

УДК 635.076:57.043

Л.В. ГОРБУНОВ¹, Т.П. ШИЯНОВА²

Криоконсервирование черенков плодово-ягодных культур

UDC 635.076:57.043

L.V. GORBUNOV¹, T.P. SHIYANOVA²

Cryopreservation of Fruit-Berry Culture Cuttings

Установлено, что на жизнеспособность деконсервированных черенков оказывают значительное влияние температура, длительность хранения, влажность, скорости охлаждения и отогрева. Определены допустимые значения влажности, параметры, обеспечивающие максимальную жизнеспособность черенков березы, черной смородины, малины, вишни, соответствующие 32–40; 40–50; 37–40; 33–45% в положительном диапазоне температур и 14–28, 30–40, 23, 37% – в отрицательном. Снижение влажности приводит к эффекту плазмолиза, а превышение – внутриклеточному кристаллообразованию. При использовании различных режимов сушки и охлаждения со скоростью 0,1°C/ч до –20°C с последующим погружением в жидкий азот возможна реализация жизнеспособности деконсервированных черенков смородины и березы 100%, малины – 88%, вишни – 57%.

Ключевые слова: черенки плодово-ягодных культур, криоконсервирование, жизнеспособность, длительность хранения, влажность, скорости охлаждения и отогрева.

Встановлено, що на життєздатність деконсервованих живців впливають температура, тривалість зберігання, вологість, швидкість охолодження і відігрівання. Визначені припустимі значення вологості, параметри, що забезпечують максимальну життєздатність живців берези, чорної смородини, малини, вишні, що відповідають 32–40; 40–50; 37–40; 33–45% у позитивному діапазоні температур і 14–28, 30–40, 23, 37% – у негативному. Зниження вологості призводить до ефекту плазмолізу, а перевищення – до внутрішньоклітинного кристаллоутворення. При використанні різних режимів сушіння й охолодження зі швидкістю 0,1°C/год до –20°C і з наступним зануренням у рідкий азот можлива життєздатність деконсервованих живців смородини і берези 100%, малини – 88%, вишні – 57%.

Ключові слова: живці плодово-ягідних культур, криоконсервування, життєздатність, тривалість зберігання, вологість, швидкості охолодження і відігрівання.

It has been established that temperature, storage period, humidity, rates of cooling and thawing significantly affect viability of frozen-thawed cuttings. The found permissible values of humidity, parameters, providing maximal viability of birch, black currant berry, raspberry, cherry cuttings are 32–40; 40–50; 37–40; 33–45% within the positive range of temperatures and 14–28, 30–40, 23, 37% within the negative range. Decrease of humidity results in plasmolysis, and exceeding does in intracellular crystal-formation. During application of different regimens of drying and cooling with the rate of 0.1°C/hr down to –20°C with further plunging into liquid nitrogen the viability of frozen-thawed cuttings of currant berry and birch made 100%, 88% for raspberry and 57% for cherry.

Key words: cuttings of fruit-berry cultures, cryopreservation, viability, storage period, humidity, rate of cooling and warming.

При постоянном сокращении мировых растительных ресурсов сохранение генофонда культурных и дикорастущих видов растений является актуальной проблемой. Особенно важен вопрос сохранения генплазмы плодовых культур в побегах, почках, семенах, пыльце, меристемах и культуре *in vitro* [1, 2, 6, 8–10]. В практике садоводства в основном используют вегетативные способы размножения, поскольку при размножении семенами в потомстве изменяется генотип исходного сорта-типа растения [1].

Наилучший способ сохранения генофонда вегетативно размножающихся растений – криоконсервирование верхушечных меристем побегов. Дан-

Gene fund preservation of cultural and wild-growing plant species at a steady reduction of world plant resources is an actual problem.

The question of preservation of gene plasma of fruit cultures in shoots, buds, seeds, pollen, meristems and *in vitro* culture [1, 2, 6, 8–10] is especially important. In practical gardening the vegetative reproduction methods are generally used, whereas during seed reproduction a genotype of plant initial variety changes in progeny [1].

The best method of gene fund preservation of clonal plants is cryopreservation of apical meristems of cuttings. This method has many advantages, but it is associated with development of special laboratory

¹Институт животноводства УААН, г. Харьков

²Институт растениеводства УААН, г. Харьков

¹Institute of Animal Breeding of Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Kharkov, Ukraine

²Institute of Plant Production of Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Kharkov, Ukraine

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: п/в Кулинич, Харьковский район, Харьковская область, Украина, 62404; тел.: (+38057) 740-31-66, электронная почта: lab_cryo@ukr.net

* To whom correspondence should be addressed: PO Kulinichi, Kharkov region, Ukraine 61480; tel.: +380 57 740 3166; e-mail: lab_cryo@ukr.net

ный способ имеет много преимуществ, но связан с созданием необходимой специальной лабораторной базы, значительными затратами рабочего времени квалифицированных специалистов, сложностью выполнения процедуры регенерации меристем, однако по существующим финансовым и материальным условиям деятельности Национального генбанка Украины обеспечить сохранность существующих образцов невозможно.

В 1959 г. И.И.Туманов и соавт. установили, что ветви хорошо закаленных древесных и кустарниковых морозостойких растений могут быть успешно заморожены до температуры жидкого азота [6]. В дальнейшем этот факт подтвердил А. Sakai [8]. После оттаивания черенки березы, черной смородины, вишни, яблони возобновляли рост, раскрывали листья, укоренялись.

Для обеспечения жизнеспособности деконсервированных образцов на уровне 20–30% их высушивали со скоростью 1°C/ч до 28–30 % влажности с последующим охлаждением черенков винограда и яблони от –5 до –30°C [7, 8, 10]; смородины и крыжовника от –5 до –90°C [2]. Затем их помещали в пары жидкого азота. Вместе с тем в работе [3] показано, что снижение влажности используемых образцов до 30% приводит к значительному снижению уровня их жизнеспособности.

Вероятно, для образцов каждого вида культурных растений следует подбирать определенный диапазон влажности, режим замораживания с оптимальной скоростью, конечную температуру охлаждения и время выдержки перед погружением в жидкий азот, способ отогрева.

Цель работы – определение области допустимых значений, обеспечивающих максимальную жизнеспособность деконсервированных черенков плодово-ягодных культур.

Материалы и методы

Объектом исследования были черенки черной смородины “Дачница” (*Ribes nigrum* L.); вишни “Степная” (*Prunus cerasus* L.); малины “Новость Кузмина” (*Rubus idaeus* L.); яблони “Белый налив” (*Malus domestica* L.); сливы “Ренклюд”, “Угорка” (*Prunus domestica* L.); винограда “Лидия” (*Vitis labrusca* L.). Для контроля выбранных способов криоконсервирования использовали черенки березы (*Betula pubescens*) из-за их высокой криорезистентности [3, 5, 6].

