

# МЕТОДЫ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ВЕГЕТАТИВНО РАЗМНОЖАЕМЫХ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ (ОБЗОР)

Ухатова Ю. В.<sup>1</sup>, Гавриленко Т. А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова (ВИР), 190000, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, д. 42, 44,

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, 199004, Россия Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7/9  
e-mail: tatjana9972@yandex.ru

Данная статья представляет собой обзор методов криоконсервации, используемых для создания криоколлекций генетических ресурсов растений. Методы криоконсервации для долгосрочного сохранения генофонда вегетативно размножаемых культурных растений стали использоваться относительно недавно. Около 60 лет назад были разработаны первые методы программного (медленного) замораживания растительных объектов, к более современным относятся методы быстрого замораживания: инкапсуляции-дегидратации, витрификации, инкапсуляции-витрификации, дроплет-метод, дроплет-витрификации. Все эти методы применяются для криоконсервации образцов полевых генбанков и образцов из *in vitro* коллекций. В обзоре рассмотрены основные факторы, определяющие жизнеспособность и регенерационную способность эксплантов после замораживания-оттаивания. Наибольшее влияние на эффективность посткриогенного восстановления эксплантов оказывают: способ предобработки исходных микрорастений, тип экспланта, тип криопротекторов, длительность обработки эксплантов криопротекторами, состав питательной среды для посткриогенного восстановления, а также генотипические особенности образцов. В обзоре обсуждаются регламенты формирования и пополнения коллекций в криобанках. Приведены данные о наиболее крупных криоколлекциях образцов вегетативно размножаемых культурных растений.

**Ключевые слова:** криоконсервация, генетические ресурсы растений, криоколлекции.

Прозрачность финансовой деятельности:  
авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.  
Конфликт интересов отсутствует

Ухатова Ю.В., Гавриленко Т.А. Методы криоконсервации вегетативно размножаемых культурных растений. Биотехнология и селекция растений. 2018; 1(1):52-63. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-52-63

Ukhatova Y. V., Gavrilenko T. A. Cryoconservation methods for vegetatively propagated crops (review). Plant Biotechnology and Breeding. 2018; 1(1):52-63. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-52-63

## CRYOCONSERVATION METHODS FOR VEGETATIVELY PROPAGATED CROPS (REVIEW)

Ukhatova Y. V.<sup>1</sup>, Gavrilenko T. A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42-44, Bolshaya Morskaya St., St. Petersburg, 190000, Russia  
<sup>2</sup> St. Petersburg State University, 7/9, Universitetskaya naberezhnaya, St. Petersburg, 199034, Russia  
e-mail: tatjana9972@yandex.ru

This article presents a review of cryopreservation methods used to create cryocollections of plant genetic resources. The application of cryopreservation methods for the long-term conservation of the vegetatively propagated crops started relatively recently. About 60 years ago, the first methods of programmable (slow) freezing of plant objects were developed. The modern methods include such fast freezing techniques as encapsulation-dehydration, vitrification, encapsulation-vitrification, droplet-method, and droplet-vitrification. These methods are used for cryopreservation of accessions from the field genbanks and samples from *in vitro* collections. The review considers the main factors determining the viability and regeneration rates of explants after freezing-re-warming. The greatest impact on the efficiency of post-cryogenic explants recovery is provided by such factors as the method of the initial microplants pre-treatment, explant and cryoprotectant type, duration of the explant treatment with cryoprotectants, the composition of the nutrient medium for the post-cryogenic recovery, and the accession genotypic characteristics. The review discusses the rules for the collections formation and cryobanking development. The data on the largest cryocollections of cultivated plant species are presented.

УДК: 635.21:57.043  
Поступила в редакцию 07.09.2018  
Принята к публикации 08.11.2018

Криоконсервация растений представляет собой процесс подготовки клеток, тканей и органов к погружению в жидкий азот, замораживание эксплантов, сохранение растительного материала при сверхнизких температурах без потерь жизнеспособности и регенерационной способности эксплантов и размораживание растительного материала.

В настоящее время для криоконсервации растений используется жидкий азот ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) и его пары ( $-183 \dots -185^{\circ}\text{C}$ ) (Verzhuk et al., 2009). Известны единичные работы по использованию температур  $-200^{\circ}\text{C}$ ,  $-250^{\circ}\text{C}$ ,  $-272,9^{\circ}\text{C}$  (Tumanov et al., 1959), при этом растительный материал длительно сохраняется в криобанках при температуре не выше  $-135^{\circ}\text{C}$  (Martinez-Montero, Harding, 2015).

