

ческих соединений, способных оказывать криозащитное действие. Цель работы – изучение особенностей реакции динамической структуры мембраны эритроцитов на модификацию мембранных белков специфическими реагентами: йодацетамидом и N-этилмалеимидом.

В опытах была использована донорская кровь группы II. Для исследования влияния модификации сульфгидрильных групп мембранных белков йодацетамидом и N-этилмалеимидом на термотропные перестройки мембранных компонентов был применен метод ЭПР спиновых зондов. В качестве зонда использовали спин-меченый аналог пальмитиновой кислоты (АПК), имеющий нитроксильный фрагмент (стабильный радикал) в области полярной головки жирной кислоты. На спектрометре “Bruker” (Германия) со стандартной термоприставкой регистрировали спектры ЭПР, анализировали частоту и анизотропию вращения нитроксильных радикалов.

Были изучены температурозависимые перестройки структуры мембраны эритроцитов в диапазоне температур 37-5°C. Установлено, что модификация сульфгидрильных групп белков приводит к изменению профиля температурной зависимости параметра подвижности нитроксила в области 30°C и наиболее заметна при температурах ниже 17°C. При этих температурах ранее были зарегистрированы переходы на водно-белковой поверхности мембраны эритроцитов, в том числе с использованием ковалентной метки на 8Н-группы белков. Таким образом, получено хорошее совпадение термоиндуцированных изменений динамической структуры водно-липидной поверхности модифицированных мембран эритроцитов и водно-белковой поверхности при использовании ковалентных меток. Анализ анизотропии вращения зонда показывает, что модификация сульфгидрильных групп белков приводит к существенному изменению параметра вращения, рассчитанного по паре компонент спектра, наиболее зависящей от ориентации оси вращения нитроксильного фрагмента АПК. Модификация поверхностных групп белков мембран эритроцитов вызывает, по-видимому, изменение анизотропии вращения жирно-кислотного спинового зонда.

Полученные результаты позволяют заключить, что окисление SH-групп мембранно-связанных белков сульфгидрильными реагентами приводит к изменению водно-липидных взаимодействий, прежде всего, на внутренней поверхности мембраны.

erythrocyte membrane on modification of membrane proteins by specific reagents: iodoacetamide and N-ethylmaleimide.

In experiments we used A (II) donor blood. In order to investigate the modification effect of sulfhydryl groups of membrane proteins by iodoacetamide and N-ethylmaleimide on thermotropic rearrangements of membrane components we applied EPR method of spin probes. As a probe we used spin-labelled analogue of palmitic acid (APA), having nitroxyl fragment (stable radical) in polar head area of fatty acid. EPR spectra were recorded using the Bruker spectrometer (Germany) with standard thermodevice, frequency and anisotropy of nitroxyl radical rotation were analysed as well.

Temperature-dependent rearrangements of erythrocyte membrane structure within 37-5°C temperature range were studied. Modification of protein sulfhydryl groups was established to result in a change of temperature dependency profile of mobility parameter for nitroxyl in 30°C area and it was more visible under temperatures under 17°C. Under these temperatures the transitions on water-protein erythrocyte membrane surface were registered previously, including using covalent label on protein SH-groups. Thus, there was obtained a good coincidence of thermoinduced changes in dynamic structure of water-lipid surface of modified membranes of erythrocytes and water-protein surface when using covalent labels. Anisotropy analysis of probe rotation demonstrates, that modification of sulfhydryl groups of proteins results in a considerable change of rotation parameter, calculated by couple of spectrum components, most dependent on orientation of rotation axis of APA nitroxyl fragment. It appears that modification of protein surface groups of erythrocyte membranes causes a change in rotation anisotropy of fatty acid spin probe.

The results obtained enable concluding that oxidation of SH-groups of membrane-bound proteins by sulfhydryl reagents results in a change in water-lipid interactions

## Оптимізація методу повільного заморожування меристем картоплі

Н.О. ШЕВЧЕНКО, Т.Ф. СТИБУЛЬ

*Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків*

## Optimization of Method for Potato Meristem Slow Freezing

N.O. SHEVCHENKO, T.F. STRIBUL

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov*

Методи криозбереження цінних клонів рослин із вегетативним розмноженням включають технологічні прийоми одержання рослинного матеріалу, його охолодження, криозбереження у контейнерах за темпе-

Cryopreservation methods of rare plant clones with vegetative propagation comprise the techniques of procurement, cooling, cryopreservation in containers with temperature of liquid nitrogen, thawing and growth renewal

ратурою рідкого азоту, відтавання і відновлення росту на поживних середовищах. Відомі методи кріоконсервування меристем картоплі різних сортів під захистом 10%-го ДМСО і швидкості заморожування  $0,3 \pm 0,5^\circ\text{C}/\text{хв}$  до температури  $-35 \pm -40^\circ\text{C}$  із подальшим зануренням у рідкий азот. Результати життєздатності (при застосуванні одного й того ж протоколу кріоконсервування) варіюються від 0 до 80%. Дані про загартовування проростків картоплі в умовах низьких температур перед заморожуванням меристем із повільними швидкостями заморожування, а також про використання кріопротекторів ряду пропандіолів відсутні.

Мета дослідження – оцінити можливість загартовування холодом та застосування 1,2-пропандіолу (1,2-ПД) при кріоконсервуванні меристем картоплі на моделі сорту “Косинь”.

