

Воспроизводимость результатов криоконсервирования черенков различных сортов семечковых плодовых деревьев

UDC 635.076:57.043

L.V. GORBUNOV

Reproducibility of Results for Cryopreservation of Different Variety Cuttings of Pomefruit Trees

Получены жизнеспособные деконсервированные образцы яблони (Белый налив, Теремок, Радость), груши (Велика літня, Улюблена Клапа, Вдала, Зелена Мліївська). При помощи дисперсионного анализа установлено, что вероятность развития деконсервированных черенков растений зависит от сорта и способа криоконсервирования. Средние показатели жизнеспособности для разных сортов яблони отличаются на 32% и груши – на 86%. Максимальные показатели жизнеспособности черенков получены после их температурной адаптации при -10°C в течение 14–60 суток, ступенчатого охлаждения со скоростью $0,1-0,5^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ до -30°C (выдержка 3–7 суток) прямого погружения в жидкий азот, хранения в течение от 1 до 30 суток и отогрева со скоростью $70^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Ключевые слова: черенки яблони и груши, криоконсервирование, жизнеспособность, эффективность, скорости охлаждения и отогрева.

Одержані життєздатні деконсервовані зразки яблуні (Белый налив, Теремок, Радость), груші (Велика літня, Улюблена Клапа, Вдала, Зелена Мліївська). За допомогою дисперсійного аналізу виявлено, що вірогідність розвитку деконсервованих живців рослин залежить від сорту і способу криоконсервування. Середні показники життєздатності різних сортів яблуні відрізняються на 32% і груші – на 86%. Максимальні показники життєздатності живців одержані після їх температурної адаптації при -10°C протягом 14–60 діб, ступінчастого охолодження зразків із швидкістю $0,1-0,5^{\circ}\text{C}/\text{год}$ до -30°C з витримкою 3–7 діб, при наступному прямому зануренні в рідкий азот, зберіганні строком від 1 до 30 діб і відігріванні зі швидкістю $70^{\circ}\text{C}/\text{хв}$.

Ключові слова: живці яблуні і груші, криоконсервування, життєздатність, ефективність, швидкості охолодження і відігрівання.

Viable frozen-thawed samples of apple (Belyy Naliv, Teremok, Radost), pear (Velyka Litnya, Ulyublena Klapa, Vdala, Zelena Mliivska) were obtained. With dispersion analysis it has been established that the development probability of frozen-thawed plant cuttings depends on variety and cryopreservation method. Mean indices of viability for different apple varieties differ by 32% and pear by 86%. Maximal indices of cuttings' viability are obtained after their temperature adaptation at -10°C during 14–60 days, stepwise cooling of the samples with $0.1-0.5^{\circ}\text{C}/\text{hr}$ rate down to -30°C (exposure 3–7 days), direct plunging into liquid nitrogen, storage from 1 to 30 days and thawing rate of $70^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Key-words: apple and pear cuttings, cryopreservation, viability, efficiency, cooling and thawing rates.

Для обеспечения жизнеспособности деконсервированных черенков яблони на уровне 20–30% их предварительно высушивают до 30% влажности с последующим охлаждением со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ до -30°C [6, 8]. Однако данный способ криоконсервирования черенков яблони сорта Белый налив не позволил получить жизнеспособные образцы [2]. Вероятно, что для криоконсервирования каждого сортотипа культурных растений необходимо подбирать соответствующие условия: влажность образцов; режим замораживания, имеющий оптимальную скорость и конечную температуру охлаждения; время их выдержки перед погружением в жидкий азот; способ отогрева.

Повышение уровня жизнеспособности деконсервированного объекта – один из аспектов реше-

To provide viability of frozen-thawed apple cuttings at the level of 20–30% they were previously dried-up to 30% humidity with further cooling rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{hr}$ down to -30°C [6, 8]. However this cryopreservation method of Belyy Naliv apple cuttings did not enable the obtaining of viable samples [2]. It is likely that for cryopreservation of each plant variety it is necessary to select the corresponding protocols such as: samples' humidity, freezing regimen with optimal rate and final temperature of cooling, their exposure term prior to plunging into liquid nitrogen, thawing method.

The increase of frozen-thawed object viability level is one of the aspects of solving the problem of reproducing the experimental results, based on optimization of variety of interrelated biological and physical and chemical parameters. High variation of

Институт животноводства УААН, г. Харьков

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

* Адрес для корреспонденции: п/в Кулинич, Харьковский район, Харьковская область, Украина, 62404; тел.: (+38057) 740-31-66, электронная почта: lab_cryo@ukr.net

* Address for correspondence: PO Kulinichi, Kharkov region, Ukraine 61480; tel.: +380 57 740 3166; e-mail: lab_cryo@ukr.net

ния задачи воспроизводимости результатов эксперимента основанного на оптимизации множества взаимосвязанных биологических и физико-химических параметров. Высокая вариация параметров, влияющих на сохранность деконсервированного объекта, является основной причиной низкого уровня воспроизводимости результатов эксперимента. Коэффициент вариации жизнеспособности деконсервированных черенков растений достигает 100%. Следовательно, для получения достоверных результатов необходимо неоднократное повторение опытов, что требует большого расхода биологического материала [4].