Черенки нарезали из однолетних побегов и делили на отдельные образцы по 10 ± 2 шт. длиной 5–12 см, диаметром 0,5–1,2 см. Черенки имели от 2 до 5 вегетативных почек. Перед высушиванием проверяли жизнеспособность и начальную влажность образцов. Для исследования отбирали образцы с жизнеспособностью не менее 100%.

facilities, significant work breakdown of qualified specialists, complication of carrying out the meristem regeneration, however it is impossible to provide viability of presenting samples according to financial and material conditions of activity of the National genebank of Ukraine.

In 1959 *Tumanov et al.* established that branches of well-tempered woody and brushwood frost-resistant plants might be successfully frozen down to temperature of liquid nitrogen [6]. Further this fact was confirmed by *Sakai* [8]. After thawing the cuttings of birch, black currant, cherry and apple tree renewed growth, opened up leaves and took the roots.

For providing viability of frozen-thawed samples at the level of 20–30% they were dried with 1°C/hr rate up to 28–30% of humidity with further cooling of apple and grape cuttings from –5 to –30°C [7, 8, 10], currant and gooseberry ones from –5 to 90°C [2]. Then they were placed into liquid nitrogen vapors. Herewith it has been shown in the paper [3] that reduced humidity of used samples down to 30% results in significant decrease of their viability level.

Probably the certain range of humidity, freezing regimen with optimal rate, final temperature of cooling and exposure time prior to plunging into liquid nitrogen, thawing method for the samples of each variety of culture plants should be selected.

The research aim was to determine the ranges of permissible values, providing maximal viability of frozen-thawed cuttings of fruit-berry cultures.

Materials and methods

The research objects were the cuttings of *Dachnitsa* (*Ribes nigrum* L.) black currant; *Stepnaya* (*Prunus cerasus* L.) cherry; *Novost' Kuz'mina* (*Rubus idaeus* L.) raspberry; *Belyy Naliv* (*Malus domestica* L.) apple; *Renklod*, *Ugorka* (*Prunus domestica* L.) prunes and *Lidiya* (*Vitis labrusca* L.) grape. As the control for chosen cryopreservation methods the birch (*Betula pubescens*) cuttings were used due to their high cryoresistance [3, 5, 6].

The cuttings were cut from one year shoots and divided into separated samples for 10 ± 2 units of 5–12 cm length and 0.5–1.2 cm diameter. The cuttings had from 2 to 5 vegetative buds. Prior to drying the viability and initial humidity of samples were examined. There were selected the samples with not less than 100% viability for studying.

The samples' humidity change was determined after drying, cryopreservation, rehydration with measuring and calculated according to the formula:

$$\eta = ((m_0 - m_k)/m_0) \times 100\%,$$

where m_0 – initial mass of native sample, g; m_k – final mass of sample after dehydration to constant mass, g

Изменение влажности образцов определяли после высушивания, криоконсервирования, регидратации взвешиванием и рассчитывали по формуле:

$$\eta = ((m_0 - m_k) / m_0) \times 100\%,$$

где m_0 – начальная масса нативного образца, г; m_k – конечная масса образца после обезвоживания до постоянной массы, г.

Затем черенки делили на группы для высушивания по трем режимам: активный, полуактивный, пассивный. Степень влажности нативных черенков изменяли от 50 до 30% в соответствии с указанными режимами высушивания: активный С1 – сушильная камера, температура $20 \pm 2^\circ\text{C}$, влажность воздуха $25 \pm 5\%$, выдержка 3-е суток; полуактивный С2 – температура $5 \pm 2^\circ\text{C}$, влажность воздуха $75 \pm 5\%$; пассивный С3 – температура $-2 \pm 2^\circ\text{C}$, влажность воздуха $85 \pm 5\%$ [3]. Для сохранения влажности концы черенков перед охлаждением обрабатывали воском или парафином.

Разные скорости замораживания, необходимые для криоконсервирования черенков, получали в два этапа. На первом этапе применяли режим замораживания, основанный на ступенчатом охлаждении со скоростью $0,1 \dots 0,01^\circ\text{C}/\text{ч}$. Образцы помещали в бытовые термосы вместимостью 1,5 и 2 л, затем в рефрижераторы и охлаждали до температур $-5 \dots -30^\circ\text{C}$ с интервалом 5°C и выдержкой 1, 3 и 7 суток соответственно. На втором этапе часть образцов, после их охлаждения до -20 и -30°C , извлекали из термосов, помещали в холщевые мешочки и погружали в жидкий азот со скоростью $600\text{--}800^\circ\text{C}/\text{мин}$. Образцы хранили в рефрижераторах при температурах -5 , -20 и -30°C , а также в жидком азоте с выдержкой от одних суток до одного года.

После замораживания образцов до -196°C применяли три режима оттаивания. Оттаивание образцов по 1-му режиму, со скоростью $70^\circ\text{C}/\text{мин}$, проводили на воздухе при температуре 20°C . Второй режим, со скоростью $1\text{--}3^\circ\text{C}/\text{мин}$, реализовывали при помещении образцов в бытовой термос, который размещали в холодильнике при температуре 5°C . Третий режим основан на ступенчатом оттаивании со скоростью $0,1^\circ\text{C}/\text{ч}$: на 1-й ступени до температуры -30°C , 2-й – до -20°C , 3-й – до -10°C , 4-й – до -5°C , 5-й – до 5°C . При достижении заданной температуры на каждой ступени выдерживали образцы в течение суток.

Режимы охлаждения и отогрева регистрировали хромель-копелевой термопарой при скоростях $0,01\text{--}0,1^\circ\text{C}/\text{ч}$ тестером EC-890G, $70\text{--}800^\circ\text{C}/\text{мин}$ – графопостроителем Н-307.

Влияние эффектов низкотемпературной сублимации внутриклеточной воды и плазмолиза изучали на основе исследования параметров сохранности и жизнеспособности черенков, которые контро-

Then the cuttings were divided into the groups for drying by three regimens: active, semi-active, passive. The humidity rate of native cuttings was changed from 50 down to 30% according to these drying regimens: C1 active – the drying chamber with temperature of $20 \pm 2^\circ\text{C}$, $25 \pm 5\%$ air humidity and 3 days of exposure; C2 semi-active – temperature of $5 \pm 2^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ air humidity; C3 passive – temperature of $-2 \pm 2^\circ\text{C}$ and $85 \pm 5\%$ air humidity [3]. The tips of cuttings were treated with wax or paraffin wax prior to cooling for humidity preservation.

