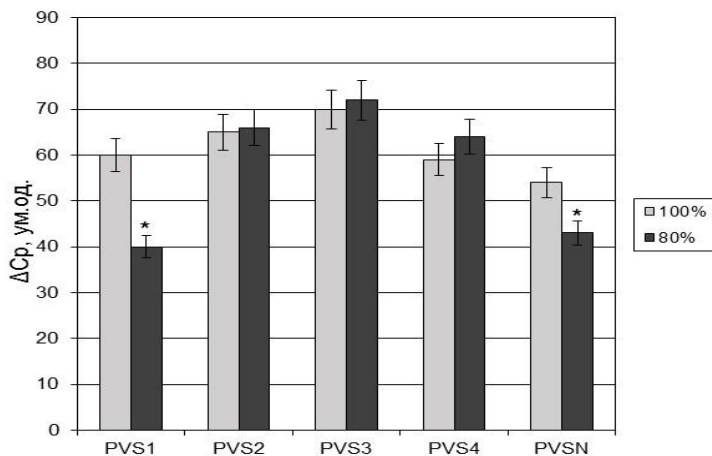


Рис. 5 Стрибок теплоємності при склуванні (ΔC_p) розчинів PVS

Примітка: * – статистично достовірні відмінності у порівнянні з 100% PVS ($p=0,05$), $n=5$.

У роботі порівняно ефективність кріоконсервування методом VIV та при пасивному насиченні ізольованих сплячих бруньок винограду сортів Руський Конкорд, Ріпарія X Рупестріс 101/14 та Загадка кріозахисним середовищем PVS2. Показано, що збереженість виноградних бруньок для сортів Руський Конкорд, РР 101/14 та Загадка за тестом відновлення тетразолія хлористого складала 60 – 80 % після застосування методу VIV. Життєздатність деконсервованих бруньок протягом 4 тижнів культивування становила 30 % для сорту Руський Конкорд, 40 % для сорту Загадка, 0 % для сорту РР 101/14. При використанні пасивного методу насичення бруньок винограду перед кріоконсервуванням, збереженість та

життєздатність деконсервованих зразків була 0 % для усіх досліджених сортів винограду. Великий відсоток життєздатності деконсервованих бруньок сорту Загадка може бути видовою ознакою та обумовлений особливостями деревини, яка має більш пористу структуру на відміну від сортів Руський Конкорд и РР 101/14. Також важливим є розташування бруньок на живцях.

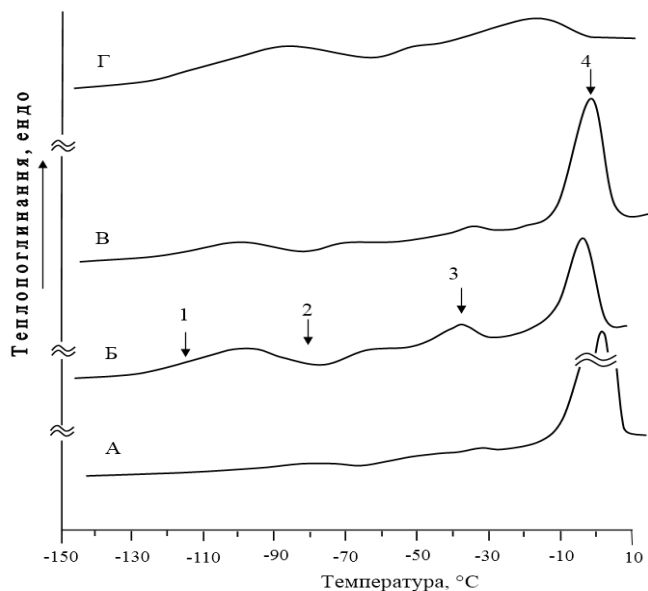


Рис. 6 ДСК-термограми: А – бруньки винограду (контроль); Б – бруньки винограду, насичені PVS2 методом VIV; В – бруньки винограду, насичені PVS2 методом вимочування (60 хв); Г – бруньки винограду, насичені PVS2 методом вимочування (6 год). 1 – розклування; 2 – кристалізація; 3 – передплавлення; 4 – плавлення