Для проведения полного факторного криобиологического эксперимента необходимо несколько десятков тысяч проб $N = n \times h^g$ [5], поскольку количество проб (черенков) в одном опыте составляет $n \geq 30$, исследуемых факторов – $h \geq 4$ при уровне их градации $g \geq 5$. Последовательное оптимизирование технологических параметров на каждом этапе криоконсервирования биообъекта дает возможность уменьшить их число. Выявление значимых факторов на основе дисперсионного или регрессионного анализа уменьшает их число до $h = 3 \pm 2$ [4, 5]. Количество градаций при градиентном поиске оптимальных значений исследуемых факторов сокращается до $g = 3 \pm 1$ [4, 5]. Многократное уменьшение количества проб ($n < 30$) осуществляется за счет учета индивидуальных свойств биообъекта и повышения эффективности его использования в процессе исследования.

Повышение воспроизводимости результатов сохранности черенков растений связано с необходимостью исследования свойств биообъекта, обусловленных его видом и сортом. Следовательно, изучение закономерностей воспроизводимости результатов криоконсервирования меристимальных клеток является актуальной задачей, решение которой создает условия для проведения многофакторного исследования при небольшом количестве повторов опыта, что позволяет научно обосновывать новые подходы к созданию эффективных способов криоконсервирования. Поэтому для сохранения генофонда клеток растений необходимо изучить воспроизводимость результатов криоконсервирования черенков различных сортотипов и определить оптимальные значения варьируемых параметров, обеспечивающих максимальную жизнеспособность деконсервированных образцов.

Цель работы – исследовать влияние вида и сорта плодовых культур (яблони и груши) на воспроизводимость результатов, полученных на различных этапах криоконсервирования черенков.

Материалы и методы

Объектом исследования были черенки яблони (*Malus domestica* L.): Белый налив, Амулет, Эдэра,

the parameters, affecting an integrity of frozen-thawed object is basic cause of low level reproducibility of experimental results. Coefficient of viability variation of frozen-thawed plant cuttings achieves 100%. Therefore for obtaining the significant results the multiple replication of experiments is necessary, that causes a high expenditure of a biological material [4].

To perform a complete factor cryobiological experiment some dozens of samples' thousands $N = n \times h^g$ [5] are needed, whereas the number of samples (cuttings) in one experiment makes $n \geq 30$, the one of the studied factors is $h \geq 4$ and at their gradation level of $g \geq 5$. Serial optimization of the technological parameters at each stage of bioobject cryopreservation allows the reduction of their number. Exposure of significant factors based on dispersion and regression analysis reduces their number down to $h = 3 \pm 2$ [4,5]. Gradation number at gradient search of the optimal values for the studied factors is reduced down to $g = 3 \pm 1$ [4,5]. Multiple decrease of the samples' number ($n < 30$) is implemented due to taking into account of individual properties of bioobject and increase of its application efficiency during the research.

Increase of the results' reproducibility of integrity of plant cuttings is associated with the need of studying the bioobject's properties, stipulated by its species and variety. Therefore the study of reproducibility regularities of meristem cell cryopreservation results is the actual problem, the solving of which creates the conditions to perform the multifactor research at a few amount of the experiment repeats, enabling to prove scientifically new approaches of development of effective cryopreservation methods. Thus, for preserving the plant cell gene bank it is necessary to study the reproducibility of cryopreservation results of different variety cuttings and determine optimal values of varied parameters, providing maximal viability of frozen-thawed samples.

The research aim was to study the effect of fruit species and variety (apple and pear) on reproducibility of the results, obtained at different stages of cryopreservation of the cuttings.

Materials and methods

The research objects were the apple (*Malus domestica* L.) cuttings such as: Belyi Naliv, Amulet, Edera, Teremok, Radost, Katya; pear summer cuttings as: Velyka Litnya, Ulyublena Klapa, autumn are Gorodischenska, Vdala and winter are Bere Kyivska and Zelena Mliyivska.

The cuttings were cut from one year shoots and divided into separated samples (by 10 pieces) of 10–12 cm length and 0.8–1.0 cm diameter. The cuttings had from 2 to 5 vegetative buds. Prior to carrying-out the research the viability and initial humidity of samples were examined. For the research the samples with the viability not less than 100% were chosen.