The various rates of freezing necessary for cryopreservation of cuttings were obtained in two stages. At stage 1 the freezing regimen, based on stepwise cooling with $0.1 \dots 0.01^\circ\text{C}/\text{hr}$ rate was used. The samples were placed into domestic thermos flasks of 1.5 and 2 l, then into freezers and cooled down to $-5 \dots -30^\circ\text{C}$ with 5°C interval and 1, 3 and 7 days of exposure, correspondingly. At stage 2 a part of samples after their cooling down to -20 and -30°C were taken out of thermos flasks, placed into linen bags and plunged into liquid nitrogen with $600\text{--}800^\circ\text{C}/\text{min}$ rate. The samples were stored in freezers under -5 , -20 and -30°C and in liquid nitrogen with exposure from a day to a year.

After sample freezing down to -196°C three thawing regimens were used. Samples for the 1st regimens were thawed with the rate of $70^\circ\text{C}/\text{min}$ in air under 20°C . At 2nd regimen with $1\text{--}3^\circ\text{C}/\text{min}$ samples were put into domestic thermos flask, placing into freezer under 5°C . The 3rd regimen was based on stepwise thawing with $0.1^\circ\text{C}/\text{hr}$ rate: at 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th stages it was warmed to -30 , -20 , -10 , -5 and 5°C , correspondingly. When achieving the fixed temperature at each stage the samples were exposed during a day.

The cooling and thawing regimens were recorded by chromel-copel thermocouple at $0.01\text{--}0.1^\circ\text{C}/\text{hr}$ rates with EC-890G tester and $70\text{--}800^\circ\text{C}/\text{min}$ with H-307 plotter.

Effects of low temperature sublimation of intracellular water and plasmolysis were investigated on the base of studying the survival and viability parameters of cuttings, which were controlled after each drying and freezing stage. The cuttings were placed for hydration into exicator above distilled water, exposed during 12 days under 5°C and then grown *in vitro* (in the glass of water at 25°C). Swelling and growth of buds testified to viability of the studied sample. The percentage of sample viability was estimated as a ratio of cuttings' number with opened buds to their total number in the sample *in vitro*.

The integrity index was determined by histologic sections of buds and cuttings, morphoanatomic studies with use of MBS-9 microscope under 28-fold magnification (preparing of buds and wood with determining of their damage area by color) [5].

лировали после каждого этапа высушивания и замораживания. Для восстановления влажности черенки помещали в эксикатор, располагая их над дистиллированной водой, выдерживали 12 суток при температуре 5°C, а затем проращивали в условиях *in vitro* (в стаканах с водой при 25°C). Набухание и развитие почек свидетельствовало о жизнеспособности исследуемого образца. Процент жизнеспособности образца оценивали как отношение количества черенков с раскрытыми почками в условиях *in vitro* к общему их количеству в образце.

Показатель сохранности определяли посредством гистологических срезов почек и черенков, морфоанатомических исследований с использованием микроскопа МБС-9 при увеличении в 28 раз (препарирование почек и древесины с определением площади их повреждения по цвету) [5].

Статистическую обработку результатов проводили по методу альтернативного варьирования [4].

Результаты и обсуждение

Для определения оптимального способа криоконсервирования различных типов черенков растений мы варьировали скорости: обезвоживания черенков в процессе сушки от 0,1 до 1% в сутки [3]; охлаждения от 0,01°C/ч до 800°C/мин с выдержкой при температурах 5, -5, -10, -15, -20 и -30°C от одних суток до одного года; отогрева 0,1°C/ч и 70°C/мин. Результаты опытов показали, что 100%-я жизнеспособность черенков березы наблюдается при высушивании образцов от 37 до 33% при температуре от 20 до -2°C. Стопроцентные показатели сохранности и жизнеспособности биообъекта соответствовали изменению температур в диапазоне от -5 до -20 и -196°C со скоростями охлаждения 0,1°C/ч и 800°C/мин соответственно, а отогрева 0,1°C/ч и 70°C/мин (табл. 1). Влажность нативных черенков составляла $40,0 \pm 2,4\%$, перед охлаждением варьировала от 33 до 37%, а после отогрева – от 15 до 22%.

При хранении биообъектов в течение 5 месяцев в условиях низких температур (-5°C) жизнеспособность снизилась до 30%, а сверхнизких (-160...-196°C) была на уровне 100%. Показатель сохранности во всех образцах остается относительно высоким, что указывает на отсутствие роста в них внутриклеточных кристаллов. Вероятно, что причиной снижения жизнеспособности образцов является уменьшение влажности до 13% при температуре хранения -5°C. Вместе с тем при уровне влажности 14% и температуре хранения -28°C в течение 6 месяцев жизнеспособность биообъекта не изменялась.

В результате высушивания черенков черной смородины по трем режимам жизнеспособность образцов не изменялась при снижении их влажности

Statistical processing was carried out according to the method of alternative variation [4].

Results and discussion

For determination of optimal cryopreservation method for various types of plant cuttings we varied the rates of cuttings' dehydration during drying from 0.1 up to 1% a day [3]; cooling from 0.01°C/hr down to 800°C/min with exposure at 5, -5, -10, -15, -20 and -30°C from one day to one year; thawing from 0.1°C/hr up to 70°C/hr. The results of experiments have shown that 100% viability of birch cuttings was observed during drying of the samples from 37 down to 33% at the temperature from 20 down to -2°C. One hundred percent indices of integrity and viability of bioobject corresponded to temperature change within the range from -5 down to -20 and -196°C with the cooling rates of 0.1°C/hr and 800°C/min, correspondingly and thawing rates of 0.1°C/hr and 70°C/min (Table 1). Humidity of native cuttings made $40.0 \pm 2.4\%$, prior to cooling it changed from 33 up to 37%, but after thawing it was from 15 up to 22%.

During storage of bioobjects for 5 months under low temperatures (-5°C) viability reduced down to 30%, but under ultra-low ones (-160...-196°C) it was at 100% level. The index of integrity in all samples remains relatively high, that denotes the absence of intracellular crystal growth in them. Probably the cause of sample viability reduction is humidity decrease down to 13% under -5°C storage temperature. Moreover under 14% humidity and -30°C storage temperature during 6 months the viability of bioobject did not change.

