

УДК 616-001.18:57.043.083:581.165.085:582.573.16

Т.В. Івченко², Т.І. Віценя², Н.О. Шевченко^{1*}, Н.О. Баштан², С.І. Корнієнко²

Гіпотермічне та низькотемпературне зберігання рослин-регенерантів і меристем часнику (*Allium sativum* L.) для створення *in vitro* колекцій

UDC 616-001.18:57.043.083:581.165.085:582.573.16

T.V. Ivchenko², T.I. Vitsenya², N.A. Shevchenko^{1*}, N.O. Bashtan², S.I. Kornienko²

Hypothermic and Low-Temperature Storage of Garlic (*Allium sativum* L.) for *In Vitro* Collections

Реферат: В Україні розроблюють способи створення колекцій генетичних ресурсів рослин. У роботі досліджували вплив різних умов зберігання на показники життєздатності колекційних зразків часнику (*Allium sativum* L.). Культуру проростків сорту «Дюшес» депонували *in vitro* за температури 4°C у темноті на живильному середовищі Murashige-Skoog (MS) із різним мінеральним складом (1/2 MS і MS) та за температури 22°C на середовищі MS із різною концентрацією сахарози (4,5; 6; 9 і 12%) упродовж року. Матеріалом для низькотемпературного зберігання були меристеми сортів «Дюшес» (озимий) та «Мануйлівський» (ярий). Апекси дегідратували розчином, що вітрифікується (1 М сахарози + 2 М гліцерину + 2,5 М етиленгліколю), протягом 120 хв, розміщували у крипробірці та занурювали у рідкий азот. Зразки зберігали за температури –196°C упродовж години та 5 років. Максимальну збереженість проростків протягом року забезпечувало депонування за температури 4°C на середовищі 1/2 MS (94,4%) та 22°C на середовищі з додаванням 12% сахарози (85%). Зберігання меристем часнику за температури –196°C не впливало на їх життєздатність та швидкість розвитку. Життєздатність деконсервованих меристем часнику сортів «Дюшес» та «Мануйлівський» складала близько 60%.

Ключові слова: депонування, низькотемпературне зберігання, часник, меристеми, рослини-регенеранти, вітрифікація, гіпотермічне зберігання.

Реферат: В Украине разрабатывают способы создания коллекций генетических ресурсов растений. В работе исследовали влияние разных условий хранения на показатели жизнеспособности коллекционных образцов чеснока (*Allium sativum* L.). Культуру проростков сорта «Дюшес» депонировали *in vitro* при температуре 4°C в темноте на питательной среде Murashige-Skoog (MS) с разным минеральным составом (1/2 MS и MS) и при температуре 22°C на среде MS с разной концентрацией сахарозы (4,5; 6; 9 и 12%) в течение года. Материалом для низкотемпературного хранения были меристемы сортов «Дюшес» (озимый) и «Мануйловский» (яровой). Апексы дегидратировали витрифицирующим раствором (1 М сахарозы + 2 М глицерина + 2,5 М этиленгликоля) в течение 120 мин, размещали в крипробирки и погружали в жидкий азот. Образцы хранили при температуре –196°C в течение часа и 5 лет. Максимальную сохранность проростков в течение года обеспечивало депонирование при температуре 4°C на среде 1/2 MS (94,4%) и 22°C на среде с добавлением 12% сахарозы (85%). Хранение меристем чеснока при температуре –196°C не влияло на жизнеспособность и скорость развития. Жизнеспособность деконсервированных меристем чеснока сортов «Дюшес» и «Мануйловский» составляла около 60%.

Ключевые слова: депонирование, низкотемпературное хранение, чеснок, меристемы, растения-регенеранты, витрификация, гипотермическое хранение.

Abstract: New methods to establish various types of plant genetic collection are developed in Ukraine in order to preserve the existing species and varieties. This research deals with the effects of short-term hypothermic (4°C) and long-term low temperature (–196°C) storage on viability of the collection samples of garlic (*Allium sativum* L.). In the first case the culture of garlic sprout of Duchess variety was stored *in vitro* at the temperature of 4°C in the Murashige-Skoog (MS) medium with different mineral composition (1/2 MS and MS) in the dark for 3, 6, 9 and 12 months as well as in MS medium with various concentrations of sucrose (4.5, 6, 9 and 12%) at 22°C. The material for long-term low temperature storage of the garlic samples in liquid nitrogen were the meristems of different development type, Duchess (winter) and Manuilivskyy (spring) varieties. The apices were dehydrated in plant vitrification solution (1 M sucrose + 2 M glycerol + 2.5 M ethylene glycol) for 120 min, placed into cryovials and immersed into liquid nitrogen. The samples were stored at the temperature of –196°C for 5 years. The storage at 4°C in 1/2 MS medium provided the maximum preservation of the regenerated plants during a year (94.4%). During culturing at 22°C the highest viability (85%) was observed in the medium, containing 12% sucrose. Long-term storage of garlic meristem at –196°C did not affect the viability and growth rate if compared to the apices, thawed an hour after plunging into liquid nitrogen. The viability of vitrified-warmed garlic meristems of Duchess and Manuilivskyy varieties was about 60%.

Key words: storage, low-temperature storage, garlic, meristems, regenerated plants, vitrification, hypothermic storage.

¹Лабораторія фітокріобіології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини, м. Харків

²Інститут овочівництва і баштанництва УААН, сел. Селекційне, Харківська область

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
електронна пошта: journal@cryo.org.ua

Надійшла 23.01.2017

Прийнята до друку 21.04.2017

¹Laboratory of Phytocryobiology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Institute of Vegetable and Melon Growing of the Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Seleksiine vil., Kharkiv Region, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: journal@cryo.org.ua

Received January, 23, 2017

Accepted April, 21, 2017

Однією з найбільш розповсюджених цибулевих культур є часник (*Allium sativum* L.), який має високі біологічні, смакові та лікувальні властивості. Актуальна задача сучасної агротехніки – подолання проблем підтримання польових колекцій рослин, які розмножуються вегетативним способом, у тому числі й часнику. З цією метою активно розробляються біотехнологічні методи культивування та кріоконсервування рослинного генетичного матеріалу [9]. Колекції пробіркових рослин мають суттєві переваги над польовими, оскільки вони не залежать від кліматичних і погодних умов, не уражуються фітопатогенами та шкідниками, мають високий коефіцієнт розмноження, потребують мінімальних площ для розміщення (декілька квадратних метрів порівнянно з гектарами в полі). До того ж для масового розмноження зразків можливо використовувати будь-який експлантат [13].

