



*Л.В.Горбунов, к.с.-г.н., пров.н.с., лабораторії трансплантації і кріоконсервації ембріонів,
А.С.Саліна, н.с., лабораторії трансплантації і кріоконсервації ембріонів,
Інститут тваринництва УААН, Харків
Т.П.Шиянова, інженер, лабораторія інтродукції та збереження генетичних ресурсів рослин,
Інститут рослинництва УААН, Харків,
В.О.Волинкін, д.с.-г.н., зав. відділом селекції, генетики винограду і ампелографії,
А.А.Полулях, к.с.-г.н., с.н.с.
Національний інститут винограду і вина "Магарач"*

КРИТИЧНІ ЗОНИ ВІДПОВІДНІ ЗНИЖЕННЮ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ЧУБУКІВ ВИНОГРАДУ ПРИ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ

Створення банку генетичного матеріалу рослин передбачає безпосереднє використання низьких і наднизьких температур для довгострокового зберігання цінних зразків культур. Умова підвищення рівня життєздатності біооб'єкта, який піддається кріоконсервуванню, полягає у виключенні росту внутрішньоклітинних кристалів льоду [1-3]. Визначення параметрів, які обумовлюють критичні температурні зони, відповідні зниженню життєздатності клітин, тісно пов'язане з умовами тривалого зберігання біологічного матеріалу. Для визначення пріоритетів розвитку способу кріоконсервування рослин ключовим питанням є вибір температурного діапазону зберігання біологічного матеріалу, якими є низькі або наднизькі (азотні: до -196°C) температури. Відповідь на поставлене питання дасть можливість визначити рентабельний спосіб зберігання генетичного матеріалу різних видів рослин. Тому, для розробки технологічних способів тривалого зберігання чубуків винограду існує необхідність визначення критичних зон, відповідних зниженню життєздатності біооб'єкту і вивчення факторів, що впливають на дані процеси.

Тому, мета нашої роботи полягала у вивченні впливу ступеня вологості, швидкості охолодження та тривалості збереження на життєздатність чубуків винограду.

Методика досліджень. Об'єктом дослідження служили чубуки винограду сортів: Аліготе, Ркацителі, Трамінер рожевий, Берландієрі x Ріпарія Кобер 5ББ та Лідія. Чубуки були нарізані з одно-

У роботі показано, що на життєздатність деконсервованих чубуків винограду впливає комплекс параметрів, які можна звести до двох факторів – плазмоліз і внутрішньоклітинне кристалоутворення. Утворення кристалів пов'язане з надміром внутрішньоклітинної води і швидкістю заморожування, які проявляють свою згубну дію в зниженні показників збереженості і життєздатності біооб'єкту при швидкості його охолодження $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ і вище. Плазмоліз навпаки викликає зниження життєздатності біооб'єкту при збереженості морфологічної цілісності клітин, при недовліку вологи, що зв'язане із швидкістю охолодження $0, 1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ і нижче.

річних пагонів та розділені на окремі зразки по 10 ± 2 шт., довжиною від 10 до 12 см та діаметром 0,6-1,0 см. Після нарізки частина чубуків зберігалась в холодильнику при -5°C , а інша частина – в сушильній камері при 4°C . Перед висушуванням зразків перевіряли їх життєздатність та початкову вологість. Ступінь вологості визначали шляхом зважування та розрахунку за такими формулами:

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

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

де η_i – вологість зразка (%); $i=0$ нативного; $i=1$ після висушування; $i=2$ кріоконсервування; $i=3$ регідрації; 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 у процесі висушування (г).

Потім чубуки були розділені на групи для висушування за трьох режимів: «активного», «напівактивного», «пасивного». Ступінь вологості для нативних чубуків змінювали від 50 до 30%, на основі застосування вказаних режимів

сушки: 1 – «активний» – сушильна камера, температура $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ з вологістю повітря $25 \pm 5\%$ на протязі 3-х діб; 2 – «напівактивний» – сушильна камера, температура $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ з вологістю активного потоку повітря $75 \pm 5\%$; 3 – «пасивний» – за температури $-2 \pm 2^{\circ}\text{C}$, вологості повітря $85 \pm 5\%$, без примусового обдування [4].

Для збереження остаточної вологості, чубуки перед охолодженням обробляли воском + парафіном з обох кінців або повністю. Далі їх витримували за різних низьких температур: від 4°C (камера) до -28°C впродовж 10 днів і більше та перевіряли на життєздатність.