Due to drying of black currant berry cuttings by three regimens the viability of samples during decrease of their humidity down to 42% did not change. Cooling of samples with the rate of 0.1°C/hr down to -20°C and 800°C/min down to -196°C and their thawing with 70°C/min rate enabled to obtain 100% viability of frozen-thawed cuttings (Table 2). Herewith time of exposure at -20 and -28°C varied from 10 to 60 days. Application of 0.1°C/hr slow rate of thawing reduced the level of integrity and viability of 0-50% in the samples, cooled down to -20 and -196°C. Humidity of frozen-thawed samples, with 100% viability varied from 34 to 43%.

Storage of samples during 6 months did not result in decrease of their viability under -28 and -196°C, but under higher temperatures (-5°C) this index reduced down to 70-80%.

For determining of minimally permissible value of humidity of raspberry cuttings, providing maximal viability of sample the three drying regimens were used. It has been established, that this value make 37% [3]. Maximal viability of raspberry cuttings after cooling down to -196°C (70%) was obtained under

Таблица 1. Влияние ступенчатого охлаждения черенков березы на их жизнеспособность при охлаждении со скоростью 0,1°C/ч до температуры –20°C и 800°C/мин до –196°C

Table 1. Effect of stepwise cooling of birch cuttings on their viability during cooling with 0.1°C/hr rate down to –20°C and 800°C/min down to –196°C

Режим сушки Drying regimen	Влажность после сушки Humidity after drying $\eta \pm m, \%$	Охлаждение до температуры, °C (выдержка, сут) Cooling down to the temperature, °C (exposure, days)	Влажность после отогрева Humidity after warming $\eta \pm m, \%$	Сохранность Survival $S \pm m, \%$	Жизнеспособность Viability $V \pm m, \%$
C1	32,8 ± 1,9	– 20 (30)	14,6 ± 1,1	100 ± 0	100 ± 0
C2	35,7 ± 2,1	– 20 (30) *	22,3 ± 1,5	100 ± 0	100 ± 0
C1	33,4 ± 2,0	– 20 (90); – 30 (10)	18,6 ± 1,4	100 ± 0	100 ± 0
C2	35,5 ± 2,1	– 20 (90); – 30 (10) *	20 ± 1,5	100 ± 0	100 ± 0
C1	32,4 ± 1,8	– 20 (30); – 196 (1)	18,6 ± 1,4	100 ± 0	100 ± 0
C2	35,5 ± 2,1	– 20 (90); – 30 (10); – 196(1)*	20 ± 1,5	100 ± 0	100 ± 0
C3	36,5 ± 2,2	– 20 (30); – 196 (1)	22 ± 1,6	100 ± 0	100 ± 0
C3	36,9 ± 2,3	– 20 (30); – 196 (1)	–	100 ± 0	100 ± 0

Примечание: влажность нативных черенков η_0 составляет 40,0 ± 2,4%; длина – 6±1см; диаметр – 0,4±0,2 см; скорость отогрева – 0,1°C/ч и * – 70 °C/мин.

Notes: humidity of native cuttings η_0 makes 40.0 ± 2.4%; length 6 ± 1 cm; diameter 0.4 ± 0.2 cm; thawing rate 0.1°C/hr and * – 70°C/min.

до уровня 42%. Охлаждение образцов со скоростью 0,1°C/ч до температуры –20°C и 800°C/ч до –196°C и их отогрева со скоростью 70°C/мин дали возможность получить жизнеспособность деконсервированных черенков 100% (табл. 2). При этом время выдержки при температурах –20 и –28°C варьировало от 10 до 60 суток. Использование низкой скорости отогрева (0,1°C/ч) снижало уровень сохранности и жизнеспособности 0–50% у образцов, охлажденных до –20 и –196°C. Влажность деконсервированных образцов, имеющих 100%-ю жизнеспособность, варьировала от 34 до 43%.

Хранение образцов в течение 6 месяцев не приводило к снижению их жизнеспособности в процессе хранения при температурах –28 и –196°C, а при более высоких температурах (–5°C) данный показатель снижался до 70–80%.

Для определения минимально допустимой величины влажности черенков малины, обеспечивающей максимальную жизнеспособность образца, использовали три режима высушивания. Установлено, что данная величина составляет 37% [3]. Максимальная жизнеспособность черенков малины после охлаждения до температуры –196°C (70%) получена при начальной влажности образца 38% (табл. 3). При влажности 34% уровень жизнеспособности снизился до 57%. Разброс значений влажности образцов после оттаивания составил 24–40%.

Жизнеспособность черенков вишни после глубокого замораживания составила 75% при началь-

38% initial humidity of sample (Table 3). Viability level was decreased down to 57% under 34% humidity. Data scattering of samples' humidity after thawing was 24–40%.

Viability of cherry cuttings after deep freezing was 75% when initial humidity of samples was 42% (Table 4), under 31% humidity it decreased down to 44%.

High data scattering of viability of Belyy Naliv apple cuttings of 25–60% (Table 5) after their cooling down to –15°C was due to low humidity of samples after drying of 37–42% in relation to minimally admissible value of 42% [3]. Death of samples during cooling lower than –20°C with humidity of 44% was stipulated by water surplus, resulted in intracellular formation of ice and that of 27–37% by water deficiency due to overdrying. Humidity of samples after cooling made 34–39%.

Maximal viability of Lidiya grape cuttings (86%) was obtained during cooling down to –20°C with samples' humidity of 37.4% after drying (Table 6). The reduction of viability level down to 70% during sample cooling down to –5°C was related to its humidity, which was lower than minimally admissible level of 37% [3]. The absence of viable samples after their freezing down to liquid nitrogen temperatures likely depends on surplus of intracellular water (37.2–40.9%), resulting in formation of ice crystals, damaging cells.