Культивування рослин у стерильних умовах досить надійно ізолює зразки від патогенів, включаючи карантинні. У польових колекціях рослинного генетичного матеріалу часто спостерігається виродження зразків через накопичення вірусних, мікотичних та бактеріальних інфекцій. Завдяки компактності та ізолюваності зразків *in vitro* можливо проводити інтродукцію та обмін колекційного матеріалу, оскільки це задовольняє карантинним вимогам [3].

У структурі колекцій *in vitro* виділяють два основних напрями роботи. Перший базується на зберіганні матеріалу без порушень процесів росту (субкультивування), другий – на зберіганні в умовах повільного росту або при повній його зупинці (кріоконсервування) [1]. Розроблення способів підтримання колекційних зразків часнику як в умовах повільного росту, так і зберігання у рідкому азоті необхідне для оздоровлення, розмноження та дублювання найбільш цінних зразків польових колекцій, а також для задоволення запитів щодо міжнародного обміну генетичним рослинним матеріалом.

Згідно з «Методичними рекомендаціями з вивчення та підтримання у живому вигляді світової колекції цибулі та часнику» (Descriptor for *Allium* spp, IPGRI, 2001) зразки серцевинних колекцій (core-collections), у яких максимально представлено генетичне різноманіття видів, повинні зберігатися у польових умовах, умовах повільного росту та низькотемпературної колекції. У великих світових генетичних банках для розмноження культур із вегетативним типом розмноження використовують усі вищезазначені системи зберігання рослин. Кожна система має свої переваги та недоліки, при цьому вони взаємно доповнюють одна одну, а їхнє спільне використання забезпечує надійне довгострокове зберігання генетичного різноманіття рослин [3].

One of the most widespread cultivated bulbous plants is garlic (*Allium sativum* L.), which is valued due to high biological, taste and medicinal qualities. A challenge of modern farming is to overcome the problems of maintaining the field collections of plants reproducing by vegetation, in particular, garlic. For this purpose, the biotechnological methods of cultivation and cryopreservation of plant genetic material are actively developed [10]. The collections of *in vitro* plants are strongly advantageous over the field ones as they do not depend on climate and weather conditions, not affected by pests and pathogens, have a high rate of reproduction, require a minimal space to settle (several square meters vs. a hectare if compared to the field ones). Moreover, the mass reproduction of the specimens could be performed using any explant [13].

Cultivation of plants under sterile conditions is safe in terms of preventing the contamination with pathogens, including the quarantine ones. The field collections of plant genetic material often suffer from the degeneration of samples due to accumulated of viral, micotic and bacterial infections. Compact isolated *in vitro* samples could be easily introduced and exchanged, since they meet all the quarantine requirements [2].

The *in vitro* collections are supported using one of two approaches. The first one is based on storage of the samples without cessation of growth (subculturing), the second one involves the storage under conditions of slowed growth or its complete termination (cryopreservation) [1]. Developing the ways to maintain a collection of the garlic samples both under conditions of slow growth and storage in liquid nitrogen is necessary for recovery, reproduction and backup of the most valuable collections of the field samples and to provide the possibility of international exchange of plant genetic material.

According to the Methodological guidelines for the study and maintaining alive a world collection of onion and garlic (Descriptor for *Allium* spp, IPGRI, 2001) the samples of core-collections, which mostly cover the genetic diversity of species need to be kept simultaneously in the fields, under conditions of slow growth and low-temperature collection. The world's biggest genetic repositories support the cultures with a vegetative propagation using all the mentioned above storage options. Each approach has its positive and negative features, nevertheless these are mutually overlapped, and their combination provides a reliable long-term storage of plant genetic diversity [2].

Storage under normal growth conditions does not differ from the traditional breeding methods of the plants with a certain genotype using *in vitro* collections. In particular, its practical implementation requires a regular transferring of *in vitro* plants to nutritive culture medium, supporting the stable culture conditions (tem-

Зберігання в умовах нормального росту не відрізняється від традиційного способу розмноження рослин певного генотипу в культурі *in vitro*. Тому для практичної його реалізації необхідне регулярне перенесення пробіркових рослин на свіже живильне середовище, забезпечення стабільних умов культивування (температура, освітленість, якісний склад поживних середовищ) [7]. Перевага надається таким способам регенерації, при яких виключається формування калусних тканин, що забезпечує найбільшу генетичну стабільність мікропагонів [4].

Ефективними способами індукції повільного росту є зміна складу регуляторів росту у середовищі або додавання осмотично активних речовин (манітол, сорбітол) з метою створення водного стресу, який гальмує ріст культур [8]. Застосування вказаних прийомів вирішує проблему збереження клонового матеріалу в культурі *in vitro* без впливу на його життєздатність.

В Україні розроблюються способи створення різного типу колекцій генетичних ресурсів рослин [9]. У «активних» банках (*in vitro* active gene, IVAG) зразки часто використовують для селекційних робіт, отже потребують середньострокового зберігання в умовах повільного росту. У низькотемпературних банках (*in vitro* base gene, IVBG) експланти оздоровлених рослин зберігають за температури рідкого азоту [6, 10].

Для зменшення матеріальних витрат на вирощування, запобігання втраті зразків від хвороб та спрощення їхнього обміну необхідні розробка способів тривалого зберігання колекцій за ультранизьких температур та депонування в умовах *in vitro* [3, 6].

У літературі описано загальні підходи до створення IVAG банків [6]. Зазначено, що для більшості культур температура гіпотермічного зберігання складає 4°C, для тропічних видів – 8°C [1]. Наразі не існує публікацій щодо впливу гіпотермічного зберігання на життєздатність рослин-регенерантів часнику, зокрема щодо строків такого зберігання. Невідомо також, чи можливо подовжити терміни депонування зразків за відносно високих температур (22°C) шляхом збільшення концентрації сахарози у середовищі культивування. Такі дослідження можуть доповнити арсенал існуючих технологій депонування рослинного генетичного матеріалу. Раніше ми розробили метод кріоконсервування меристем часнику [2], але не проводили аналіз практичного використання цього методу для створення низькотемпературного банку, який включав би дослідження впливу зберігання на життєздатність рослин та їх розвиток після відігрівання. Такі дослідження можуть показати можливість використання розробленого методу в практиці IVGB банків.

temperature, lighting, growth media composition) [8]. Preference is given to those regeneration ways, which do not result in the formation of callus tissues, providing in such a way the highest genetic stability of microsprouts [4].