Отримання різних швидкостей заморожування-відігрівання, необхідних для кріоконсервування чубуків, проводили у декілька етапів. Режим охолодження, заснований на ступінчастому охолодженні із швидкістю $0,01 - 0,1^{\circ}\text{C}/\text{год}$ до температур $-5 - 30^{\circ}\text{C}$ з інтервалом 5°C і витримкою одну, три та сім діб відповідно, при переміщенні зразків, розміщених в побутових термосах місткістю 2 л, в рефрижератори. Для зміни швидкостей заморожування дос-

ліджуваних чубуків в діапазоні $0,1 \div 0,5^\circ\text{C}/\text{год}$ застосовували спеціальні насадки (що мають різний ступінь відкритості) на побутові термоси (місткістю 1,5 і 2 л). Для швидкостей $0,5 \div 1,5^\circ\text{C}/\text{год}$ – на основі застосування пристрою [5]. Охолодження від температури -30 до -196°C реалізовували безпосереднім зануренням зразка в рідкий азот із швидкістю $1000 \div 1200^\circ\text{C}/\text{хв}$.

Різні швидкості відігрівання біоб'єкту реалізовували за допомогою їх переміщення в рідкі і газоподібні теплоносії. Відтавання в повітрі: із швидкістю $1 \div 3^\circ\text{C}/\text{хв}$ проводили при безпосередньому переміщенні зразка в холодильник при температурі 5°C ; ступінчасте відтавання із швидкістю $0,1^\circ\text{C}/\text{год}$ до температури -30°C з інтервалом 5°C і витримкою у продовж доби, відповідно, при розміщенні зразків, що знаходяться в побутових термосах місткістю 2 л, в рефрижератори; у приміщеннях при температурі 20°C . В якості рідкого теплоносія використовували водяну баню, що мала різну температуру від $+20$ до $+80^\circ\text{C}$, з кроком 10°C .

Вивчення впливу ефектів низькотемпературної сублимації внутрішньоклітинної води і плазмолізу проводили на основі дослідження параметрів збереженості і життєздатності чубуків. Контроль життєздатності та збереженості чубуків проводили після кожного етапу висушування та заморожування. Для цього чубуки ставили на гідратацію в ексикатор з дистильованою водою і витримували на протязі 12 днів при температурі $+5^\circ\text{C}$, а потім пророщували в умовах *in vitro* (в склянках з водою при $t = +20 \div 25^\circ\text{C}$) або пророщували чубуки і бруньки *in vivo* (укорінення в ґрунті). Набухання і розвиток бруньок характеризувало життєздатність досліджуваного зразка. Відсоток життєздатності зразка оцінювали як відношення кількості чубуків з розкритими бруньками в умовах *in vitro* або *in vivo* до загальної їх кількості у зразку.

Показник збереженості оцінювали шляхом проведення гістологічних зрізів бруньок і чубуків за допомогою морфоанатомічних досліджень з використанням біокуляру (розтин бруньок та деревини з визначенням їх пошкоджень за кольором) [6].

Для визначення критичних температурних зон клітин чубуків винограду використовували спосіб, який заснований на оцінці зміни рівня життєздатності біологічного матеріалу від кінцевої температури їх охолодження в діапазоні від -5 до -30°C , з подальшим відтаванням. Для визначення критичної температурної зони застосовували спосіб, який виражається через співвідношення життєздатності біоб'єкту після охолодження до заданої температури Φ (3):

$$L_0 = (1 - V_0/V) \cdot 100\%, \quad (3);$$

де L_0 – відносний показник зниження життєздатності охолоджених зразків від -5 до -30°C ; V_0 – проростання охолоджених зразків до заданої температури з подальшим відігріванням до $+20^\circ\text{C}$; V_c – проростання зразків в контролі при $+20^\circ\text{C}$.

Статистичну обробку результатів проводили за загальноновживаними методами.

Результати проведених досліджень по впливу швидкості заморожування, ступеня вологості і кінцевої температури

Таблиця 1

Життєздатність чубуків винограду при швидкостях охолодження $0,01^\circ\text{C}/\text{хв}$ і $0,1^\circ\text{C}/\text{хв}$ до різних кінцевих температур

Сорт	Вологість, %	Проростання чубуків, %			
		температура, $^\circ\text{C}$			
		5	-5	-10	-20
Аліготе	46	100*	100* 100**	100*	41,7* 0**
Ркацителі	46	100*	100* 100**	100*	14,3* 0**
	34,4	50*	-	-	33*
Трам'янер рожевий	51	100*	100* 100**	100*	0**
	31	33*	-	-	0*
Кобер 5ББ	47	100*	100* 100**	100*	0**
	38,4	100*	-	-	20*

Примітка: ** – швидкість заморожування $0,1^\circ\text{C}/\text{хв}$, * – швидкість заморожування $0,01^\circ\text{C}/\text{хв}$.