Viability of Ugorka prune cuttings, cooled down to –15°C made 100% when using the high rate of thawing of 70°C/min and 25% at low one of 0.1°C/hr

Таблица 2. Влияние ступенчатого охлаждения черенков черной смородины “Дачница” на их жизнеспособность при охлаждении со скоростью 0,1 °С/ч до температуры –20°С и 800°С/мин до –196°С

Table 2. Effect of stepwise cooling of Dachnitsa black currant berry cuttings on their viability during cooling with 0.1°C/hr rate down to –20°C and 800°C/min down to –196°C

Режим сушки Drying regimen	Влажность после сушки Humidity after drying $\eta \pm m, \%$	Охлаждение до температуры, °С (выдержка, сут) Cooling down to the temperature, °C (exposure, days)	Влажность после отогрева Humidity after warming $\eta \pm m, \%$	Сохранность Survival $S \pm m, \%$	Жизнеспособность Viability $V \pm m, \%$
C3	47,2 ± 2,8	– 20 (60)	42,5 ± 2,4	100 ± 0	100±0
C3	48,2 ± 2,9	– 28 (10)	38,5 ± 2,5	100 ± 0	100±0
C1	41,9 ± 2,3	– 20 (30); – 196 (1)	33,7 ± 2,3	100 ± 0	100±0
C2	45,7 ± 2,4	– 20 (30); – 196 (1)*	35,8 ± 2,4	80 ± 4	50±6
C1	32,3 ± 1,9	– 20 (30); – 196 (1)*	–	30 ± 16	0±0
C1	41,9 ± 2,3	– 30 (10); – 196 (1)	33,7 ± 2,3	100 ± 0	100±0
C3	48,7 ± 2,9	– 30 (10); – 196 (1)	39,7 ± 2,6	100 ± 0	100±0

Примечание: влажность нативных черенков η_0 составляет 49,8 ± 2,8%; длина – 7 ± 1 см; диаметр – 0,4 ± 0,1 см; скорость отогрева – 70°С/мин и * – 0,1°С/ч.

Notes: humidity of native cuttings η_0 49.8 ± 2.8%; length 7 ± 1 cm; diameter 0.4 ± 0.1 cm; thawing rate 70°C/min and * – 0.1°C/hr.

Таблица 3. Влияние ступенчатого охлаждения черенков малины “Новость Кузмина” на их жизнеспособность при охлаждении со скоростью 0,1°С/ч до температуры –20°С и 600°С/мин до –196°С

Table 3. Effect of stepwise cooling of Novost' Kuz'mina raspberry cuttings on their viability during cooling with 0.1°C/hr rate down to –20°C and 600°C/min down to –196°C

Режим сушки Drying regimen	Влажность после сушки Humidity after drying $\eta \pm m, \%$	Охлаждение до температуры, °С (выдержка, сут) Cooling down to the temperature, °C (exposure, days)	Влажность после отогрева Humidity after warming $\eta \pm m, \%$	Сохранность Survival $S \pm m, \%$	Жизнеспособность Viability $V \pm m, \%$
–	40,0 ± 2,3	– 5 (30); – 20 (30)	31,1 ± 1,8	100 ± 0	100 ± 0
C2	38,0 ± 2,2	– 5 (30); – 20 (30); – 30 (10)	23,3 ± 1,6	100 ± 0	100 ± 0
C2	37,3 ± 2,1	– 30 (10)	30,3 ± 1,7	80 ± 15	80 ± 15
C3	38,3 ± 2,3	– 20 (30); – 196 (1)	–	80 ± 15	70 ± 16
C1	34,4 ± 2,0	– 20 (30); – 196 (1)	29,8 ± 1,7	70 ± 16	57 ± 17
C2	36,9 ± 2,2	– 20 (30); – 196 (1)*	11,8 ± 1,3	0 ± 0	0 ± 0

Примечание: влажность нативных черенков η_0 составляет 40,0 ± 2,4%; длина 11 ± 1 см; диаметр – 0,6 ± 0,2 см; скорость отогрева – 70°С/мин и * – 0,1°С/ч.

Notes: humidity of native cuttings η_0 makes 40.0 ± 2.4%; length 11 ± 1 cm; diameter 0.6 ± 0.2 cm; thawing rate 70°C/min and * – 0.1°C/hr.

ной влажности образцов 42% (табл. 4), при влажности 31% она снижалась до 44%.

Высокий разброс значений жизнеспособности черенков яблони “Белый налив” 25–60% (табл. 5) после их охлаждения до температуры –15°С обусловлен низкой влажностью образцов после высушивания: 37–42% при минимальном допустимом уровне 42% [3]. Гибель образцов при охлаждении ниже –20°С с влажностью 44% обусловлена избытком воды, который приводит к внутриклеточ-

(Table 7). For the cuttings of Renklod prune the similar dependence was obtained (Table 8). The humidity after thawing was 19–40%. After deep freezing the viability of all frozen-thawed samples was absent.

The analysis of obtained results shows that the cuttings of birch and black currant berry preserve initial viability, resulting from use of different drying regimens such as: stepwise cooling with the rate of 0.1°C/hr down to –20...–28°С, long-term storage at –160...–196°С and further thawing with the rate of

Таблица 4. Влияние ступенчатого охлаждения черенков вишни “Степная” на их жизнеспособность при охлаждении со скоростью 0,1°C/ч до температуры –20°C и 800°C/мин до –196°C, скорость отогрева 70°C/мин

Table 4. Effect of stepwise cooling of Stepnaya cherry cuttings on their viability during cooling with 0.1°C/hr rate down to –20°C and 800°C/min down to –196°C, thawing rate is 70°C/min

Режим сушки Drying regimen	Влажность после сушки Humidity after drying $\eta \pm m, \%$	Охлаждение до температуры, °C (выдержка, сут) Cooling down to the temperature, °C (exposure, days)	Влажность после отогрева Humidity after warming $\eta \pm m, \%$	Сохранность Survival $S \pm m, \%$	Жизнеспособность Viability $V \pm m, \%$
C2	40 ± 2,3	– 5 (25); – 20 (3)	32,4 ± 2,2	100 ± 0	80 ± 13
–	42,0 ± 2,4	– 5 (30); – 20 (30); – 30 (15)	30,3 ± 2,1	100 ± 0	80 ± 13
C2	35 ± 2,1	– 20 (50); – 30 (15)	37,4 ± 2,4	80 ± 12	56 ± 18
–	42,0 ± 2,4	– 20 (30); – 196 (1)	–	80 ± 12	75 ± 14
C1	31 ± 1,6	– 20 (30); – 196 (1)	–	90 ± 10	44,4 ± 14
–	42,0 ± 2,3	– 20 (50); – 30 (3); – 196 (1)	–	30 ± 13	25 ± 13
C1	–	– 20 (30); – 196 (1)*	–	20 ± 12	0 ± 0
–	42,0 ± 2,3	– 20 (50); – 30 (3); – 196 (1)*	–	20 ± 12	0 ± 0

Примечание: влажность нативных черенков η_0 составляет 42,0 ± 2,5%; длина – 5 ± 1 см, диаметр – 0,4 ± 0,1 см; скорость отогрева – 70°C/мин и * – 0,1°C/ч.

Notes: humidity of native cuttings η_0 makes 42.0 ± 2.5%; length 5 ± 1 cm; diameter 0.4 ± 0.1 cm; thawing rate 70°C/min and * – 0.1°C/hr.