Effective way of growth slowing is altering the composition of growth regulators in culture media or supplementing it with the osmotically active substances (e. g. mannitol, sorbitol) to provoke a 'water stress', which inhibits the growth of crops [9]. The use of these approaches allow to preserve the clone samples material *in vitro* without affecting its viability.

Ukrainian scholars consider the development of different types of the plant genetic repositories [10]. The samples stored in the 'active' banks (*in vitro* active gene bank, IVAG) are often used for breeding, i. e. they require a mid-term storage under slow growth conditions. At low temperature banks (*in vitro* base gene bank, IVBG) the explants of the recovered plants are kept at the temperature of liquid nitrogen [6, 11].

To reduce the expenses for growing, preventing the loss of the samples due to diseases and to simplify their exchange there is a need in developing the methods for a long-term storage of the collections at ultralow temperatures and *in vitro* deposits [2, 6].

There are general approaches to establishing the IVAG banks [6], which indicate a hypothermic storage temperature of 4°C for most crops, and 8°C for tropical species [1]. Currently there are no reports on the impact of hypothermic storage on viability of the regenerated plants of garlic, in particular the terms of such a storage. It is also unknown whether it is possible to extend the samples' storage at relatively high temperatures (22°C) by increasing the sucrose concentration in the culture medium. These studies can complement the existing choice of storage technologies for plant genetic material. We previously developed a method to cryopreserve garlic meristems [12] but did not analyze in practice establishing the low temperature bank, which would include a study of the effect of storage on viability of plants and their development after warming. These experiments can demonstrate the possibility of using the proposed method in the IVGB banks.

The research aim was to determine the optimal conditions for short-term storage of the collection samples of regenerated garlic plants during *in vitro* culturing and to assess the impact of long-term storage of garlic meristems at the temperatures of liquid nitrogen.

Materials and methods

The object to study the optimal conditions for a short-term storage of garlic collection samples were regenerated plants of Duchess variety, provided by the National Center for Plant Genetic Resources of Ukraine. Regenerated garlic meristem tissues were obtained



Мета роботи – визначення оптимальних умов короткострокового зберігання колекційних зразків рослин-регенерантів часнику в культурі *in vitro* та впливу довгострокового зберігання меристем часнику за температур рідкого азоту.

Матеріали та методи

Об'єктом для дослідження оптимальних умов короткострокового зберігання колекційних зразків часнику були рослини-регенеранти сорту «Дюшес», які були надані Національним центром генетичних ресурсів рослин України. Регенеранти часнику отримували з меристематичних тканин молодих суцвіть. Стерилізацію матеріалу проводили у ламінарному боксі «БАНп-01 Ламінар-С» (Росія) у такій послідовності: суцвіття занурювали у розчин 70% етилового спирту на 5–10 с, далі обробляли шляхом занурення у 2,6%-й розчин гіпохлориту натрію на 20 хв та промивали 5 разів стерильною дистильованою водою [4]. Стерильний матеріал культивували у скляних пеніцилінових флаконах об'ємом 10 мл («Алхім», Україна) на живильному середовищі Murashige-Skoog (MS) [12] із додаванням 4,5% сахарози за стандартних умов (температура 22...26°C із 16-годинним фотоперіодом та інтенсивністю освітлення 5 клк) протягом 3–4 місяців. Добре укорінені рослини переносили на свіже живильне середовище з різним мінеральним складом: повним (MS) та половинним (1/2MS) і депонували за температури 4°C у темноті або на середовищі MS із різною концентрацією сахарози (6, 9 і 12 масових %) за температури 22°C. У контрольному варіанті рослини депонували на середовищі MS за стандартних умов [4]. У роботі використовували по 100 рослин на кожен варіант дослідження. Спостереження за депонованими рослинами проводили впродовж 3, 6, 9 та 12 місяців. Експеримент повторювали протягом 3 років. У зазначені терміни дослідження візуально визначали кількість заражених патогенною мікрофлорою рослин. Після закінчення терміну депонування (12 місяців) визначали кількість рослин, які відновлювали свій ріст після перенесення на свіже живильне середовище MS та за стандартних умов культивування. Підраховували кількість листків та корінців, визначали їхню довжину, колір. Аналіз зразків проводили відповідно до дескриптора *Allium* spp. Серед зразків, депонованих за температури 22°C, виявляли скловидні (гіпергідратовані) рослини з нетиповими будовою продихів та формою листків, наявністю рідини у міжклітинному просторі тканин та відсутністю регенераційного потенціалу. Такі рослини вважалися нежиттєздатними, оскільки при пересадженні на свіже живильне середовище вони не відновлювали свій розвиток [5].

from young inflorescences. The samples were sterilized in laminar cabinet BAVnp Laminar-01-C (Russia) as follows: the inflorescences were plunged into 70% ethanol solution for 5–10 seconds, then plunged into 2.6% solution of sodium hypochlorite for 20 min and 5 times washed with sterile distilled water [4]. Sterile samples were cultured under standard conditions (22 ...26°C temperature, 16-hr photoperiod and 5 KLK light intensity) for 3–4 months in 10 ml glass vials (Alhim, Ukraine) filled with Murashige-Skoog (MS) medium [7] supplemented with 4.5% sucrose. Well rooted plants were transferred to fresh nutritive medium with a various mineral composition, complete (MS) and half-depleted (1/2 MS) and stored at 4°C in the dark or MS medium with different concentrations of sucrose (6, 9, and 12 wt %) at 22°C. The control plants were cultured in MS medium under standard conditions [4]. The research was performed in 100 plants. The control points for assessing course of plants' storage were 3, 6, 9 and 12 months. The experiment has been repeated thrice each year. The number of plants infected with pathogenic microflora was visually assessed in mentioned control points. After the storage (12 months) we examined number of plants, which restored their growth after transfer to fresh MS nutritive medium in standard culture conditions. The number of leaves and roots was counted, their length and color were examined. The samples were analyzed in accordance with the Descriptor of *Allium* spp. Among the samples stored at 22°C, we controlled the presence of vitreous (hyperhydrated) plants with unusual structure of stomates and shape of leaves; the plants were characterized by decomposed chlorophyll granules, presence of fluid in intercellular space and absent tissue regeneration capacity. These plants were not considered as viable, because following transfer into fresh nutritive medium they did not restore their development [5].