Для оценки эффективности криоконсервации эксплантов наиболее часто используют два показателя:

- «жизнеспособность» (viability rate) или «выживаемость» (survival rate) (Kaczmarczyk et al., 2008, 2012; Panta et al., 2014);

- «регенерационная способность после оттаивания» (regeneration percentages after rewarming) (Kaczmarczyk et al., 2008) или «способность к посткриогенной регенерации побегов» (post-thawed recovery, recovery after cryopreservation) (Vysotskaya, Popov, 2005; Towill, Ellis, 2008; Panta et al., 2014).

Наиболее часто в криобиологии растений используются оба показателя одновременно. Все авторы отмечают положительную корреляцию между показателями жизнеспособности и регенерационной способности эксплантов после оттаивания (Reed, 2008; Kaczmarczyk et al., 2008, 2011; Shvachko, 2012; Panta et al., 2014; Ukhatova et al., 2017a; Ukhatova et al., 2017b). Однако, несмотря на положительную корреляцию, учет только жизнеспособных эксплантов может сильно завышать реальную эффективность криоконсервации (Panta et al., 2014; Engelman, 2014). Число жизнеспособных эксплантов указывает на степень криоповреждений, возникших при криоконсервации. Тогда как регенерационная способность характеризует процесс восстановления роста и развития эксплантов после оттаивания.

Криоповреждения клеток обусловлены в основном двумя факторами: во-первых, формированием и ростом внутриклеточных кристаллов льда (при быстром замораживании) или образованием кристаллов льда в межклеточном пространстве (при медленном замораживании), во-вторых, процессами рекристаллизации при последующем оттаивании (Steponkus, 1984; Sakai et al., 1990; Belous, Grishchenko, 1994; Benson, 2004; Popov, 1993, 2008).

Для успешного замораживания растительных органов и тканей содержание свободной воды в клетках должно быть снижено до 20–30% (Panis, Lambardi, 2005), поскольку при этом повышается вязкость цитозоля, которая препятствует образованию кристаллов льда, способных вызывать необратимые повреждения внутриклеточных мембран (Steponkus, 1984; Sakai et al., 1990; Popov, 1993; Belous, Grishchenko, 1994).

## Методы криоконсервации

Методы криоконсервации включают ряд последовательных этапов: (1) подготовка растительного материала, (2) изоляция эксплантов, (3) обработка эксплантов криопротекторами, (4) замораживание эксплантов в жидком азоте и криохранилище, (5) оттаивание и (6) учет жизнеспособности и регенерационной способности.

Выделяют три типа криопротекторов по проникающей способности и функциям (Sakai et al., 1990, 2008; Belous, Grishchenko, 1994; Benson, 2008):

- непроникающие через клеточную стенку (ПЭГ<sub>6000</sub>, ПВП, полисахариды и белки) – создают защиту от механических повреждений, поскольку концентрируются в межклеточном пространстве и снижают скорость роста кристаллов льда;

- проникающие только через клеточную стенку (олигосахариды, пролин, ПЭГ<sub>1000</sub>) – предотвращают повреждение мембраны растущими кристаллами льда и защищают цитоплазму от излишней дегидратации;

- проникающие через клеточную стенку и мембрану клетки (ДМСО, глицерол, этиленгликоль) – оказывают влияние на точку замерзания цитозоля, выравнивают осмотическое давление и таким образом оказывают стабилизирующее действие на клетки (Sakai et al., 1990; Belous, Grishchenko, 1994, 1994; Benson, 2008).

Отметим, что третий этап – обработка эксплантов криопротекторами – не используется для криоконсервации черенков плодовых и ягодных культур, криоконсервации пыльцы и ортодоксальных семян.