З огляду на те, що у сорту РР 101/14, як і у інших морозовитривалих сортів, бруньки мають маленький розмір та утоплені у структуру деревини, насичення їх розчином PVS ускладнено. Бруньки на живцях у сорту Загадка більші за розміром, ніж бруньки сорту Руський Конкорд та більш відокремлені від деревини. Імовірно, саме ці показники впливають на ефективність насичення методом VIV, а отже і на результати кріоконсервування.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлені теоретичне й експериментальне узагальнення та нове рішення наукового завдання, направлено на вивчення впливу гіпотермічного зберігання живців винограду на їх збереженість, в залежності від способів їх обробки та рівня вологості. Розроблено нові способи насичення живців та ізольованих бруньок винограду кріозахисними і живильними середовищами, доведено їх ефективність у протоколах кріоконсервування і гіпотермічного зберігання гермплазми винограду. Дослідження, проведені у дисертаційній роботі, доводять важливість збереження гермплазми винограду у польових, гіпотермічних та низькотемпературних умовах.

1. Створено дві ампелографічні колекції при ІПКіК НАН України, що забезпечує збереження генетичних ресурсів рідкісних та перспективних сортів для Північного виноградарства України у польових умовах.

2. Встановлено, що метод вакуум-інфільтрації при використанні тиску близько 70 кПа є безпечним і ефективним та дозволяє: прискорити насичення прищепної частини винограду живильними та кріозахисними середовищами більш ніж у 10 разів, виключити стадію вимочування живців та знизити можливість

перенесення вірусних інфекцій, відновлювати початкову вологість живців та суттєво збільшити термін гіпотермічного зберігання.

3. Визначено кількісні значення оптимальних концентрацій сахарози (0,1 – 0,7 М) для насичення сплячих бруньок винограду методом вакуум-інфільтрації та досліджені життєздатність бруньок та терміни їх пророщування залежно від рівня вологості та часу насичення.

4. Методом ДСК показано, що розчини PVS1, PVS2 і PVS3 мають високу склоутворюючу здатність та більшу стабільність аморфної фази порівняно з PVS4 і PVS_N, що робить їх більш перспективними при кріоконсервуванні різноманітних рослинних об'єктів.

5. Визначено, що для ефективного насичення бруньок винограду різними розчинами PVS з метою подальшого кріоконсервування необхідно застосовувати тиск 40 кПа протягом 15-20 хв. з поступовим його підвищенням (протягом 2-2,5 хв) до атмосферного.

6. Досліджено фазовий стан при низьких температурах в бруньках винограду, які було насичено кріозахисними середовищами групи PVS різними методами. Високі показники проникнення кріозахисних речовин усередину бруньок отримано при насиченні PVS2 за умови використання методу вакуум-інфільтрації. Встановлено, що стрибок теплоємності при склуванні в два рази більше, температура плавлення на 4 градуси нижче, ентальпія плавлення зв'язаної води в 2,9 разів вища у порівнянні з традиційним методом пасивного насичення, що свідчить про значуще більшу кількість склоподібної фази.

7. Встановлено, що пасивне вимочування не забезпечує збереженість бруньок винограду після кріоконсервування, тоді як застосування методу VIV є більш ефективним. Показано, що після кріоконсервування виноградних бруньок під захистом PVS2 збереженість для сортів Руський Конкорд, РР 101/14 та Загадка складає 60 – 80 % після застосування методу VIV, і 0 % – при насиченні пасивним вимочуванням. Життєздатність деконсервованих бруньок протягом 4 тижнів культивування становила 30 % для сорту Руський Конкорд, 40 % для сорту Загадка та 0 % для сорту РР 101/14.

ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових журналах України

1. Присталов А. І., Кулешова Л. Г., Боброва О. М., Зеленянська Н. М. Ефективність метода вакуум-інфільтрації для насичення різними розчинами рослинних об'єктів трубчасто-капілярної структури. *Вісник проблем біології і медицини*. 2020. №4 (158). С. 65–69. (Внесок здобувача: розробка методичних підходів, приготування експериментальних зразків, проведення досліджень, обробка і аналіз отриманих експериментальних даних.)