The samples for long-term low-temperature storage of garlic samples under liquid nitrogen conditions were the meristems of two type varieties: Duchess (winter plant) and Manuilivskyy (spring plant), varieties, which were isolated from the bottom of cloves. The meristems were cryopreserved according to our method [12]. The apices of 2–3 mm were dehydrated in vitrifying solution (1 M sucrose + 2 M glycerol + 2.5 M ethylene glycol) for 120 min, placed into 1.8 ml³ cryovials (Corning, Mexico) and plunged into liquid nitrogen. The samples were stored at –196°C for one hour or 5 years. Cryovials with meristems were warmed in a water bath WB-4 (Micromed, Ukraine). Garlic meristems were recultured in MS medium under standard conditions [4]. Viability was determined by the number of apices, which formed leaves and roots to day 90 of cultivation, and expressed as a percentage of total studied meristems. The number of formed leaves and roots of the



Матеріалом для довготривалого низькотемпературного зберігання зразків часнику в умовах рідкого азоту були меристеми різних за типом розвитку сортів: «Дюшес» (озимий) та «Мануйлівський» (ярий), які виділяли з донця зубків. Меристеми кріоконсервували за розробленою нами методикою [2]. Апекси розміром 2–3 мм дегідрували розчином, який вітрифікується (1 М сахарози + 2 М гліцерину + 2,5 М етиленгліколю), протягом 120 хв, розміщували у кріопробірки об'ємом 1,8 мл³ («Corning», Мексика) та занурювали у рідкий азот. Зразки зберігали за температури –196°C впродовж години та 5 років. Кріопробірки з меристемами розморожували у водяній бані «ВБ-4» («Мікромед», Україна). Меристеми часнику рекультивували на живильному середовищі MS за стандартних умов [4]. Життєздатність визначали за кількістю апексів, які утворили листки та корені на 90-ту добу культивування, та виражали у відсотковому співвідношенні до загальної кількості дослідних меристем. Підраховували кількість утворених листків та коренів у регенованих рослин. У кожному варіанті дослідів використовували 30 апексів.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програми «Excel» («Microsoft», США). Для установлення статистичної значущості використовували параметричний критерій Манна-Уїтні. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Одним із сучасних підходів до збереження генофонду є депонування рослин *in vitro* в умовах низьких позитивних температур. Цей спосіб дозволяє призупинити ростові процеси, уповільнити висихання живильного середовища та знизити вірогідність розвитку патогенної мікрофлори [13]. Оскільки термінів депонування пробіркових рослин часнику зі збереженням достатньої для селекційного процесу кількості життєздатних зразків не визначено, то на першому етапі роботи ми провели це дослідження.

На рис. 1 представлені результати впливу гіпотермічного зберігання та мінерального складу живильного середовища на життєздатність пробіркових рослин часнику протягом різних термінів депонування. Показано, що культивування за температури 4°C у темноті протягом 3 місяців не впливало на кількість життєздатних рослин. Після 6-місячної витримки за пониженої температури життєздатність зразків часнику складала 100%, тоді як у контрольному варіанті – 45,5%. Кількість життєздатних регенерантів у контролі значно зменшилася внаслідок їхнього ураження патогенною мікрофлорою.

regenerated plants was counted. Each variant of the experiments involved 30 apices.

The results were statistically analyzed using Excel (Microsoft, USA). For establishing statistical significance we used non-parametric Mann-Whitney criterion. The difference was considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

One of the modern approaches to preserve the gene pool is the *in vitro* storage of plant at low positive temperatures. This method allows to slow the growth, decrease the drying of the culture medium and reduce the probability of pathogenic contamination [13]. Since there are no reports about the possible terms of *in vitro* storage of garlic plants allowing to preserve considerable amount viable samples sufficient for breeding, the first stage of our work was to clear this issue.

After 9 months of storage at 4°C the number of viable samples in 1/2 MS medium reached 96.4%, and in the MS medium with a complete mineral composition the index was 89.3%. The pathogenic contamination affected 3.6 and 10.7% of plants stored in the media 1/2 MS and MS, respectively. After storage at 22°C 31.0% of the samples have remained viable (Fig. 1).

The results of storage for *in vitro* garlic plants for 12 months showed that the temperature of 22°C was not optimal for storage of the collection samples, since only 2.5% of them were viable. Viability of the regenerated plants stored at 4°C for the media 1/2 MS and MS made 94.4 and 88.4%, respectively. Thus, the IVAG bank of garlic collection could be created using the cultivation of plants in nutritive media 1/2 MS and MS at 4°C for 12 months without transfer to fresh nutritive medium. In addition, using this storage temperature during the whole observation period allowed to reduce the number of formed leaves to 2–3 that was considerably lower comparing to the control (9–10 pieces). This is important because fewer leaves allow the thrifty use of culture medium.

The collection samples could be also stored *in vitro* using the medium, supplemented with various substances, including sucrose. A successful method to maintain the collection will certainly consider the conditions of maximum slowing-down the morphogenesis processes without any impairments in normal parameters of culture.

In our research the regenerated plants were stored under standard temperature conditions (22°C) in the MS medium, containing 6, 9, 12% sucrose. The deceleration of growth processes and quite a high rate of viability of the regenerated plants was observed even without transfer to fresh nutritive medium (Table 1). Examining the preservation rate of plant material every 3 months showed that a high concentration of sucrose in storage medium allowed to preserve successfully the viability



Після 9 місяців зберігання за умов 4°C кількість життєздатних зразків на середовищі 1/2 MS дорівнювала 96,4%, а на середовищі MS із повним мінеральним складом – 89,3%. Інфікованими виявилось 3,6 і 10,7% рослин, депонованих на середовищах 1/2 MS та MS відповідно. Після депонування за температури 22°C життєздатними залишилося 31,0% зразків (рис. 1).

Результати депонування пробіркових рослин часнику протягом 12 місяців показали, що температура 22°C не є оптимальною для зберігання колекційних зразків, оскільки лише 2,5% із них були життєздатними. Збереженість рослин-регенерантів, депонованих за 4°C на середовищах 1/2 MS та MS, становила 94,4 і 88,4% відповідно. Отже, для створення IVAG банку колекції часнику можна рекомендувати культивування рослин на живильних середовищах 1/2 MS та MS при 4°C упродовж 12 місяців без перенесення на свіже живильне середовище. Крім того, за цієї температури депонування протягом усього терміну спостереження формувалося 2–3 листки на відміну від контрольного варіанту (9–10 штук). Менша кількість листків сприяє заощадливому використанню живильного середовища.