Теремок, Радость, Катя; черенки груши (*Pyrus communis* L.): летней – Велика літня, Улюблена Клапа, осеней – Городищенська, Вдала, зимней – Бере Київська, Зелена Мліївська.

Черенки нарезали из однолетних побегов и делили на отдельные образцы (по 10 штук) длиной 10–12 см, диаметром 0,8–1,0 см. Черенки имели 2–5 вегетативных почек. Перед проведением исследования проверяли жизнеспособность и начальную влажность образцов. Для работы отбирали образцы с жизнеспособностью не менее 100%.

Влажность образцов η (%) определяли взвешиванием до и после криоконсервирования 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.

Влажность черенков изменяли с 50 до 30%, выдерживая их в холодильнике при температуре -5 ± 2 и $-10 \pm 2^\circ\text{C}$ от 14 до 60 суток.

Разные скорости замораживания-отогрева, необходимые для криоконсервирования черенков, получали следующим способом. Для регулирования скорости охлаждения термостатирующего устройства изменяли напряжение с 0 до 25 В и сопротивление нагревательного элемента 30 и 70 Ом. Ступенчатое охлаждение проводили со скоростью 0,01–0,1 $^\circ\text{C}/\text{ч}$ в диапазоне температур $-5\dots-30^\circ\text{C}$ с интервалом 5°C и выдержкой 1, 3 и 7 суток соответственно. Образцы помещали в бытовые термосы ёмкостью 1,5 и 2 л, и переносили в рефрижераторы. Охлажденные черенки до -30°C погружали в жидкий азот со скоростью 600–800 $^\circ\text{C}/\text{мин}$.

Образцы отогревали со скоростью 70 $^\circ\text{C}/\text{мин}$ при температуре воздуха 20 $^\circ\text{C}$ или со скоростью 1–3 $^\circ\text{C}/\text{мин}$ при 5 $^\circ\text{C}$.

Жизнеспособность черенков контролировали после каждого этапа криоконсервирования. Для гидратации образцы помещали в эксикатор, располагая их над дистиллированной водой, и выдерживали 12 суток при температуре 5 $^\circ\text{C}$, а затем проращивали в условиях *in vitro* (в стаканах с водой при 20 $^\circ\text{C}$). Набухание и развитие почек свидетельствовали о жизнеспособности исследуемого образца. Процент жизнеспособности образца оценивали по отношению количества черенков с раскрытыми почками в условиях *in vitro* к общему их количеству в образце.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента-Фишера [4]. Индивидуальные особенности биологического объекта учитывали по усредненной разности жизнеспособности черенков на заданном и предшеств-

ующем. Влажность образцов η (%) была определена по весу до и после криоконсервирования и рассчитана 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.

Влажность образцов была изменена с 50 до 30%, выдерживая их в холодильнике при температуре -5 ± 2 и $-10 \pm 2^\circ\text{C}$ от 14 до 60 суток.

Разные скорости замораживания-отогрева, необходимые для криоконсервирования образцов, получали следующим способом. Для регулирования скорости охлаждения термостатирующего устройства изменяли напряжение с 0 до 25 В и сопротивление нагревательного элемента 30 и 70 Ом. Ступенчатое охлаждение проводили со скоростью 0,01–0,1 $^\circ\text{C}/\text{ч}$ в диапазоне температур $-5\dots-30^\circ\text{C}$ с интервалом 5°C и выдержкой 1, 3 и 7 суток соответственно. Образцы помещали в бытовые термосы ёмкостью 1,5 и 2 л и переносили в рефрижераторы. Охлажденные образцы до -30°C погружали в жидкий азот со скоростью 600–800 $^\circ\text{C}/\text{мин}$.

Образцы отогревали со скоростью 70 $^\circ\text{C}/\text{мин}$ при температуре воздуха 20 $^\circ\text{C}$ или со скоростью 1–3 $^\circ\text{C}/\text{мин}$ при 5 $^\circ\text{C}$.

Жизнеспособность образцов контролировали после каждого этапа криоконсервирования. Для гидратации образцы помещали в эксикатор, располагая их над дистиллированной водой, и выдерживали 12 суток при температуре 5 $^\circ\text{C}$, а затем проращивали в условиях *in vitro* (в стаканах с водой при 20 $^\circ\text{C}$). Набухание и развитие почек свидетельствовали о жизнеспособности исследуемого образца. Процент жизнеспособности образца оценивали по отношению количества образцов с раскрытыми почками в условиях *in vitro* к общему их количеству в образце.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента-Фишера [10]. Индивидуальные особенности биологического объекта были учтены по усредненной разности жизнеспособности образцов на заданном и предшествующем. Влажность образцов η (%) была определена по весу до и после криоконсервирования и рассчитана по формуле:

Results and discussion

Optimization of technological parameters for each apple and pear variety was carried out stepwise: the temperature adaptation was -10°C and cooling down to -30°C and -196°C . Maximal indices of samples' viability of the studied varieties were obtained due to their temperature adaptation (-10°C) during 14–60 days and stepwise cooling with 0.1–0.5 $^\circ\text{C}/\text{hr}$ under $-10\dots-30^\circ\text{C}$ (exposure of 3–7 days), following direct plunging into liquid nitrogen, storage from 1 to 30 days and thawing with 70 $^\circ\text{C}/\text{min}$ rate. The exposure term

вующем этапах криоконсервирования [4], а для устранения этих особенностей использовали усредненное отношение их жизнеспособности при оценке эффективности этапа [3].

Результаты и обсуждение

Оптимизацию технологических параметров для каждого сорта яблоки и груши проводили поэтапно: температурная адаптация -10°C ; охлаждение до -30°C и -196°C . Максимальные показатели жизнеспособности образцов исследуемых сортов получены в результате их температурной адаптации (при -10°C) в течение 14–60 суток, ступенчатого охлаждения со скоростью $0,1-0,5^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ от температуры -10 до -30°C (выдержка 3–7 суток), последующего прямого погружения в жидкий азот, хранения в течение 1–30 суток, отогрева со скоростью $70^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Длительность выдержки образцов при температуре -10°C определяли по показателю влажности, который для яблоки и груши должен быть не ниже 30% [2, 6, 8].

Полученные результаты показывают, что жизнеспособность деконсервированных черенков зависит от сорта: у яблоки она отличается более чем в 4 раза, груши – в 10 раз (табл. 1). Для разных сортов яблоки разброс значений жизнеспособности деконсервированных образцов, содержащих 10 черенков в каждом, составил от 0 до 100%. Анализ проб, состоящих из 5 образцов, полученный на разных этапах криоконсервирования, проводили с помощью критерия Стьюдента. В пределах одного вида средние показатели для разных сортов яблоки отличаются на 32%, груши – 86% (табл. 1). Достоверность различия анализируемых сортов установлена в 3 группах яблоки и 4 группах груши при уровне надежности $P \geq 0,95$. При использовании показателя, усредняющего изменение жизнеспособности ΔM (табл. 1), ошибка среднеквадратического отклонения m в среднем уменьшилась в 1,5 раза, что дало возможность повысить надежность результатов достоверности различия сравниваемых значений до уровня $P \geq 0,99$.

С помощью двухфакторного дисперсионного анализа [4] при использовании средней величины M определили, что жизнеспособность деконсервированных черенков яблоки зависит только от способа криоконсервирования. Сила влияния η^2_A (отношение выделенной дисперсии к общей) [4], обусловленная индивидуальными свойствами биообъекта (сортом), составила 0,07, тогда как технологического (процедура криоконсервирования) $\eta^2_B = 0,82$ при уровне надежности полученных результатов $P \geq 0,95$. Совместное воздействие указанных факторов определило силу влияния $\eta^2_{AB} = 0,07$, а неучтенных факторов $\eta^2_Z = 0,06$. По показателю разности ΔM сила влияния биологического фактора $\eta^2_A = 0,02$,

for the samples under -10°C was determined according to humidity index, not to be less than 30% for apple and pear [2, 6, 8].

The findings show that viability of frozen-thawed cuttings depends on variety, for apple it differs more than in 4 times and 10 times for pear (Table 1). For different apple varieties the range of viability values of the frozen-thawed samples, containing 10 cuttings each made from 0 to 100%. The analysis of tests, consisting of 5 samples, obtained at different cryopreservation stages was carried out with the Student's criterion. Within one species the mean indices for different apple varieties differ by 32% and pear by 86% (Table 1). The significance of difference of the analysed varieties was established in 3 apple groups and 4 pear ones at the integrity level of $P \geq 0.95$. When using the index, smoothing the viability change ΔM (Table 1) the error in standard deviation m in average reduced in 1.5 times that allowed the possible increase in the reliability of the results of difference statistical significance of the compared values up to the level of $P \geq 0.99$.

With two-factor dispersion analysis [4] and mean value M there was determined that viability of frozen-thawed apple cuttings depended only on cryopreservation method. Power effect of η^2_A (relation of detailed dispersion to total) [4] due characteristic properties of bioobject (variety) made 0.07, whereas technologic η^2_B (cryopreservation procedure) did 0.82 at the integrity level of the findings $P \geq 0.95$. Combined influence of the mentioned factors determined the effect power η^2_{AB} as 0.07 and not considered ones η^2_Z as 0.06. According to the difference index ΔM it has been found that effect power of biological factor η^2_A was 0.02, technological η^2_B was 0.49, their combined effect η^2_{AB} 0.38 and not considered factors η^2_Z made 0.12 at $P \geq 0.95$. Therefore when coming to the mean difference ΔM the combined effect of biological and technologic parameters has the effect power similar to cryogenic one.