2. Присталов А. И., Бондарь И. Н., Полулях А. А., Лиховской В. В. Виноградарство Слобожанщины: история, проблемы, перспективы создания и сохранения коллекций. *Вісник Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна. Сер. Біологія*. 2015. № 20 (1100). С. 53–60. (Внесок здобувача: аналіз стану виноградарства Слобожанщини та створення 2 ампелографічних колекцій,

розробка методичних підходів до криоконсервування гермплазми винограду, проведення досліджень, обробка і аналіз отриманих експериментальних даних.)

Статті в наукових журналах інших країн

3. Vozovyk K., Bobrova O., Prystalov A., Shevchenko N., Kuleshova L. Amorphous state stability of plant vitrification solutions. *Biologija*. 2020. № 66 (1). P. 47–53. (Внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, обробка і аналіз отриманих експериментальних даних.)

Статті в збірках матеріалів конференцій

4. **Приста́лов А. І.**, Кулешова Л. Г. Розробка примусового насичення живців винограду різними середовищами методом вакуум-інфільтрації. *International research and practice conference “Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences”*. (Lublin, 27-28 Dec. 2017). Izdevnieciba “Baltija Publishing”. Lublin, 2017. P. 278–282. (Внесок здобувача: розробка метода насичення живців винограду, приготування експериментальних зразків, проведення досліджень, обробка і аналіз отриманих експериментальних даних.)

5. **Приста́лов А. И.**, Боброва Е. Н., Кулешова Л. Г. Стабильность аморфного состояния витрифицирующихся сред для криоконсервирования растительных объектов. *Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології* : зб. матеріалів V Міжнар. наук. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених, 7–8 лист. 2018. Вінниця. С. 161–163. (Внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, обробка і аналіз отриманих експериментальних даних.)

6. **Приста́лов А. И.**, Боброва Е. Н., Кулешова Л. Г. Насыщение изолированных почек винограда витрифицирующимся раствором методом вакуум-инfiltrации. *Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології* : зб. матеріалів V Міжнар. наук. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених, 7–8 лист. 2018. Вінниця. С. 159–161. (Внесок здобувача: розробка метода насичення ізольованих бруньок винограду, приготування експериментальних зразків, проведення досліджень, обробка і аналіз отриманих експериментальних даних.)

Тези конференцій

7. Лысак Ю. С., **Приста́лов А. И.**, Стрибуль Т. Ф., Ходько А. Т. Низкотемпературное консервирование меристем винограда. *Виноградарство и виноделие*: сб. науч. тр. Ялта: 2011. №61(2). С. 5–6.

8. **Prystalov A.**, Bobrova O., Govorova Yu., Rozanov L.. Perspectives of vacuum infiltration vitrification (VIV)-cryopreservation in dormant grape buds biobanking. *Europe biobanking week 2019, biobanking for a healthier world 8–11 October 2019, Lubeck, German*: Abstract book, 201. P. 26–27.

9. Стрибуль Т. Ф., Шевченко Н. А., **Приста́лов А. И.**, Лысак Ю. С. Методы получения сверхбыстрых скоростей охлаждения биологических объектов. Криоконсервация, как способ сохранения биологического разнообразия. *Биофизика живой клетки* : зб. матеріалів доп. учасн. 28–30 окт. 2008 г., Пушино: 2008. С. 126.

10. Стрибуль Т. Ф., Лысак Ю. С., **Приста́лов А. И.**, Коваленко И. Ф. Исследование динамики насыщения меристем винограда криозащитными средами. Криоконсервация, как способ сохранения биологического разнообразия. *Биофизика живой клетки* : зб. матеріалів доп. учасн. 28–30 окт. 2008 г., Пушино: 2008. С. 125.