Депонування колекційних зразків у культурі *in vitro* також може проводитися на живильному середовищі з додаванням різних речовин, у тому числі сахарози. Для розробки способу підтримання колекції необхідно визначити умови максимального уповільнення процесів морфогенезу зі збереженням нормальних параметрів розвитку культури.

У нашій роботі депонування рослин-регенерантів проводили за стандартних температурних умов (22°C) на середовищі MS із вмістом сахарози 6, 9, 12%. Спостерігали уповільнення ростових процесів та досить високий показник життєздатності регенерантів без перенесення на свіже живильне середовище (табл. 1). Визначення показника збереженості рослинного матеріалу кожні 3 місяці показало, що висока концентрація сахарози у середовищі для депонування позитивно впливала на підтримання життєздатності пробіркових рослин. Так, максимальний відсоток життєздатних пробіркових клонів через 12 місяців спостереження був у середовищі з 12% сахарози, мінімальний – у контрольному варіанті (рис. 2).

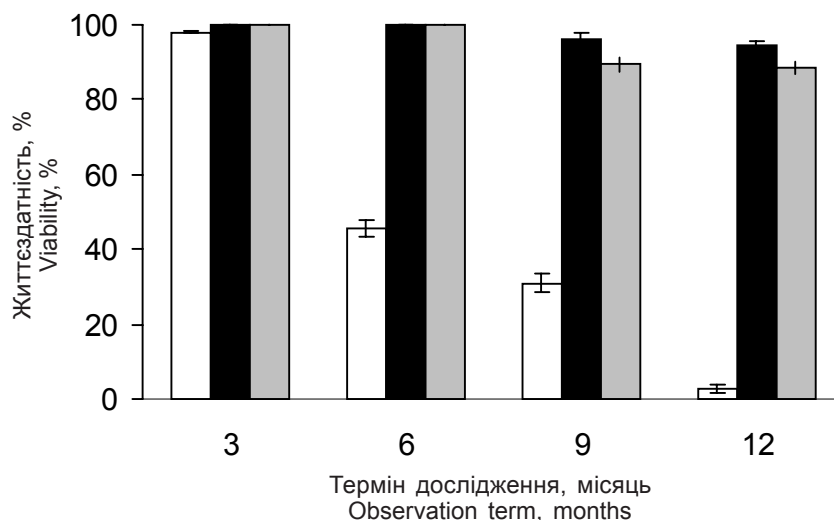


Рис. 1. Показники життєздатності пробіркових рослин часнику у різні терміни депонування: □ – середовище MS, 22°C (контроль); ■ – середовище 1/2 MS (4°C); ▒ – середовище MS (4°C), $p < 0,05$.

Fig. 1. Viabilities of the *in vitro* garlic plants at various storage terms: □ – MS medium, 22°C (control); ■ – 1/2 MS medium (4°C); ▒ – MS medium (4°C), $p < 0.05$.

of the *in vitro* plants. In particular, the maximum percentage of viable *in vitro* clones in 12 months of observation was found in the medium with 12% sucrose, the minimum one was observed in the control (Fig. 2).

The study of the effect of sucrose concentration in nutritive medium on the number of leaves and root development after 12 months of storage showed that the largest number of leaves were formed at if sucrose concentration in the culture medium was 6%, while its further increase resulted in a decreased number of leaves (Table 1). This is likely due to the fact that an increased sucrose content affects the microsprouts of garlic acting as a growth inhibitor. The development of plant roots in all the variants was the same. The maximum number of vitreous plants was observed after culturing in 4.5% sucrose solution. For other options an inverse relationship between sucrose content and percentage of vitreous *in vitro* plants was typical. The absence of these plants in the medium with 12% sucrose concentration indicates its suitability for a long-term storage of garlic collection samples *in vitro*.

Since the sharp decline in viability of studied garlic samples was observed after 6 months of storage under standard culture conditions (Fig. 2), to determine the effect of storage on further development of the regenerated plants we transferred the *in vitro* garlic plants into fresh nutritive medium MS with standard sucrose content (4.5%). Analysis of the regenerated plants after 15 days of culturing showed that the plants which restored their growth faster than others, were those stored at 22°C in MS medium with sucrose concentration of 12% (Table 2). The plants had 3–4 dark green

Дослідження впливу концентрації сахарози у живильному середовищі на кількість листків і розвиток кореневої системи після 12 місяців депонування показало, що найбільша кількість листків формувалася при концентрації сахарози у середовищі культивування 6%, а при її подальшому збільшенні кількість листків зменшувалася (табл. 1). Можливо це пов'язано з тим, що підвищення вмісту сахарози діє на мікропагони часнику як інгібітор росту. Розвиток кореневої системи рослин у всіх варіантах був однаковим. Максимальну кількість гіпергідратованих рослин зафіксовано після культивування у розчині з 4,5% сахарози. Для інших варіантів була характерна обернена залежність між вмістом сахарози у середовищі та відсотком гідратованих пробіркових рослин. Відсутність таких рослин в умовах з 12%-ю концентрацією сахарози у живильному середовищі свідчить про його придатність для тривалого депонування колекційних зразків часнику *in vitro*.

Оскільки різке зниження показника життєздатності дослідних зразків часнику спостерігалось після 6 місяців витримки за стандартних умов культивування (рис. 2), то з метою визначення впливу депонування на подальший розвиток рослин-регенерантів пробіркові рослини часнику пересаджували на свіже живильне середовище MS зі стандартним вмістом сахарози (4,5%). Аналіз регенерантів через 15 днів культивування показав, що швидше відновлювали свій ріст рослини, які депонували за температури 22°C на середовищі MS із концентрацією сахарози 12% (табл. 2). Рослини мали темно-зелений колір, 3–4 листки з довжиною близько 90 мм. У даному варіанті гіпергідратованих рослин виявлено не було.

Регенеранти часнику, які були висаджені після депонування за температури 4°C для подальшого розмноження в культурі на свіже живильне середовище MS, через 15 днів культивування мали світло-зелений колір, 2–3 листки довжиною 50–60 мм. Гіпергідратованих рослин у даному варіанті дослідження не виявлено.