During cryopreservation of pear cuttings the significant difference in 4 groups for the six studied varieties was obtained (Table 1). When coming to the difference mean ΔM the error in standard deviation m decreases approximately in 1.5 times. The effect power of biological factor made 0.10 and 0.11, technologic did 0.68 and 0.24, and their combined effect did 0.16 and 0.59 when using the absolute indices M and their difference ΔM , accordingly ($P \geq 0.95$).

Analysis of reproducibility of apple cuttings' viability indices carried out with C_v variation coefficient has shown that during cryopreservation from 1st to 3rd stages this index changes for the apple varieties as: 9–32% for Radost; 8–81% for Teremok; 14–105% for Belyy Naliv; 36–91% for Sprint and up to 40% for Katya; pear varieties as: 10–26% for Velyka

Таблица 1. Жизнеспособность черенков различных сортов яблони и груши, оцененная на разных этапах криоконсервирования

Table 1. Viability of cuttings of different apple and pear varieties, evaluated at different cryopreservation stages

Растения Plant		Жизнеспособность М (%) и изменение жизнеспособности ΔМ (%) черенков после охлаждения до температуры Viability M (%) and changes in viability ΔM (%) of cuttings after cooling down to the temperature of					
Вид Species	Сорт Variety	– 10°C		– 30°C		– 196°C	
		ΔМ±m	М±m	ΔМ±m	М±m	ΔМ±m	М±m
Яблоня Apple	Радость Radost	8,0 ± 3,7	92,0 ± 3,7	40,0 ± 0	52,0 ± 3,7	16,0 ± 2,4	36,0 ± 5,1 ^a
	Теремок Teremok	10,0 ± 3,2 ^a	90,0 ± 3,2 ^a	42,0 ± 2,0 ^a	48,0 ± 3,7	26,0 ± 5,1 ^a	22,0 ± 8,0
	Белый налив Belyi Naliv	30,0 ± 4,5 ^b	70,0 ± 4,5 ^b	18,0 ± 2,0 ^b	52,0 ± 3,7 ^a	44,0 ± 2,4 ^b	8,0 ± 3,7 ^b
	Спринт Sprint	54,0 ± 7,5 ^c	46,0 ± 7,5 ^c	40,0 ± 5,5 ^c	6,0 ± 2,4 ^b	6,0 ± 2,4 ^c	0,0 ± 0,0 ^c
	Катя Katya	60,0 ± 7,1	40,0 ± 7,1	40,0 ± 7,1	0,0 ± 0,0 ^c	0,0 ± 0,0 ^d	0,0 ± 0,0
	Амулет Amulet	62,0 ± 7,3	38,0 ± 7,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	Эдэра Edera	74,0 ± 8,4	26,0 ± 8,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Груша Pear	Велика Літня Velyka Litnya	6,0 ± 4,0	94,0 ± 4,0	14 ± 4	80,0 ± 7,1	6,0 ± 2,4 ^a	74,0 ± 8,7
	Улюблена Клапа Ulyublena Klapa	10,0 ± 3,2	90,0 ± 3,2	8,0 ± 3,7	82,0 ± 5,8	54,0 ± 2,4 ^b	28,0 ± 7,3 ^b
	Вдала Vdala	6,0 ± 2,4	94,0 ± 2,4	2,0 ± 2,0 ^a	92,0 ± 2,0 ^a	6,0 ± 2,4 ^a	86,0 ± 4,0 ^a
	Зелена Мліївська Zelena Mliivska	12,0 ± 3,7 ^a	88,0 ± 3,7	16,0 ± 5,1 ^b	72,0 ± 8,6 ^b	64,0 ± 5,1 ^c	8,0 ± 3,7 ^c
	Бере Київська Bere Kyivska	46,0 ± 4,0 ^b	86,0 ± 4,0 ^a	82,0 ± 2,0 ^c	4,0 ± 2,4 ^c	4,0 ± 2,4 ^d	0,0 ± 0,0 ^d
	Городищенська Horodyschenska	54,0 ± 7,5	46,0 ± 7,5 ^b	40,0 ± 5,5 ^d	6,0 ± 2,4	6,0 ± 2,4	0,0 ± 0,0

Примечания: *m* – ошибка среднеекватрического отклонения; *n* ≥ 50 – количество черенков в каждой пробе; охлаждение до –30°C со скоростью 0,1°C/ч; замораживание 600–800°C/мин с погружением в жидкий азот; отогрев 70°C/мин; разными суперскриптами *a, b, c, d* обозначены значения, имеющие достоверность различия с уровнем надежности *P* ≥ 0,95, в пределах каждого столбца и вида растения.