Таблица 5. Влияние ступенчатого охлаждения черенков яблони “Белый налив” на их жизнеспособность при охлаждении со скоростью 0,1°C/ч до температуры –20, –28°C и 800°C/мин до –196°C

Table 5. Effect of stepwise cooling of Belyy naliv apple cuttings on their viability during cooling with 0.1°C/hr rate down to –20, –28°C and 800°C/min down to –196°C

Режим сушки Drying regimen	Влажность после сушки Humidity after drying $\eta \pm m, \%$	Охлаждение до температуры, °C Cooling down to the temperature, °C	Влажность после отогрева Humidity after warming $\eta \pm m, \%$	Сохранность Survival $S \pm m, \%$	Жизнеспособность Viability $V \pm m, \%$
C2	41,5 ± 2,2	– 15	38,4 ± 2,1	100 ± 0	60 ± 15
C1	37,3 ± 2,3	– 15	34,0 ± 2,0	100 ± 0	25 ± 14
–	44,4 ± 2,4	– 15*	39,0 ± 2,2	40 ± 15	0 ± 0
–	44,4 ± 2,5	– 20	36,9 ± 2,1	80 ± 14	40 ± 15
C1	33,1 ± 1,9	– 20	–	60 ± 15	0 ± 0

Примечание: влажность нативных черенков η_0 составляет 44,4 ± 2,4%; длина – 6 ± 1 см; диаметр – 0,5 ± 0,2 см; скорость отогрева – 70°C/мин и * – 0,1°C/ч.

Notes: humidity of native cuttings η_0 makes 44.4 ± 2.4%; length 6 ± 1 cm; diameter 0.5 ± 0.2 cm; thawing rate 70°C/min and * – 0.1°C/hr.

ному образованию льда, и 27–37% – её недостатком вследствие их пересушивания. Влажность образцов после охлаждения составила 34–39%.

Максимальная жизнеспособность черенков винограда “Лидия” (86%) получена при охлаждении до температуры –20°C с влажностью образцов после сушки 37,4% (табл. 6). Снижение уровня жизнеспособности до 70% при охлаждении образцов до температуры 5°C связано с их влажностью, которая оказалась ниже минимально допустимого уровня 37% [3]. Отсутствие жизнеспособных образцов после их замораживания до температуры жид-

70°C/min. It has been shown that within positive range of used temperatures the humidity level of birch cuttings should be at least 32% (see Table 1) and 37% for black currant berry (see Table 2). Under negative temperatures (–28...–196°C) this index may decrease down to 14 and 30%, correspondingly. The viability of studied samples is sharply decreased lower than these critical values due to hyperdehydration of cells (plasmolysis effect).

For frozen-thawed cuttings of raspberry and apple (see Table 3, 5) initial 100% viability is kept during cooling down to –30 and –15°C, correspondingly.

Таблица 6. Влияние ступенчатого охлаждения и отогрева черенков винограда “Лидия” на их жизнеспособность при охлаждении со скоростью 0,1°C/ч с интервалом температур 5°C и выдержкой 1 сутки до разных температур
Table 6. Effect of stepwise cooling and thawing of Lidiya grape cuttings on their viability during cooling with 0.1°C/hr rate with 5°C interval of temperatures and 1 day exposure to different temperatures

Режим сушки Drying regimen	Влажность после сушки Humidity after drying $\eta \pm m, \%$	Охлаждение до температуры, °C Cooling down to the temperature, °C	Влажность после отогрева Humidity after warming $\eta \pm m, \%$	Сохранность Survival $S \pm m, \%$	Жизнеспособность Viability $V \pm m, \%$
C1	33,0 ± 1,9	-5	-	100 ± 0	70 ± 15
C1	37,4 ± 2,1	-20	36,6 ± 2,0	100 ± 0	86 ± 12
C1	37,5 ± 2,1	-20	30,0 ± 1,8	50 ± 17	0 ± 0
C2	40,7 ± 2,2	-30	30,0 ± 1,8	20 ± 13	0 ± 0
C1	38,2 ± 2,1	-20; -196*	26,7 ± 1,6	10 ± 10	0 ± 0
C1	40,9 ± 2,2	-20; -196	34,8 ± 1,5	10 ± 10	0 ± 0
C1	37,2 ± 2,1	-30; -196*	-	10 ± 10	0 ± 0

Примечание: влажность нативных черенков η_0 составляет 49,4 ± 2,7%; длина – 8 ± 1 см; диаметр – 0,5 ± 0,1 см; скорость отогрева – 70°C/мин и * – 0,1°C/ч.

Notes: humidity of native cuttings η_0 makes 49.4 ± 2.7%; length 8 ± 1 cm; diameter 0.5 ± 0.1 cm; thawing rate 70°C/min and * – 0.1°C/hr.

кого азота, по-видимому, зависит от избытка внутриклеточной воды (37,2–40,9%), приводящего к образованию повреждающих клетки кристаллов льда.

Жизнеспособность черенков сливы сортотипа “Угорка”, охлажденных до –15°C, составила 100% при использовании высокой скорости отогрева (70°C/мин) и 25% – при низкой 0,1°C/ч (табл. 7). Для черенков сливы сортотипа “Ренклюд” получена подобная зависимость (табл. 8). Влажность после отогрева составила 19–40%. После глубокого замораживания жизнеспособность всех деконсервированных образцов отсутствовала.

Анализ полученных результатов показывает, что черенки березы, черной смородины сохраняют начальную жизнеспособность в результате применения различных режимов сушки: ступенчатого охлаждения со скоростью 0,1°C/ч до температуры –20...–28°C, длительного хранения при температурах –160...–196°C и последующего оттаивания со скоростью 70°C/мин. Показано, что в положительном диапазоне используемых температур уровень влажности образцов черенков березы должен быть не менее 32% (см. табл. 1) и смородины – 37% (см. табл. 2). При отрицательных температурах (–28...–196°C) данный показатель может снижаться до 14 и 30% соответственно. Ниже данных критических значений влажности жизнеспособность исследуемых образцов резко снижается вследствие чрезмерного обезвоживания клеток (эффект плазмолиза).

Для деконсервированных черенков малины и яблони (см. табл. 3, 5) начальная 100%-я жизнеспособность сохраняется при охлаждении до –30 и

Herein the humidity of samples should be at least 20 and 33%. Lower values of temperature result in reduction of indices of integrity and viability due to the growth of intracellular ice crystals.

Combined application of drying, cooling, storage and thawing methods for grape and prune cuttings makes it possible to preserve the initial viability of samples during cooling down to –15 and –10°C (Table 6, 7). Herewith permissible limit of initial humidity of studied samples should be not lower than 37 and 45% within the positive range of temperatures and 42 and 37% within a negative one.