Таблиця 2

Вплив ступінчастого охолодження чубуків винограду сорту Лідія на їх життєздатність при охолодженні із швидкістю $0,1^\circ\text{C}/\text{год}$ до температури -20°C і швидкістю $1000^\circ\text{C}/\text{хв}$ до температури -196°C

Вологість після сушки, %	Охолодження до температури, $^\circ\text{C}$	Швидкість відігрівання, $^\circ\text{C}/\text{хв}$ ($^\circ\text{C}/\text{год}$)	Вологість після відігрівання, %	Вологість після регідратації, %	Життєздатність, %
33,0	-5	20	-	-	70,0
37,4	-20	20	36,6	-	85,7
38,2	-20 і -196	(0,1)	26,7	28,9÷32,8	0
37,8	-20 і -196	(0,1)	-	-	0
40,9	-20 і -196	20	34,8	43,5	0

Примітка: початкова вологість чубуків складає $\eta_0 = 45,4\%$.

ри охолодження чубуків винограду різних сортів на їх життєздатність представлені в табл. 1.

Визначено, що при швидкості заморожування $0,1^\circ\text{C}/\text{хв}$ до температури -5 і -20°C життєздатність чубуків сортів Аліготе, Ркацителі, Трам'янер рожевий і Кобер 5ББ з вологістю 46, 46, 51 і 47% відповідно, складала від 0 до 100%. У свою чергу, при зниженні швидкості заморожування в 10 разів ($0,01^\circ\text{C}/\text{хв}$) до температур -5 , -10 , -20°C життєздатність чубуків досліджуваних сортів показала наступні результати. У сорту Аліготе при вологості 46% життєздатність складала 100, 100 і 41,7% відповідно. У сорту Ркацителі при вологості 46% – 100, 100, 14,3%, а при вологості 34,4% і охолодженні до температури -20°C життєздатність чубуків складала 33%. Життєздатність чубуків сорту Трам'янер рожевий при вологості 51% складала 100 і 100%, а при вологості чубуків 31% і охолодженні до температури -20°C складала 0%. У сорту Кобер 5ББ при вологості 47% життєздатність чубуків складала 100 і 100%, а при вологості 38,4% і охолодженні до температури -20°C життєздатність складала 20%. Тоді як в контролі життєздатність чубуків сортів Аліготе, Ркацителі, Трам'янер рожевий і Кобер 5ББ з вологістю 46, 46, 51 і 47% складала 100, 100, 100 і 100%, а при вологості чубуків сортів Ркацителі, Трам'янер рожевий і Кобер

5ББ 34,4, 31 і 38,4% – 50, 33 і 100% відповідно.

Таким чином встановлено, що критична температурна зона для вище перелічених сортів винограду знаходиться в інтервалі від -10 до -20°C .

Максимальну життєздатність чубуків винограду сорту Лідія (85,7%) одержано при вологості після сушки 37,4% і охолодженні їх до температури -20°C (табл. 2). Зниження життєздатності до 70%, при охолодженні зразка до температури -5°C пов'язано з його вологістю, яка виявилася нижче мінімально допустимого рівня – 33%.

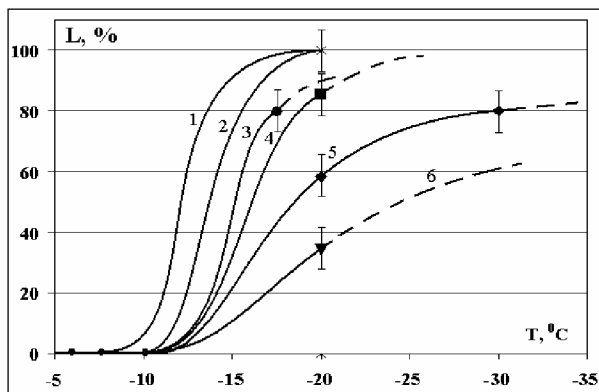


Рис. Втрата життєздатності чубуків винограду L при швидкостях охолодження $0,1$ і $0,01^\circ\text{C}/\text{хв}$ до різних кінцевих температур: 1 – швидкість заморожування $0,1^\circ\text{C}/\text{хв}$ чубуків сортів Аліготе, Ркацителі, Трам'янер рожевий і Кобер 5ББ з вологістю 46, 46, 51 і 47%, відповідно; 2 – швидкість заморожування $0,01^\circ\text{C}/\text{хв}$ чубуків сорту Трам'янер рожевий з вологістю 31%; 3 – швидкість заморожування $0,01^\circ\text{C}/\text{хв}$ чубуків Кобер 5ББ з вологістю 38,4%; 4 – швидкість заморожування $0,01^\circ\text{C}/\text{хв}$ чубуків сорту Ркацителі з вологістю 46%; 5 – швидкість заморожування $0,01^\circ\text{C}/\text{хв}$ чубуків сорту Аліготе з вологістю 46%; 6 – швидкість заморожування $0,01^\circ\text{C}/\text{хв}$ чубуків сорту Ркацителі з вологістю 34,4%.