11. Чернобай Н. А., Шевченко Н. О., **Присталов А. І.**, Каднікова Н. Г. Кріоконсервування генетичних ресурсів рослин в Україні. *Біологія рослин та біотехнологія*: зб. матеріалів доп. учасн. третьої конференції молодих вчених 16–18 травня 2017 р., Київ: НАУ, 2017. С. 19.

12. **Присталов А. І.** Вплив рівня вологості гермплазми винограду на її життєздатність після різних способів і термінів гіпотермічного зберігання. *Холод в біології та медицині – 2017*: зб. матеріалів 41-ї конф. мол. вчених травень 2017 р., Харків : журнал Проблеми кріобіології та кріомедицини, 2017; 27(2). С. 181.

13. **Присталов А. І.**, Кулешова Л. Г. Альтернативные способы обработки виноградников. *Галузеві проблеми екологічної безпеки*: зб. матеріалів IV Міжн. наук.-практичн. конф. студентів, магістрантів та аспірантів 19 жовтня 2018, Харків: 2018. С.151.

14. **Присталов А. І.**, Боброва О. М., Кулешова Л. Г. Comparative evaluation of the saturation efficiency of isolated grape buds with cryoprotectants. 13 IMBG all-Ukrainian conference of young scientists. Held in institute of molecular biology and genetics NAS of Ukraine, May 22-25, 2019, Kyiv: 2019. Poster.

15. Vozovyyk K., Bobrova O., Shevchenko N., **Prystalov A.** Stability of amorphous state of plant vitrification solutions. *Smart Bio*: Abstract book: International Conference May 2-4, 2019, Kaunas: 2019. P. 212.

16. **Prystalov A.**, Bobrova O., Kuleshova L. Cryopreservation of grape buds. *Cold in Biology and Medicine – 2020*: May 2020, Kharkiv: Problems of Cryobiology and Cryomedicine, 2020; Vol. 30(3). P. 292.

Патенти України на корисну модель

17. Спосіб отримання високих швидкостей охолодження біологічних об'єктів: пат. 38896 Україна. № 200810002; заявл. 01.08.2008; опубл. 26.01.2009, Бюл. № 2. 4 с.

18. Спосіб отримання високих швидкостей охолодження біологічних об'єктів: пат. 38895 Україна. № 200810001; заявл. 01.08.2008; опубл. 26.01.2009, Бюл. № 2. 4 с.

19. Лабораторний пристрій для вакуум-інфільтрації живців плодово-ягідних культур: пат. 85644 Україна. № 201307024; заявл. 04.06.2013; опубл. 25.11.2013, Бюл. № 22. 4 с.

20. Пристрій для вакуум-інфільтрації живців плодово-ягідних культур: пат. 121556 Україна. № 201705937; заявл. 14.06.2017; опубл. 11.12.2017, Бюл. № 23. 4 с.

21. Спосіб відмивання живців плодово-ягідних культур від кріозахисних середовищ: пат. 136543 Україна. № 201901934; заявл. 26.02.2019; опубл. 27.08.2019, Бюл. №16. 4 с.

Анотація

Присталов А.І. Вплив складу кріозахисного середовища та методів охолодження на життєздатність гермплазми винограду. – Кваліфікаційна робота на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2021.

Дисертаційна робота присвячена збереженню генетичних ресурсів винограду у польових ампелографічних колекціях та розробці ефективних методів насичення живців та ізольованих бруньок винограду кріозахисними і живильними середовищами для підвищення їх збереженості при низькотемпературному або гіпотермічному зберіганні. У роботі запропоновано і апробовано спосіб насичення прищепних частин винограду методом вакуум-інфільтрації і доведена його висока ефективність. Виявлено, що метод вакуум-інфільтрації дозволяє прискорити насичення живців винограду з відкритими зрізами живильними та кріозахисними середовищами більш ніж в 10 разів, отже дозволяє виключити стадію вимочування живців і знизити можливість перенесення вірусних інфекцій. Визначено, що для якісного насичення бруньок винограду різними розчинами PVS з метою подальшого кріоконсервування, важливим етапом є попередня дегазація бруньок і кріозахисного середовища при тиску 20 кПа, а на етапі насичування необхідно застосовувати тиск 40 кПа протягом 15-20 хв. з поступовим його підвищенням (протягом 2-2,5 хв) до атмосферного. Досліджено низькотемпературні фазові переходи в бруньках винограду, які було насичено середовищами PVS різними методами. Встановлено, що при використанні методу вакуум-інфільтрації у бруньках винограду при охолодженні формується значуще більша кількість склоподібної фази у порівнянні з пасивним вимочуванням. Показано, що після кріоконсервування виноградних бруньок під захистом PVS2 збереженість для сортів Руський Конкорд, РР 101/14 та Загадка складає 60 – 80 % при застосуванні методу VIV, і 0 % - при насиченні пасивним вимочуванням.