Thus, the viability of frozen-thawed cuttings depends on complex of factors, the most important of which is the cooling rate. The viability level changes from 0 to 100% during cooling (1–0.1°C/hr) down to –20°C. The stepwise method of samples' cooling in thermos flasks from –5 down to –20°C with exposure of about a day at each stage was the most producible. The initial humidity of sample has optimal value, which is determined with its minimal level, providing the possibility of rehydration after thawing, and maximal one, preventing growth of intracellular ice crystals.

It should be noted that during stepwise cooling the absence of sample drying stage with low-temperature sublimation of intracellular water is possible. The humidity of samples after thawing reduces by 4–18% and makes 24–40%. After rehydration the humidity of viable samples varied from 18 up to 52% and that of non-viable was 19–45%. The humidity in certain sample reduced from 1 to 10%, that was associated with irregular spreading of humidity along the whole cutting (between the tips and center). This variation

Таблица 7. Влияние ступенчатого охлаждения черенков сливы сорта типа “Угорка” на их жизнеспособность при охлаждении со скоростью 0,1°C/ч до температуры –20°C и 800°C/мин до –196°C

Table 7. Effect of stepwise cooling of Ugorka prune cuttings on their viability during cooling with 0.1°C/hr rate down to –20°C and 800°C/min down to –196°C

Режим сушки Drying regimen	Влажность после сушки Humidity after drying $\eta \pm m, \%$	Охлаждение до температуры, °C (выдержка, сут) Cooling down to the temperature, °C (exposure, days)	Влажность после отогрева Humidity after warming $\eta \pm m, \%$	Сохранность Survival $S \pm m, \%$	Жизнеспособность Viability $V \pm m, \%$
–	46,0 ± 2,8	– 15 (90)	22,0 ± 1,6	100 ± 0	100 ± 0
–	46,0 ± 2,8	– 15 (90)*	–	50 ± 17	25 ± 14
C1	35,7 ± 2,5	– 20 (90)	29,0 ± 1,8	80 ± 13	0 ± 0
C3	40,2 ± 2,6	– 20 (90); – 30 (20)	25,0 ± 1,7	50 ± 17	0 ± 0
–	46,0 ± 2,8	– 20 (90); – 30 (20); – 196 (1)	31,8 ± 1,8	20 ± 13	0 ± 0
C3	39,0 ± 2,7	– 20 (90); – 30 (20); – 196 (1)	30,1 ± 1,8	20 ± 13	0 ± 0
C2	36,9 ± 2,6	– 20 (90); – 30 (20); – 196 (1)	21,1 ± 1,6	50 ± 17	0 ± 0
C1	29,9 ± 1,8	– 20 (90); – 30 (20); – 196 (1)	16,7 ± 1,5	80 ± 13	0 ± 0

Примечание: начальная влажность черенков η_0 составляет 46,0 ± 2,8%; длина – 5 ± 1 см; диаметр – 0,4 ± 0,1 см; скорость отогрева – 70°C/мин и * – 0,1°C/ч.

Notes: initial humidity of cuttings η_0 makes 46.0 ± 2.8%; length 5 ± 1 cm; diameter 0.4 ± 0.1 cm; thawing rate 70°C/min and * – 0.1°C/hr.

Таблица 8. Влияние ступенчатого охлаждения и отогрева черенков сливы сорта типа “Ренклюд” на их жизнеспособность при охлаждении со скоростью 0,1°C/ч с интервалом температур 5°C и периодом выдержки 1 сутки до разных температур

Table 8. Effect of stepwise cooling and thawing of Renklod prune cuttings on their viability during cooling with 0.1°C/hr rate with 5°C interval of temperatures and 1 day exposure to different temperatures

Режим сушки Drying regimen	Влажность после сушки Humidity after drying $\eta \pm m, \%$	Охлаждение до температуры, °C (выдержка, сут) Cooling down to the temperature, °C (exposure, days)	Влажность после отогрева Humidity after warming $\eta \pm m, \%$	Сохранность Survival $S \pm m, \%$	Жизнеспособность Viability $V \pm m, \%$
C3	46,0 ± 2,8	– 10 (60)	40,6 ± 2,3	100 ± 0	100 ± 0
C3	46,0 ± 2,8	– 15 (60)*	18,5 ± 1,4	50 ± 17	0 ± 0
C3	46,0 ± 2,8	– 20 (60)	40,2 ± 2,3	80 ± 13	100 ± 0
C3	46,0 ± 2,8	– 20 (90)	38,3 ± 2,2	50 ± 17	41,2 ± 0

Примечание: начальная влажность черенков η_0 составляет 49,4 ± 2,9%; длина – 6 ± 1 см; диаметр – 0,5 ± 0,1 см; скорость отогрева – 70°C/мин и * – 0,1°C/ч.

Notes: initial humidity of cuttings η_0 makes 49.4 ± 2.9%; length 6 ± 1 cm; diameter 0.5 ± 0.1 cm; thawing rate 70°C/min and * – 0.1°C/hr.

–15°C соответственно. Влажность образцов при этом должна быть не ниже 20 и 33%. Более низкие значения температуры приводят к снижению показателей сохранности и жизнеспособности вследствие роста внутриклеточных кристаллов льда.

Применение комплекса способов высушивания, охлаждения, хранения и оттаивания черенков винограда и сливы дает возможность сохранить начальную жизнеспособность образцов при охлаждении до –15 и –10°C (табл. 6, 7). При этом допустимый

of indices of sample humidity after thawing denotes the necessity of studying the cuttings' storage conditions under low temperatures and rehydration as their viability criterion.

Thus, establishment of permissible values of humidity, cooling-thawing rates, temperature and exposure term of samples prior to plunging into liquid nitrogen of birch, current berry, raspberry and cherry cuttings made possible to increase viability of frozen-thawed samples in 2–5 times in comparison to the present

предел начальной влажности исследуемых образцов не должен быть ниже 37 и 45% в положительном диапазоне температур и 42 и 37% – в отрицательном.

Таким образом, жизнеспособность деконсервированных черенков зависит от комплекса факторов, наиболее значительным из которых является скорость охлаждения. Уровень жизнеспособности изменяется от 0 до 100% при охлаждении (1–0,1°C/ч) до температуры –20°C. Наиболее эффективным оказался ступенчатый способ охлаждения образцов в термосах от температуры –5 до –20°C с выдержкой около суток на каждой ступени. Начальная влажность образца имеет оптимальное значение, которое определяется его минимальным уровнем, обеспечивающим возможность регидратации после оттаивания, и максимальным, препятствующим росту внутриклеточных кристаллов льда.