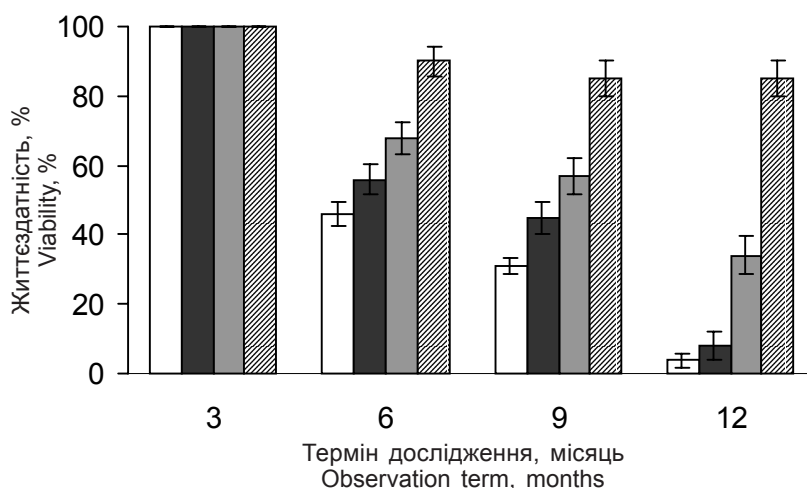


Рис. 2. Вплив концентрації сахарози у середовищі культивування на життєздатність рослин-регенерантів у різні терміни депонування: □ – 3 місяці, ■ – 6 місяців, ▒ – 9 місяців, ▨ – 12 місяців.

Fig. 2. Effect of sucrose concentration in culturing medium on viability of regenerated plants during storage: □ – 3 months, ■ – 6 months, ▒ – 9 months, ▨ – 12 months.

leaves with a length of about 90 mm. In this medium no vitreous plants were found.

Regenerated garlic plants which were transferred after storage at 4°C to fresh nutritive MS medium for further propagation in culture, after 15 days of cultivation were light green, had 2–3 leaves of 50–60 mm length. No vitreous plants in this research option were found.

Thus, the storage of *in vitro* regenerated garlic plants to establish the IVAG-collections is possible at 4°C in nutritive complete media (MS) and half mineral compo-

Таблиця 1. Вплив концентрації сахарози у середовищі MS на параметри росту депонованих упродовж 12 місяців рослин-регенерантів часнику

Table 1. Effect of sucrose concentration in MS medium on growth parameters of stored during 12 months regenerated garlic plants

Концентрація сахарози, % Sucrose concentration, %	Кількість Number		Розвиток коренів, бали Development of roots, points
	гіпергідратованих рослин, % Vitreous plants, %	листочків, шт. Leaves, pieces	
4,5 (контроль) 4,5 (control)	7,7 ± 1,6	9,8 ± 1,5	5
6,0	5,0 ± 1,5	10,6 ± 2,0	5
9,0	3,3 ± 1,2*	8,7 ± 1,1	5
12,0	0*	6,8 ± 1,4*	5

Примітка: * – статистично значуща відмінність порівняно з контролем, $p < 0,05$.

Note: * – statistically significant difference if compared to the control, $p < 0.05$.



Таким чином, депонування пробіркових рослин-регенерантів часнику для створення IVAG-колекції можливе за температури 4°C на живильних середовищах із повним (MS) та половинним мінеральним складом (1/2 MS), а також при 22°C на живильному середовищі MS із додаванням 12% сахарози. Такий підхід дозволяє не тільки одержати високі показники життєздатності дослідних зразків, але й швидко відновити ростові процеси під час рекультивування.

Оскільки для створення повноцінної колекції генетичних ресурсів рослин необхідне не тільки короткострокове зберігання колекційного матеріалу в умовах гіпотермії та сповільненого росту на живильному середовищі з додаванням осмотично активних речовин, але й довгострокове (в умовах наднизьких температур), то наступним способом створення колекцій часнику *in vitro* є кріоконсервування у рідкому азоті.

Відомо, що при зберіганні зразків у рідкому азоті зупиняються поділ клітин і всі метаболічні процеси. Це дозволяє зберігати рослинний матеріал у незмінному вигляді необмежений час, при цьому зразки не займають багато місця, не змінюються генетично та не уражуються фітопатогенами. Для рослин, які мають вегетативне розмноження, найкращим способом збереження генофонду є кріоконсервування меристем, клітини яких завжди однорідні за плоїдністю, невеликі за розміром і майже невакуолізовані. Це дозволяє отримувати досить високий показник життєздатності після глибокого заморожування. Деконсервовані меристеми одразу розвиваються у рослини-регенеранти, які відповідають вихідному генотипу [11].

У табл. 3 наведено показники життєздатності та морфометричні параметри меристем після короткострокового (година) та довгострокового (5 років) зберігання. Показано, що на 90-ту добу культивування морфометричні показники деконсервованих меристем часнику озимого та ярого сортів після коротко- та довгострокового зберігання у рідкому азоті не відрізнялися між собою.

За отриманими даними встановлено, що зберігання меристем протягом 5 років за температури

Таблиця 2. Розвиток рослин-регенерантів часнику після 6-місячного депонування у культурі *in vitro* на етапі рекультивування протягом 15 діб

Table 2. Development of regenerated garlic plants after 6 months of *in vitro* storage after the re-culturing for 15 days

Температура депонування, °C Storage temperature, °C	Концентрація сахарози, % Sucrose concentration, %	Листки Leaves		Гіпергідратовані рослини, % Vitreous plants, %	Колір листків Leaves color
		Кількість, шт. Number, pieces	Довжина, мм Length, mm		
22	4,5 (контроль) 4.5 (control)	1,1 ± 0,31	23,4 ± 3,0	61	Світло-зелений Light green
4	4,5	2,8 ± 0,34	57,4 ± 6,1	0	Світло-зелений Light green
22	6,0	1,3 ± 0,44	32,1 ± 4,1	60	Світло-зелений Light green
22	9,0	2,5 ± 0,31	51,7 ± 1,2	35	Темно-зелений Dark green
22	12,0	3,5 ± 0,44	90,4 ± 2,3	0	Темно-зелений Dark green

ситуації (1/2 MS), а також при 22°C в MS середовищі, доповненому 12% сахарози. Цей підхід дозволяє не тільки отримати високу життєздатність зразків, але й швидко відновити ростові процеси під час рекультивування.

Створення високоцінної колекції рослинних генетичних ресурсів вимагає не тільки короткострокового зберігання зразків у гіпотермії та сповільненого росту на живильному середовищі з додаванням осмотично активних речовин, але й довгострокового (в умовах наднизьких температур), то наступним способом створення колекцій часнику *in vitro* є кріоконсервування у рідкому азоті.