Ключові слова: кріоконсервування, бруньки та живці винограду, вакуум-інфільтрація, кріопротектори, низькотемпературні фазові переходи, збереженість бруньок.

Аннотація

Присталов А.И. Влияние состава криозащитной среды и методов охлаждения на жизнеспособность гермплазмы винограда. – Квалификационная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.19 – криобиология. – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2021.

Диссертация посвящена сохранению генетических ресурсов винограда в полевых ампелографических коллекциях и разработке эффективных методов насыщения черенков и изолированных почек винограда криозащитными и питательными средами для повышения их сохранности при низкотемпературном или гипотермическом хранении. В работе предложен и апробирован способ насыщения растительных объектов трубчато-капиллярной структуры методом вакуум-инfiltrации и доказана его высокая эффективность. При определении оптимальных параметров давления необходимого для насыщения черенков винограда с открытыми срезами, показано, что насыщение черенков питательными средами и криопротекторами методом вакуум-инfiltrации является безопасным и эффективным при использовании давления около 70 кПа. Выведено, что метод вакуум-инfiltrации позволяет ускорить насыщение привойной части винограда питательными и криозащитными средами более чем в 10 раз, что, следовательно,

позволяет исключить стадию вымачивания черенков и снизить возможность переноса вирусных инфекций. Установлена зависимость между снижением влажности и жизнеспособностью черенков винограда при гипотермическом хранении. Предел обезвоживания, при котором жизнеспособность достоверно не меняется, составляет 40 %. Использование метода вакуум-инfiltrации позволяет восстанавливать первоначальную влажность черенков и существенно увеличить срок гипотермического хранения.

При исследовании влияния сахарозы на жизнеспособность черенков в условиях дегидратации определены количественные значения оптимальных концентраций сахарозы (0,1 - 0,7 М) для насыщения спящих почек винограда методом вакуум-инfiltrации. Выявлено, что с ростом концентрации изученных растворов сахарозы при насыщении почек винограда и времени экспозиции в растворах такой же концентрации, время пробуждения почек увеличивалось в 4 раза по сравнению с контрольной группой. Влияние сахарозы увеличивает состояние покоя исследуемых образцов, что было использовано нами при криоконсервировании изолированных почек винограда.

Доказана возможность эффективного насыщения изолированных почек винограда методом вакуум-инfiltrации без потери их жизнеспособности. Определено, что для качественного насыщения почек винограда различными растворами PVS с целью дальнейшего криоконсервирования, важным этапом является предварительная дегазация почек и криозащитной среды при давлении 20 кПа, а на этапе насыщения необходимо применять давление 40 кПа в течение 15-20 мин. с постепенным его повышением (в течение 2-2,5 мин) до атмосферного.

Методом ДСК показано, что растворы PVS1, PVS2 и PVS3 имеют более высокую стеклообразующую способность и стабильность аморфной фазы по сравнению с PVS4 и PVSN, что делает их более перспективными при криоконсервировании различных растительных объектов. Раствор PVS3 имеет самую высокую температуру стеклования (-93,9 °С), по сравнению с другими изученными PVS.