Notes: *m* – error in standard deviation; *n* ≥ 50 – number of cuttings in each sample; cooling down to –30°C with 0.1°C/hr rate; freezing 600–800°C/min with plunging into liquid nitrogen; thawing 70°C/min. Values with significant differences of *P* ≥ 0.95 integrity level, within the ranges of each column and plant species are denoted with *a, b, c, d* superscripts.

технологического $\eta^2_B - 0,49$, их совместного влияния $\eta^2_{AB} - 0,38$, а неучтенных факторов $\eta^2_z - 0,12$ при *P* ≥ 0,95. Следовательно, при переходе к показателям разности средних ΔМ совместное действие биологических и технологических параметров оказывает силу влияния, сопоставимую с криогенным воздействием.

При криоконсервировании черенков груши получено достоверное различие в четырех группах из шести исследуемых сортов (табл. 1). При переходе к показателю разности средних ΔМ ошибка среднеекватрического отклонения *m* уменьшается приблизительно в 1,5 раза. Сила влияния биологического фактора составила 0,10 и 0,11, технологичес-

Litnya; 8–59% for Ulyublena Klapa; 6–10% for Vdala; 10–105% for Zelena Mliivska; 10–137% for Bere Kiiivska; 36–91% for Gorodischenska (Table 2). To reduce the effect of individual properties of biological object when estimating the efficiency of cryopreservation stages there was used the index, calculated as the ratio of bioobject viability after implementing of the set operation and prior to it.

When coming to the relative index, the efficiency of cryopreservation stage *W* the reproducibility of the results increased in 1.5 times in average. Exceptions are the data, obtained for cuttings' viability lower than 10%. These indices of cuttings' cryopreservation efficiency were obtained for the apple varieties as: 68%

Таблица 2. Эффективность этапов криоконсервирования черенков различных сортов яблони и груши

Table 2. Efficiency of cryopreservation stages of different apple and pear variety cuttings

Растения Plant		Эффективность этапа криоконсервирования W (%) при температуре Efficiency of cryopreservation stage W (%) at temperature of					
Вид Species	Сорт Variety	– 10°C		– 30°C		– 196°C	
		$W \pm m$	C_v	$W \pm m$	C_v	$W \pm m$	C_v
Яблоня Apple	Радость Radost	92,0 ± 3,7	9	56,2 ± 1,8	6 (16)	68,0 ± 6,2a	20 (32)
	Теремок Teremok	90,0 ± 3,2 ^a	8	53,1 ± 2,7 ^a	9 (17)	42,3 ± 14,3	76 (81)
	Белый налив Belyi Naliv	70,0 ± 4,5 ^b	14	74,3 ± 2,7 ^b	8 (16)	14,0 ± 6,4 ^b	102 (105)
Груша Pear	Велика Літня Velyka Litnya	94,0 ± 4,0	10	84,6 ± 4,6	12 (20)	91,6 ± 3,5 ^a	9 (26)
	Улюблена Клапа Ulyublena Klapa	90,0 ± 3,2	8	90,8 ± 4,2	10 (16)	32,5 ± 6,5 ^b	45 (59)
	Вдала Vdala	94,0 ± 2,4	6	98,0 ± 2,0	5 (5)	93,3 ± 2,7 ^a	7 (10)
	Зелена Мліївська Zelena Mliivivska	88,0 ± 3,7	10	80,8 ± 6,4	18 (27)	9,4 ± 4,0 ^c	96 (105)

Примечания: охлаждение до –30°C со скоростью 0,1°C/ч; замораживание 600–800°C/мин с погружением в жидкий азот; отогрев 70°C/мин; разными суперскриптами *a, b, c, d* обозначены значения, имеющие достоверность различия с уровнем надежности $P \geq 0,95$, в пределах каждого столбца и вида растения; W – эффективность, отношение жизнеспособности биообъекта, оцененной на заданном этапе, к жизнеспособности на предшествующем; C_v – коэффициенты вариации показателя эффективности технологического этапа и жизнеспособности (в скобках) – $V(C_v)$.

Notes: cooling down to –30°C with 0.1°C/hr rate; freezing 600–800°C/min with plunging into liquid nitrogen; thawing 70°C/min. Values with significant differences of $P \geq 0.95$ integrity level, within each column and plant species are denoted with *a, b, c, d* superscripts; W – efficiency, ratio of bioobject viability, evaluated at the set stage to viability at previous one; C_v – variation coefficient of technologic stage efficiency index, viability in brackets – $V(C_v)$.