Вплив температури і тривалості зберігання чубуків винограду на їх життєздатність

Сорт	Режим охолодження, °С	Температура зберігання, °С	Тривалість зберігання, місяць	Вологість після відігрівання, %	Життєздатність зразків, %
Аліготе	-	5	5	45	100
	-	5	12	29÷33	0
	2	-5	1,5	-	100
	2	-10	0,5	-	100
	2	-20	0,5-1	-	0÷42
Ркацителі	-	5	5-7	44÷45	50÷100
	-	5	12	26÷30	0
	2	-5	7-9	34	18÷100
	2	-10	1-7	34-44	30÷100
	2	-15	9	34	10
Трамінер рожевий	-	5	0,5	34÷44	14÷33
	-	5	14	42	0
	-	5	0,5	47	100
	-	5	7	33	30
	-	5	12	29÷33	0
Кобер 5ББ	2	-5	4-7	32÷47	0÷100
	2	-10	0,5	47	100
	2	-20	0,5	31	0
	-	5	0,5	38÷47	100
	-	5	5-14	47	0÷100
Лідія	2	-5	5-8	-	100
	2	-10	0,5-7	40	20÷100
	2	-15	8	-	30
	2	-20	0,5	-	20
	2	-20	5-12	37÷41	0
Лідія	-	5	0,5	37÷42	100
	-	-5	7	40	100
	-	-20	0,5	37	86

Відсутність життєздатних зразків після їх заморожування до рівня рідкого азоту залежить від надлишку внутрішньо-оклітинної води 37,8 ÷ 40,9%, що приводить до утворення кристалів льоду, які ушкоджують клітини. В цілому варіювання вологості для всіх досліджуваних чубуків після їх регідратації складало 29 ÷ 44%.

Для усунення впливу різного початкового стану та засобів оцінювання життєздатності чубуків винограду застосовувався відносний показник Ф (3), за допомогою якого побудовані криві, що відображають критичні температурні зони, відповідні зниженню життєздатності біооб'єкта (рис.).

Одержані криві показують, що критичні температурні зони значно відрізняються одна від одної і залежать від швидкості заморожування, вологості і сорту винограду. Встановлено, що для сортів Аліготе, Ркацителі, Трамінер рожевий і Кобер 5ББ з вологістю чубуків 46, 46, 51 і 47% критична температурна зона знаходиться у діапазоні -6 ÷ -10°C при швидкості заморожування 0,1°C/хв. У свою чергу, при заморожуванні зі швидкістю 0,01°C/хв, для чубуків сорту Аліготе з вологістю 46% критична температурна зона знаходиться у діапазоні -10 ÷ -25°C, для чубуків сорту Ркацителі з вологістю 46 і 34,4% – в діапазонах -12 ÷ -18°C і -15 ч -30°C, для чубуків сорту Трамінер рожевий з вологістю 31% – -10 ÷ -25°C і для чубуків Кобер 5ББ з вологістю 38,4% – -12 ÷ -20°C.

Для вивчення необхідності проведення температурної адаптації різних сортів винограду проведено комплекс досліджень. З метою виведення і часткового зв'язування внутрішньооклітинної води застосовано спосіб ступінчастого охолодження, який спрощує процедуру пошуку оптимального режиму заморожування-відтавання різних типів зразків.

Тривалість зберігання чубуків винограду у продовж 14 місяців (табл. 3) приводить до зниження життєздатності біооб'єкту до 100% за низьких -5°C ÷ -30°C і наднизьких -196°C температур. Рівень збереженості у всіх зразках залишається відносно високим, що указує на відсутність зростання внутрішньооклітинних кристалів у досліджених зразках. Ймовірно, що причиною зниження життєздатності є зменшення відсотка вологості до мінімально рівня – 32%. Також, при температурі зберігання -5°C ÷ -10°C впродовж п'яти місяців, життєздатність біооб'єкту не змінюється при рівні вологості більшої 37%. При нижчих температурах - 20°C життєздатність знижувалася до 0%.