Исследовано фазовое состояние в почках винограда, которые были насыщены криозащитными средами группы PVS различными методами при температурах от -196 °С до полного плавления. Установлено, что при использовании метода вакуум-инfiltrации (15 мин инкубации) скачок теплоемкости при стекловании в два раза больше по сравнению с пассивным вымачиванием (60 мин инкубации), что свидетельствует о значимо большем количестве стеклоподобной фазы. Температура плавления при использовании метода вакуум-инfiltrации на 4 градуса ниже, а энтальпия плавления связанной воды выше в 2,9 раза по сравнению с традиционным методом пассивного насыщения. Значимо ниже при этом и энтальпия плавления льда.

Пассивное вымачивание не обеспечивает сохранность почек винограда после криоконсервирования, тогда как применение метода VIV является более эффективным. Показано, что после криоконсервирования виноградных почек под защитой PVS2 сохранность для сортов Русский Конкорд, РР 101/14 и Загадка составляет 60 – 80 % при использовании метода VIV, и 0 % - при насыщении пассивным вымачиванием. Жизнеспособность деконсервированных почек в течение

4 недель культивирования составляла 30 % для сорта Русский Конкорд, 40 % для сорта Загадка и 0 % для сорта РР 101/14. Корреляции между морозостойкостью и криорезистентностью различных сортов винограда при использовании метода VIV обнаружено не было. Полученные в данной работе результаты могут быть использованы в исследованиях, связанных с разработкой методов криоконсервирования различных растительных объектов.

Ключевые слова: криоконсервирование, почки и черенки винограда, вакуум-инфильтрация, криопротекторы, низкотемпературные фазовые переходы, сохранность почек.

Annotation

Pristalov AI Influence of cryoprotective medium composition and cooling methods on grape germplasm viability. – The qualifying scientific paper as a manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Science (Philosophy Doctor) in specialty of 03.00.19 – cryobiology. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2021.

The dissertation is devoted to preservation of grape genetic resources in ampelographic field collections and developing the effective methods of saturation of cuttings and isolated grape buds with cryoprotective and nutrient media to increase their safety during low-temperature or hypothermic storage. The method of saturation of grapes grafted parts by vacuum infiltration is proposed and tested in the work as well as its high efficiency was proved. It was found that the method of vacuum infiltration could accelerate the saturation of grape cuttings with open sections of nutrient and cryoprotective media more than 10 times, thus eliminating the stage of soaking cuttings and reduce the possibility of transmission of viral infections. It is determined that for high-quality saturation of grape buds with different PVS solutions for further cryopreservation, an important step is pre-degassing of buds and cryoprotective medium at a pressure of 20 kPa, and at the saturation stage it is necessary to apply a pressure of 40 kPa for 15-20 minutes with its gradual increase (within 2-2.5 min) to atmospheric one. Low-temperature phase transitions in grape buds, which were saturated with PVSs by different methods, were studied. It has been established that when using the method of vacuum infiltration in the grape buds, a significantly larger amount of vitreous phase is formed during cooling in comparison with passive soaking. It has been shown that after cryopreservation of grape buds under the protection of PVS2, the preservation for the varieties Russian Concord, РР 101/14 and Zagadka is 60 – 80 % when using the VIV method, and this makes 0 %, when saturated with passive soaking.

Keywords: cryopreservation, buds and cuttings of grapes, vacuum infiltration, cryoprotectants, low-temperature phase transitions, preservation of buds.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ДСК – диференційна скануюча калориметрія; 1,2-ПД – 1,2-пропандіол; ДМСО – диметилсульфоксид; ЕГ – етиленгліколь; МС – живильне середовище Мурасіге-Скугга; PVS – розчини для вітрифікації рослин; VIV – vacuum infiltration vitrification (українського відповідника немає); РР – Ріпарія X Рупестріс.

Відповідальний за випуск – д.б.н. Г.О. Бабійчук

Підписано до друку 02.03.2021
Формат 60 x 84 1/16. Папір офсетний. Гарнітура Times New Roman.
Друк ксерографічний. Ум. друк. арк. 0,9.
Наклад 100 прим. Зам.№
Надруковано з макету замовника у ФОП Бровін О.В.,
61022, м. Харків, вул. Трінклера 2, корп. 1, к.19.