Відомо, що при зберіганні зразків у рідкому азоті зупиняються поділ клітин і всі метаболічні процеси. Це дозволяє зберігати рослинний матеріал у незмінному вигляді необмежений час, при цьому зразки не займають багато місця, не змінюються генетично та не уражуються фітопатогенами. Для рослин, які мають вегетативне розмноження, найкращим способом збереження генофонду є кріоконсервування меристем, клітини яких завжди однорідні за плоїдністю, невеликі за розміром і майже невакуолізовані. Це дозволяє отримувати досить високий показник життєздатності після глибокого заморожування. Деконсервовані меристеми одразу розвиваються у рослини-регенеранти, які відповідають вихідному генотипу [11].

У табл. 3 наведено показники життєздатності та морфометричні параметри меристем після короткострокового (година) та довгострокового (5 років) зберігання. Показано, що на 90-ту добу культивування морфометричні показники деконсервованих меристем часнику озимого та ярого сортів після коротко- та довгострокового зберігання у рідкому азоті не відрізнялися між собою.

–196°C не впливало на показник життєздатності, швидкість росту та розвиток порівняно з апексами, які розморожували через годину після занурення у рідкий азот.

Аналізуючи результати депонування регенерантів часнику в різних умовах (використання осмотично активних сполук за стандартних температур і зберігання за умов гіпотермії), можна зробити висновок, що досліджені способи забезпечують необхідні умови для середньострокового зберігання колекційних зразків. Кращий показник життєздатності було отримано після депонування регенерантів упродовж 12 місяців на середовищі 1/2 MS (94,4%), але після рекультивування вони поступалися за силою росту рослинам, які були депоновані на середовищі MS із вмістом сахарози 12%. Показник життєздатності цих рослин складав 84,9%. У наших дослідженнях середньострокове зберігання регенерантів за температури 4°C відбувалося у темноті. За таких умов зразки наприкінці депонування мали блідо-зелений колір та невелику довжину листків, тобто потребували деякого часу для відновлення регенеративних властивостей і накопичення хлорофілу. Однак для створення IVAG банку можна застосовувати обидва способи депонування, оскільки вони забезпечують збереженість достатньої кількості зразків. Для створення IVBG банку можна застосовувати низькотемпературне зберігання колекційних зразків часнику, кріоконсервованих за розробленою нами програмою, в умовах рідкого азоту. Показано, що метод вітрифікації при застосуванні розробленого нами кріозахисного розчину дозволяє отримати високі показники життєздатності та морфометричні параметри розвитку деконсервованих рослин, які зберігалися у низькотемпературному банку впродовж 5 років.

Таблиця 3. Вплив зберігання у рідкому азоті на розвиток деконсервованих меристем часнику, оцінений через 90 діб культивування

Table 3. Effect of storage in liquid nitrogen on development of vitrified-warmed garlic meristems assessed after 90 days of culturing

Експериментальна група Experimental groups	Життєздатність, % Viability, %	Довжина пагону, мм Sprout length	Довжина кореня, мм Root length, mm	Кількість листків, шт Number of leaves, pieces
Озимий сорт «Дюшес» Duchess winter variety				
Незаморожені меристеми Non-frozen meristems	94,1 ± 6,6	135,3 ± 15,4	66,6 ± 10,5	3,7 ± 0,3
Деконсервовані меристеми після години зберігання у рідкому азоті Vitrified-warmed meristems after one hour storage in liquid nitrogen	64,3 ± 4,8	80,7 ± 12,3	45,0 ± 4,4	3,6 ± 0,4
Деконсервовані меристеми після 5-річного зберігання у рідкому азоті Vitrified-warmed meristems after 5 years of storage in liquid nitrogen	59,3 ± 4,3*	75,3 ± 6,1*	42,2 ± 2,8*	3,5 ± 0,5*
Ярий сорт «Мануйлівський» Manuilivskyy spring variety				
Незаморожені меристеми	94,1 ± 6,6	129,0 ± 10,9	25,0 ± 4,9	4,6 ± 0,5
Деконсервовані меристеми після години зберігання у рідкому азоті Vitrified-warmed meristems after one hour storage in liquid nitrogen	56,3 ± 11,2	49,2 ± 5,3	21,2 ± 4,3	3,0 ± 0,6
Деконсервовані меристеми після 5-річного зберігання у рідкому азоті Vitrified-warmed meristems after 5 years of storage in liquid nitrogen	61,5 ± 5,5*	47,1 ± 2,7*	23,1 ± 2,1*	3,5 ± 0,3*

Примітка: * – відсутність значущої різниці відносно меристемам, які деконсервували після години зберігання у рідкому азоті, $p < 0,05$.

Note: * – no statistically significant difference vs. the meristems vitrified-warmed after one hour of storage in liquid nitrogen, $p < 0.05$.

The findings demonstrated that the storage of meristems for 5 years at –196°C did not affect the viability, the rate of growth and development if compared to the apices, which were thawed one hour later an immersion into liquid nitrogen.

Analysis of the outcome of the storage of the regenerated garlic under various conditions (use of osmotically active compounds at standard temperature and hypothermic storage) allowed to conclude that both investigated methods provided the essential conditions



Висновки

Обґрунтовано можливість включення процесу депонування в культурі *in vitro* рослин-регенерантів часнику у систему середньострокового зберігання генетичних колекцій часнику. Встановлено, що максимальну збереженість життєздатних клонів пробіркових рослин забезпечує культивування при температурі 4°C на середовищі 1/2 MS (94,4%) та 22°C на середовищі MS із додаванням 12% сахарози (85%). Застосовані способи дозволяють уповільнювати ростові процеси у депонованому матеріалі та зберігати рослини протягом 12 місяців без пересаджень. Довгострокове зберігання меристем часнику за температури –196°C не впливало на показник життєздатності, швидкість росту і розвиток порівняно з апексами, які розморожували через годину після занурення у рідкий азот.