Таким чином, життєздатність деконсервованих чубуків винограду залежить від комплексу зв'язаних чинників, найбільш значимим з яких є швидкість охолодження. Рівень життєздатності змінюється від 0 до 100% при охолодженні зі швидкістю 1°C/год та 0,1°C/год до температури -20°C. Найбільш технологічним виявився ступінчастий спосіб охолодження зразків в термосах від температури -5 до -20°C, з витримкою близько доби на кожній ступені. Кінцеві температури охолодження так само значно впливають на життєздатність, як і вологість зразка до його охолодження. Початкова вологість зразка має своє оптимальне значення, яке визначаєть-

ся, з одного боку, його мінімальним рівнем, який забезпечує можливість процесу регідратації після відтавання і максимальним, який перешкоджає зростанню внутрішньооклітинних кристалів.

Як показано нами раніше, життєздатність живців плодово-ягідних культур після сушки не залежить від швидкості висушування у межах від 0,1 до 0,8% за добу [4]. Максимальна життєздатність чубуків після висушування до мінімально допустимого рівня вологості для винограду сорту Лідія складає 37,3%. Максимальна життєздатність після охолодження - до -20°C і відігрівання до +20°C складає для винограду сорту Аліготе – 42%, Ркацителі – 33%, Кобер 5ББ – 20%, Лідія – 30%.

Слід зазначити, що ступінчасте охолодження дає можливість усунути необхідність попередньої сушки зразків, за допомогою використання низькотемпературної сублимації внутрішньооклітинної води. Вологість зразків після їх відтавання зменшилася на 4 ÷ 18% склавши 24 ÷ 40%. Після регідратації вологість варіювала, для життєздатних зразків від 18 до 52% і не життєздатних 19 ÷ 45%. Варіювання вологості в окремому зразку складало від 1 до 10%, що пов'язано з нерівномірністю розподілу вологи по довжині чубука, а саме між його кінцями і серединою. Такі значні варіювання показників вологості зразків після їх відтавання указують на необхідність вивчення можливості тривалого зберігання чубуків при низьких температурах

і регідратації, як критерію їх життєздатності.

Висновки. 1. Встановлено, що для чубуків винограду сортів Аліготе, Ркацителі, Трамінер рожевий і Кобер 5ББ з вологістю 46, 46, 51 і 47% критична температурна зона знаходиться у діапазоні -6 ÷ -10°C, при швидкості заморожування 0,1°C/хв. При заморожуванні зі швидкістю 0,01°C/хв для сорту Аліготе з вологістю 46% критична температурна зона знаходиться у діапазоні -10 ÷ -25°C, для сорту Ркацителі з вологістю 46 і 34,4% – в діапазонах -12 ÷ -18 і -15 ÷ -30°C, для сорту Трамінер рожевий з вологістю 31% – -10 ÷ -25°C і для Кобер 5ББ з вологістю 38,4% – -12 ÷ -20°C.

2. Визначені умови зберігання чубуків винограду в продовж одного року в температурному діапазоні -10 ÷ -20°C при їх вологості 47 ÷ 51% і швидкості охолодження 0,01°C/хв.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Yunguo Liu, Xiaoyun Wang and Lingxiao Liu, Analysis of genetic variation in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification // Plant Science. – 2004. – V. 166. – P. 677-685.
- 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.
- 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. Горбунов Л.В., Шиянова Т.П., Рябчун В.К. Оптимізація умов дегідратації живців плодово-ягідних культур // Генетичні ресурси рослин. – Харків. – 2008. - № 5. – С. 182-187.

5. Пат. 6417 Україна, МКВ 7 F25 D 3/10. Пристрій для кріоконсервації біологічних об'єктів тваринного та рослинного походжен-

ня: Пат. 6417 Україна, МКВ 7 F25D3/10/ Л.В. Горбунов, В.І. Кабачний, Н.І. Горбунова, М.В. Гринжівський (Україна); Національний фармацевтичний університет. - №20040706332; Заявл. 29.07.2004; Опубл. 16.05.2005; Бюл. №5. – 10 с.

6. Соловьева М.А. Методы определения зимостойкости плодово-ягодных культур. Ме-

тодическое пособие// Ленинград Гидрометеорологическое издат. – 1982. – 35 с.

Поступила 03.03.2009

©Л.В.Горбунов, 2009

©А.С.Саліна, 2009

©Т.П.Шиянова, 2009

©В.О.Волинкін, 2009

©А.А.Полулях, 2009