кого – 0,68 и 0,24, их совместного воздействия – 0,16 и 0,59 при использовании абсолютных показателей M и их разности ΔM соответственно при $P \geq 0,95$.

Анализ воспроизводимости показателей жизнеспособности черенков яблони, проведенный при помощи коэффициента вариации C_v , показал, что в процессе криоконсервирования с первого до третьего этапов этот показатель изменяется для сортов яблонь: Радость – 9–32%, Теремок – 8–81%, Белый налив – 14–105%, Спринт – 36–91% и Катя – до 40%; сортов груши: Велика Літня – 10–26%, Улюблена Клапа – 8–59%, Вдала – 6–10%, Зелена Мліївська – 10–105%, Бере Київська – 10–137%, Городищенська – 36–91% (табл. 2). Для уменьшения влияния индивидуальных свойств биообъекта при оценке эффективности этапов криоконсервирования использовали показатель, вычисленный как отношение жизнеспособности биообъекта после выполнения заданной операции и до неё.

При переходе к относительному показателю – эффективности этапа криоконсервирования W воспроизводимость результатов увеличилась в среднем в 1,5 раза. Исключением являются данные, полученные для жизнеспособности черенков ниже 10%. Показатели эффективности криоконсервирования черенков сортов яблони составили: Радость –

for Radost, 42% for Teremok, 14% for Belyy Naliv; pear varieties as: 92% for Velyka Litnya, 33% for Ulyublena Klapa, 93% for Osinnya Vdala, 9% for Zelena Mliivska.

Under dispersion analysis when using the relative indices the results close to absolute ones were obtained. The effect power of biological factor for apple made 0.11 and for pear did 0.12; technologic one was 0.69 and 0.65; combined one made 0.12 and 0.19, correspondingly (at $P \geq 0.95$).

The analysis of frozen-thawed cuttings' viability of different apple and pear varieties has shown that within the ranges of one species the mean indices for different varieties of apple differ by 36 and pear by 74% and those for cryopreservation efficiency by 68 and 93%, correspondingly. Specific difference of apple and pear cuttings affects viability of frozen-thawed bioobject if compared with the variety one. Significant difference of efficiency indices obtained for different species and varieties of cuttings is explained with a combined effect of individual properties of biological object and the chosen cryopreservation method.

Due to taking into account the variety features with a viability difference index prior to and after the set procedure of cuttings' cryopreservation of different

68%, Теремок – 42%, Белый налив – 14%; сортов груши Велика Літня – 92%; Улюблена Клапа – 33%, Осіння Вдала – 93%, Зелена Мліївська – 9%.

При дисперсионном анализе с использованием относительных показателей получены результаты, близкие к абсолютным. Сила влияния биологического фактора для яблони составляет 0,11 и груши – 0,12; технологического – 0,69 и 0,65; совместного – 0,12 и 0,19 соответственно при $P \geq 0,95$.

Анализ жизнеспособности деконсервированных черенков различных сортов яблони и груши показал, что в пределах одного вида средние показатели для разных сортов яблони отличаются на 36, груши – на 74%, а показатели эффективности криоконсервирования – на 68 и 93% соответственно. Видовое различие черенков яблони и груши оказывает большее влияние на жизнеспособность деконсервированного биообъекта, чем сортовое. Существенное различие показателей эффективности, полученное для разных видов и сортов черенков, объясняется совместным влиянием индивидуальных свойств биообъекта и выбранного способа криоконсервирования.

В результате учета сортовых особенностей с помощью показателя разности жизнеспособности до и после заданной процедуры криоконсервирования черенков различных сортов яблони и груши установлено, что индивидуальные свойства биообъекта влияют на результаты опытов, как и процедура криоконсервирования. Сила влияния биологического и технологического факторов на жизнеспособность деконсервированного объекта для выбранного способа криоконсервирования практически одинакова.

Таким образом, жизнеспособность деконсервированных черенков растений зависит от их сорта и способа криоконсервирования. Повышение воспроизводимости результатов криоконсервирования черенков яблони и груши в среднем в 1,5 раза основано на использовании показателей, отражающих изменение жизнеспособности биообъекта в результате выполнения заданной операции. Использование разности абсолютных показателей жизнеспособности и их отношения позволили уменьшить количество используемых биообъектов в 2 раза [4]. По разности показателей жизнеспособности можно оценить влияние индивидуальных свойств исследуемого биообъекта, а по их отношению – устранить данное воздействие при оценке эффективности технологической операции. На основе результатов проведенных исследований был предложен способ криоконсервирования черенков различных сортов яблони и груши, позволяющий длительно хранить замороженные образцы при температуре жидкого азота.

apple and pear varieties it has been established that individual properties of bioobject affect the experimental results as well as the cryopreservation procedure. The power effect of biological and technologic factors renders practically the same effects on viability of frozen-thawed object as the selected cryopreservation method.