Література

1. Белокурова В.Б. Методи біотехнології в системі заходів збереження біорізноманіття рослин // Цитология и генетика. – 2010. – Т. 44, №3. – С. 58–72.
2. Віценя Т.І., Івченко Т.В., Шевченко Н.О., Стрибуль Т.Ф. Вплив розміру експлантів та фітогормонального складу живильного середовища на відновлення меристем часнику після кріоконсервування методом вітрифікації // Проблеми криобіології та криомедицини. – 2015. – Т. 25, №1. – С. 3–12.
3. Гавриленко Т. И., Дунаева С.Е., Трускинов Э.В. и др. Стратегия долгосрочного сохранения генофонда вегетативно размножаемых сельскохозяйственных растений в контролируемых условиях среды // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2007. – Т. 164. – С. 273–285.
4. Івченко Т.В., Віценя Т.І., Шабета О.М. Клонування рослин *Alliasea L.*, які розмножуються вегетативним способом в культурі *in vitro* // Овочівництво і баштанництво. – 2007. – Вип. 53. – С. 103–109.
5. Матушкина О.В., Тронина И.Н., Ткачев Е.Н. Витрификация побегов *in vitro*: анатомическое строение и возможные пути решения проблемы // Достижения науки и техники АПК. – 2012. – №9. – С. 58–60.
6. Молканова О.И., Коротков О.И., Ветчинкина Е.М. и др. Генетические банки растений: проблемы формирования, сохранения и использования // Вестник Удмурт. ун-та. Биология. Наука о земле. – 2010. – Вып. 3. – С. 77–79.
7. Новикова Т.И., Набиева А.Ю., Полубоярова Т.В. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального сибирского ботанического сада // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2008. – Т. 12, №4. – С. 564–571.
8. Подвигина О.А., Знаменская В.В., Цупикова Л.А. Депонирование селекционного материала на искусственных питательных средах // Сахар. свекла. – 2000. – №12. – С. 18–19.
9. Рябчун В.К., Богуславський Р.К. Проблеми та перспективи збереження генофонду рослин в Україні. – Харків, 2002. – 38 с.
10. Трускинов Э.В. Коллекции *in vitro* на современном этапе итродукции, использования и хранения мирового генофонда вегетативно размножаемых культур сельскохозяйственных растений // Труды II Вавил. Междунар. конф. «Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке». – СПб., 2007. – С. 207–209.

for the mid-term storage of the collection samples. The best viability has been obtained after the storage of the regenerated plants for 12 months in the medium 1/2 MS (94.4%). However after re-culturing these samples had lower development rate if compared with those, stored in the MS medium, supplemented with 12% sucrose. The latter had the viability after storage only 84.9%. In our studies the mid-term storage of the regenerated plants at 4°C was performed in darkness. Under these conditions, the samples had pale green short leaves to the end of storage, therefore they needed some time to restore regenerative properties and to accumulate chlorophyll. Nevertheless, the IVAG banking could utilize both types of storage, as they provide the preservation of a sufficient number of the samples. The developed by us cryopreservation technique could be successfully used for low-temperature storage of the collection garlic samples and in such a way to create the IVBG bank. It has been demonstrated that vitrification with the developed by us cryoprotective solution provided high viability and sufficient morphometric parameters of the development of the vitrified-warmed plants, stored at low-temperature bank for 5 years.

Conclusions

Collectively, we have validated the inclusion of storage of *in vitro* regenerated garlic plants into the system of mid-term genetic collections of garlic. It has been established that the maximum preservation of viable *in vitro* plant clones provided the culturing at 4°C in 1/2 MS medium (94.4%) and at 22°C in MS medium supplemented with 12% sucrose (85%). The applied methods enabled the deceleration of growth processes in the stored samples and maintaining the plants for 12 months without re-planting. Long-term storage of garlic meristems at –196°C did not affect the viability, the rate of growth and development compared to the apices, which were warmed one hour later the immersion into liquid nitrogen.

References

1. Belokurova V.B. Methods of biotechnology in the system of efforts for plant biodiversity preservation. *Tsitol Genet* 2010; 44(3): 58–72.
2. Gavrilenko T.A., Dunaeva S.E., Truskinov E.V. et. al. A strategy of long-term conservation of vegetatively propagated crops under controlled conditions. *Proceedings of Applied Botany, Genetics and Breeding* 2007; 164: 273–285.
3. Engelmann F. Importance of cryopreservation for conservation of plant genetic resources. In: *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. Eds. Engelmann F. & Takagi H., JIRCAS. – Rome: Tsukuba & IPGRI, 2000: 8–20.
4. Ivchenko T.V., Vitsenia T.I., Shabetia O.M. Cloning of vegetatively reproducing *Alliaceae L.* plants in culture *in vitro*. *Ovochivnytstvo i Bashtannytstvo* 2007; (53): 103–109.



- 11.Engelmann F. Importance of cryopreservation for conservation of plant genetic resources. In: Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Eds. Engelmann F.& Takagi H., JIRCAS. – Rome: Tsukuba & IPGRI, 2000. – P. 8–20.
- 12.Murashige T., Scoog F. A revised medium for repid grown and bioassay with tobacco tissue culture // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – Vol. 64. – P. 197–203.
- 13.Watt M.P., Thokoane N.L., Mycock D, Blakeway F. In vitro storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2000. – Vol. 61. – P. 161–164.
5. Matushkina O.V., Pronina I.N., Tkachyov E.N. Shoot vitrification *in vitro*: anatomic structure and possible ways of the problem solution. *Achievements of Science and Technology of AIC 2012*; (9): 58–60
6. Molkanova O.I., Korotkov O.I., Vetchinkina E.M. et.al. Genetic banks of plants: problems of formation, preservation and use. *Bulletin of Udmurt University. Biology. Earth Science 2010*; (3): 77–79.
7. Murashige T., Scoog F. A revised medium for repid grown and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant 1962*; (64): 197–203.
8. Novikova T.I., Nabieva A.Yu., Poluboyarova T.V. Rare and useful plants' conservation in the in vitro collection of central siberian botanical garden. *Russian Journal of Genetics: App Res 2008*; 12 (4): 564–571.
9. Podvigina O.A., Znamenskaya V.V., Tsupikova L.A. Depositing of breeding material on artificial nutrient media. *Sugar Beet 2000*; (12): 18–19.
10. Ryabchun V.K., Bohuslavs'kyi R.K. The problems and perspectives of preserving the gene pool of plants in Ukraine. *Kharkiv; 2002*. – P. 38.
11. Truskinov E.V. *In vitro* collections at current stage of introduction, use and storage of world gene pool of vegetatively propagating agricultural crops: Proceedings of the 2nd International Vavilov's Conference 'Genetic resources of cultivated plants in the XXI Century'. St. Petersburg 2007; p. 207–209.
12. Vitsenia T.I., Ivchenko T.V., Shevchenko N.O., Stribul T.F. Effect of explant's size and phytohormonal composition of nutritive medium on post-vitrification recovery of garlic meristems. *Probl Cryobiol Cryomed 2015*; 25(1): 3–12.
13. Watt M.P., Thokoane N.L., Mycock D, Blakeway F. In vitro storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions. *Plant Cell Tissue Organ Cult. 2000*; (61): 161–164.