Следует отметить, что при ступенчатом охлаждении возможно исключение этапа сушки образцов с помощью низкотемпературной сублимации внутриклеточной воды. Влажность образцов после оттаивания уменьшается на 4–18% и составляет 24–40%. После регидратации влажность жизнеспособных образцов варьировала от 18 до 52% и нежизнеспособных – 19–45%. Влажность в отдельном образце уменьшалась с 1 до 10%, что связано с неравномерностью распределения влажности по длине черенка (между концами и серединой). Такое варьирование показателей влажности образцов после оттаивания указывает на необходимость изучения условий хранения черенков при низких температурах и регидратации как критерия их жизнеспособности.

Таким образом, установление допустимых значений влажности, скоростей охлаждения-оттаивания, температуры и времени выдержки образцов перед погружением в жидкий азот черенков березы, смородины, малины, вишни дало возможность увеличить жизнеспособность деконсервированных образцов в 2–5 раз по сравнению с существующими способами криоконсервирования [2, 6–10]. Для черенков яблони, сливы, винограда необходимо проводить дополнительные исследования с целью установления закономерностей негативного влияния плазмолитической и внутриклеточной кристаллообразования на основе методов многофакторного анализа [4].

Выводы

1. Области допустимых значений, обеспечивающих максимальную жизнеспособность исследуемых черенков березы, черной смородины, малины, вишни соответствуют влажности 32–40; 40–50; 37–40; 33–45% в положительном диапазоне температур и 14–28; 30–40; 23; 37% – в отрицательном.

methods of cryopreservation [2, 6–10]. For cuttings of apple, prune and grape it is necessary to carry out additional studies, aimed to reveal the regularities of plasmolysis and intracellular crystal-formation negative effect based on methods of multifactor analysis [4].

Conclusions

1. Ranges of permissible values, providing maximal viability of studied cuttings of birch, black currant berry, raspberry, cherry correspond to humidity of 32–40; 40–50; 37–40; 33–45% within the positive range of temperatures and 14–28, 30–40, 23, 37% within the negative one.

During application of different regimens of drying and cooling with rate of 0.1°C/hr down to –20°C with further plunging of samples into liquid nitrogen one may provide viability of frozen-thawed cuttings of currant berry and birch at the level of 100%, 88% for raspberry and 57% for cherry.

References

1. Vasyuta V.M., Rybak G.M., Klimenko S.V. Gardener's manual.– Kiev: Naukova Dumka, 1990.– P. 40–42.
2. Verzhuk V.G., Philipenko G.I., Tikhonova N.G., Zhestkov A.S. Cryopreservation methods of fruit cultures genepasma by the example of currant berry, honeyberry and gooseberry // Biofizika zhivoy kletki.– 2008.– Vol. 9.– P. 35–36.
3. Gorbunov L.V., Shiyanova T.P., Ryabchun V.K. Optimization of dehydration conditions of fruit-berry culture cuttings // Geneticheskiye resursy roslyn.– 2008.– N5.– P. 182–187.
4. Lakin B.F. Biometry.– Moscow: Vysshaya shkola, 1990.– 254 p.
5. Solov'eva M.A. Determining methods of winter resistance of fruit-berry cuttings: Manual.– Leningrad: Gidrometeoizdat, 1982.– 35 p.
6. Tumanov I.I., Krasavtsev O.A., Khvalin N.N. Increase of frost-resistance of birch and black currant berry down to –253°C by acclimation // Doklady AN SSSR.– 1959.–Vol. 127, N??.– 1301 p.
7. Popov A.S., Popova E.V., Nikishina T.V., Vysotskaya O.N. Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences // International Journal of Refrigeration.– 2006.– Vol. 29, N3.– P. 403–410.
8. Sakai A. Survival of the twig of woody plants at –196°C // Nature.– 1960.– Vol. 185.– P. 393–394.
9. Towill L.E., Forsline P.L. Cryopreservation of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) using a dormant vegetative bud method // Cryoletters.– 1999.– Vol. 20, N4.– P. 215–225.
10. Wu Y., Zhao Y., Engelmann F. et al. Cryopreservation of apple dormant buds and shoot tips // Cryoletters.– 2001.– Vol. 22, N6.– P. 375–380.

Accepted in 06.03.2009

2. При использовании различных режимов сушки и охлаждения со скоростью $0,1^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ до -20°C с последующим погружением образцов в жидкий азот можно обеспечить жизнеспособность деконсервированных черенков смородины и березы на уровне 100%, малины – 88%, вишни – 57%.

Литература

1. *Васюта В.М., Рыбак Г.М., Клименко С.В.* Справочник садовода.– Киев: Наук. думка, 1990.– С. 40–42.
2. *Вержук В.Г., Филиппенко Г.И., Тихонова Н.Г., Жестков А.С.* Способы криосохранения генплазмы плодовых культур на примере смородины, жимолости и крыжовника // Биофизика живой клетки.– 2008.– Т. 9, №1.– С. 35–36.
3. *Горбунов Л.В., Шиянова Т.П., Рябчун В.К.* Оптимізація умов дегідратації живців плодово-ягідних культур // Генетичні ресурси рослин.– 2008.– №5.– С. 182–187.
4. *Лакін Б.Ф.* Биометрия.– М.: Высш. шк., 1990.– 254 с.
5. *Соловьева М.А.* Методы определения зимостойкости плодово-ягодных культур: Метод. рук-во.– Ленинград: Гидрометеиздат, 1982.– 35 с.
6. *Туманов И.И., Красавцев О.А., Хвалин Н.Н.* Повышение морозостойкости березы и черной смородины до -253°C путем закаливания // Докл. АН СССР.– 1959.– Т. 127.– С. 1301.
7. *Popov A.S., Popova E.V., Nikishina T.V., Vysotskaya O.N.* Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences // International Journal of Refrigeration.– 2006.– Vol. 29, N3.– P. 403–410.
8. *Sakai A.* Survival of the twig of woody plants at -196°C // Nature.– 1960.– Vol. 185.– P. 393–394.
9. *Towill L.E., Forsline P.L.* Cryopreservation of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) using a dormant vegetative bud method // Cryoletters.– 1999.– Vol. 20, N4.– P. 215–225.
10. *Wu Y., Zhao Y., Engelmann F. et al.* Cryopreservation of apple dormant buds and shoot tips // Cryoletters.– 2001.– Vol. 22, N6.– P. 375–380.

Поступила 06.03.2009