Об’єкт кріоконсервування – меристеми картоплі *Solanum tuberosum* сорту “Косинь”, які отримували з рослин, що культивувалися в умовах *in vitro*. Рослини, які не загартовували, витримували за нормальних умов освітлення (3 тис. люкс), фотоперіоді (16 годин день / 8 годин ніч) та температурі ( $24 \pm 26^\circ\text{C}$ ). Частину рослин (в пробірках) витримували по 16 годин на добу без освітлення за температури  $8 \pm 10^\circ\text{C}$ , та 8 годин – за нормальних умов освітлення та температури протягом 14 днів. Перед експериментом меристеми виділяли і витримували на поживному середовищі 48 годин, потім – 1 годину у 1 М розчинах ДМСО або 1,2-ПД за температурою  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Після цього меристеми на смугах фільтрувального паперу, змочених розчином кріопротектора, вміщували у поліетиленові контейнери об’ємом  $1 \text{ cm}^3$  для заморожування. Швидкість охолодження на першому етапі ( $0 \pm -15^\circ\text{C}$ ) становила  $0,3^\circ\text{C}/\text{хв}$ , на другому ( $-15 \pm -40^\circ\text{C}$ ) –  $1,5 \pm 2,5^\circ\text{C}/\text{хв}$ . Ініціація кристалізації відбувалася при  $-7^\circ\text{C}$ . Потім контейнери з меристемами занурювали безпосередньо в рідкий азот. Відтавання проводили через занурення контейнерів з меристемами у водяну баню  $40^\circ\text{C}$ . Цілість кріоконсервованих меристем оцінювали на 5-ту добу культивування, враховуючи зелений колір та позитивну динаміку їх росту (таблиця).

Встановлено, що заморожування загартованих апексів картоплі під захистом ДМСО призводить до підвищення їх цілості порівняно з аналогічним показником у незагартованих. Загартовування меристем картоплі при застосуванні 1,2-пропандіолу недоцільне. Спостереження протягом 30-ти діб за розвитком кріоконсервованих меристем показало, що обробка кріопротекторами і заморожування викликають уповільнення розвитку апексів порівняно з контролем. Менш токсичним виявився пропандіол. Обробка ДМСО може викликати розвиток калусу.

in nutrient solution of plant material. Cryopreservation methods for potato meristems of different species under 10% DMSO protection and freezing rate of  $0.3 \pm 0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  down to  $-35 \pm -40^\circ\text{C}/\text{min}$  with following immersion into liquid nitrogen are known. Viability results for different potato species (when applying one protocol of cryopreservation) vary from 0 to 80%. Data about acclimation under low temperature conditions for potato sprouts before meristem freezing with slow freezing rates, as well as about applying cryoprotectant of propanediol series are absent.

Research was aimed to evaluate the possibility for cold acclimation and propanediol application (1,2-PD) when cryopreserving “Kosyn” potato meristems.

Cryopreservation object was *Solanum tuberosum* potato meristems of “Kosyn” species, obtained from *in vitro* cultured plants. Some plants in vials were exposed for 16 hrs per day without light at  $8 \pm 10^\circ\text{C}$  and 8 hrs at normal light conditions and temperature for 14 days. Non-acclimated plants were exposed under normal light conditions (3000 lux), photoperiod (16 hrs day/8 hrs night) and  $24-26^\circ\text{C}$  temperature. Before experiment meristems were isolated and exposed in nutrient medium for 48 hrs, then for 1 hr in 1M DMSO or 1,2-PD solutions at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Afterwards meristems on filter paper slips, moistened with cryoprotectant solution were placed into the  $1 \text{ cm}^3$  polyethylene containers for freezing. Cooling rate at the first stage ( $0 \pm 15^\circ\text{C}$ ) was  $0.3^\circ\text{C}/\text{min}$  and  $1.5 \pm 2.5^\circ\text{C}/\text{min}$  for the second one ( $-15 \pm -40^\circ\text{C}$ ). Initiation of crystallisation occurred at  $-7^\circ\text{C}$ . Containers with meristems were then directly immersed into liquid nitrogen. Thawing was carried-out by immersing containers with meristems in  $40^\circ\text{C}$  water bath. Integrity of cryopreserved meristems was estimated to the 5<sup>th</sup> day of culturing taking into account green colour and positive dynamics in their growth (Table).

Freezing of acclimated potato meristems under DMSO protection was established to result in augmentation of their integrity in comparison with the same index in non-acclimated ones. Potato meristem acclimation when applying propanediol is not expedient. Observation during 30 days for development of cryopreserved meristems demonstrated that treatment with cryoprotectant and freezing caused a slowing down in their development in comparison with the control. Propanediol occurred to be less toxic. DMSO treatment can cause callus development.

Цілість меристем картоплі сорту “Косинь” після повільного заморожування і при різних варіантах підготовки (дані у відсотках живих меристем після розморожування на 5-ту добу культивування)

Potato meristems integrity of “Kosyn” species after slow freezing (percentage of living meristems to the 5<sup>th</sup> day of culturing after freeze-thawing)

Кріопротектор Cryoprotectant	Контрольні меристеми Control meristems		Заморожені меристеми Frozen-thawed meristems	
	незагартовані acclimated	загартовані non-acclimated	незагартовані acclimated	загартовані non-acclimated
Без обробки Without treatment	100	100	0	0
1 М ДМСО 1 M DMSO	$95 \pm 6$	$95 \pm 5$	$50 \pm 4^*$	$72 \pm 7^*$
1М 1,2-ПД 1 M 1,2-PD	$91 \pm 3$	$88 \pm 4$	$70 \pm 9^*$	$60 \pm 6^*$