Thus, the viability of frozen-thawed plant cuttings depends on their variety and cryopreservation method. For increasing the reproducibility of apple and pear cuttings' cryopreservation results in average in 1.5 times there are used the parameters, reflecting the change of bioobject's viability due to performing the set operation. Use of the difference in viability absolute indices and their ratio enabled the two-fold reduction of a number of the used bioobjects [4]. According to the difference in viability indices one may estimate the effect of individual properties of the used bioobject and according to their relation to eliminate this effect when assessing the efficiency of a technologic operation. Due to the research findings, the cryopreservation method of different apple and pear varieties, enabling to store for a long period the frozen samples under liquid nitrogen temperature has been proposed.

Conclusions

1. Maximal viability indices of the studied varieties of frozen-thawed apple and pear cuttings were obtained due to their temperature adaptation under -10°C during 14–60 days, stepwise cooling of the samples with $0.1\text{--}0.5^{\circ}\text{C/hr}$ down to -30°C (exposure 3–7 days), direct plunging into liquid nitrogen, storage during 1–30 days and thawing with rate of 70°C/min .

2. Development probability of apple and pear frozen-thawed cuttings depends on their variety and cryopreservation method. Species difference of apple and pear cuttings twice more affects the viability of frozen-thawed bioobject, if compared with the variety one. Selection of apple and pear cuttings' variety as well as the cryopreservation method determine the experimental results' reproducibility. Efficiency of the proposed cryopreservation method for apple and pear cuttings depends on their variety.

References

1. Verzhuk V.G., Philippenko G.I., Tikhonova N.G., Zhestkov A.S. Cryopreservation methods of fruit cultures gene plasma by the example of currant berry, honeyberry and gooseberry// *Biofizika Zhivoy Kletki.*– 2008.– Vol. 9.– P. 35–36.
2. Gorbunov L.V., Shiyanova T.P. Cryopreservation of fruit-berry culture cuttings// *Problems of Cryobiology.*– 2009.– Vol. 19, N3.– P. 147–154.
3. Gorbunov L.V., Bugrov A.D., Gorbunova N.I. Methods of efficiency evaluation of performing biotechnological operations,

Выводы

1. Максимальные показатели жизнеспособности исследуемых сортов деконсервированных черенков яблони и груши получены в результате их температурной адаптации при -10°C в течение 14–60 суток, ступенчатого охлаждения образцов со скоростью $0,1-0,5^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ до -30°C (выдержка 3–7 суток), прямого погружения в жидкий азот, хранения в течение 1–30 суток и отогрева со скоростью $70^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

2. Вероятность развития деконсервированных черенков яблони и груши зависит от их сорта и способа криоконсервирования. Видовое отличие черенков яблони и груши оказывает в 2 раза большее влияние на жизнеспособность деконсервированного биообъекта, чем сортовое. Выбор сорта черенков яблони и груши, как и способ криоконсервирования, определяют воспроизводимость результатов опытов. Эффективность предложенного способа криоконсервирования черенков яблони и груши зависит от их сорта.

- associated with cryopreservation of spermatozoa and mammalian embryos // *Visnyk Bilotserkovskogo Derzh. Agrarn. Univ.*– 2000.– Vol. 3, N14.– P. 178–183.
4. *Lakin B.F.* Biometry.– Moscow: Vysshaya shkola, 1990.– 254 p.
 5. *Research methods and organization of experiments!* Ed. by K.P. Vlasov.– Kharkov: Gumanitarnyy tsestr, 2002.– 256 p.
 6. *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
 7. *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.
 8. *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

Литература

1. *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, №5.– С. 35–36.
2. *Горбунов Л.В., Шиянова Т.П.* Криоконсервирование черенков плодово-ягодных культур // *Пробл. криобиологии.*– 2009.– Т. 19, №3.– С. 338–348.
3. *Горбунов Л.В., Бугров А.Д., Горбунова Н.И.* Спосіб оцінки ефективності проведення біотехнологічних операцій, які пов'язані з криоконсервацією сперматозоїдів та ембріонів ссавців // *Вісник Білоцерківського держ. аграр. ун-ту.*– 2000.– Т. 3, №14.– С. 178–183.
4. *Лакін Б.Ф.* Биометрия.– М.: Высш. шк., 1990.– 254 с.
5. *Методы исследований и организация экспериментов!* Под ред. К.П. Власова.– Харьков: "Гуманитарный центр", 2002.– 256 с.
6. *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
7. *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.
8. *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
Рецензент Т.Ф. Стрибуль*