**Медленное замораживание**, которое иначе называют многоэтапным программным замораживанием (Sakai, 1960; Finkle, Ulrich, 1979; Reed, Lagerstedt, 1987), направлено на постепенное обезвоживание клеток при дегидратации путем медленного охлаждения материала до  $-40^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $0,2\text{--}0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  с последующим замораживанием в жидком азоте (Forsline et al., 1999; Reed, 2008; Benson, 2008). При таком постепенном охлаждении клетки обезвоживаются, вследствие выхода воды по градиенту концентрации в межклеточное пространство, а в дальнейшем, когда там образуются кристаллы льда, происходит повреждение клеток этими кристаллами. В основополагающей работе Sakai (1960) было показано, что веточки шелковицы, предварительно охлажденные до  $-30^{\circ}\text{C}$  и до  $-70^{\circ}\text{C}$ , хорошо переносят замораживание в жидком азоте. Если температура предварительного охлаждения была выше  $-30^{\circ}\text{C}$ , то процент выживания был невысок, причем он был тем ниже, чем выше была температура предварительного охлаждения. Эти эксперименты послужили основой для дальнейшей разработки разнообразных протоколов медленного замораживания различных объектов, в которых температура предварительного охлаждения никогда не превышает  $-30^{\circ}\text{C}$ . В работах по криоконсервации методом медленного замораживания наиболее часто применяли смесь криопротекторов, в состав которой входят 10% полиэтиленгликоль (ПЭГ), 10% глюкоза и 10% ДМСО, растворенные в жидкой среде МС (Finkle, Ulrich, 1979).



Метод медленного замораживания был разработан первым и до сих пор используется при криоконсервации спящих почек древесных культур (Forsline et al., 1999; Towill et al., 2004; Towill, Ellis, 2008; Filipenko, 2007; Verzhuk et al., 2015, 2016). Следует отметить, что медленное замораживание в ряде случаев дает очень хорошие результаты. Отказ от него в пользу методов быстрого замораживания зачастую связан с тем, что трудно набрать большое число черенков в хорошем состоянии, необходимое для надежного криосохранения определенного образца.

**Методы быстрого замораживания** подразумевают прямое погружение биологического материала в жидкий азот ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) без предварительного охлаждения. Они более просты, хорошо воспроизводятся, позволяют эффективно сохранять образцы разных видов, представленных древесными и травянистыми, тропическими и арктическими растениями, в виде различных типов эксплантов – почек, меристем, эмбрионов, пыльцы, каллусов и клеточек (Reed, 2008, 2017; Feng et al., 2013; Wang et al., 2014). Большинство методов быстрого замораживания основано на явлении витрификации, при котором внутриклеточная вода во время замораживания переходит в стекловидную (витрифицированную) фазу, минуя процесс кристаллизации; в результате чего клеточные органеллы остаются неповрежденными. Этот эффект достигается использованием криопротекторов (Sakai et al., 1990; Belous, Grishchenko, 1994).

Для эффективной защиты от криоповреждений рекомендуют использовать смесь криопротекторов разных типов. Наиболее часто применяют раствор PVS2 (Sakai et al., 1990), в состав которого входит несколько криопротекторов (30% глицерол, 15% ДМСО, 15% этиленгликоль, 0,4М сахароза), а также микро- и макроэлементы по прописи Мурасиге и Скуга (МС, Murashige, Skoog, 1962). Концентрация и длительность обработки криопротекторами должна определяться очень тщательно для каждого нового растительного объекта, чтобы сохранить жизнеспособность эксплантов (Arakawa et al., 1990; Sakai et al., 1990; Nishizawa et al., 1993; Reed, Chang, 1997; Panis et al., 2005).

**Метод инкапсуляции-дегидратации** включает инкапсуляцию эксплантов микрорастений в шарики альгината натрия с последующим высушиванием в потоке стерильного воздуха ламинара и погружением в жидкий азот. Данный метод, в основном, применяют для криоконсервации апексов микрорастений плодовых культур (Dereuddre et al., 1990; Wang et al., 2005; Gupta, Reed, 2006). Известны единичные примеры использования данного метода и для криоконсервации апексов картофеля (Fabre, Dereuddre, 1990; Bouafia et al., 1996).

**Метод витрификации** заключается в обработке эксплантов перед быстрым погружением в жидкий азот витрифицирующими растворами PVS2 (Sakai et al., 1990) и PVS3 (50% глицерола и 50% сахарозы; Nishizawa et al., 1993). Наиболее часто применяют раствор PVS2 (Golmirzaie, Panta, 2000). Метод получил широкое распространение для разных культур, поскольку он проще в исполнении, чем более ранние методы криоконсервации

(Romadanova et al., 2017). В ведущем генбанке картофеля CIP (Перу) с использованием метода витрификации с 1995 по 2000 год были криоконсервированы 197 генотипов картофеля со средним уровнем регенерации 46%. Однако только около половины образцов имели относительно высокие показатели криорегенерации, около трети образцов регенерировали с частотой менее 15%, и у 15% образцов так и не удалось получить регенеранты (Golmirzaie, Panta, 2000). В настоящее время наиболее широко используют различные комбинации метода витрификации с другими методиками криоконсервации. Так, например, в случае **метода инкапсуляции-витрификации** (Tannoury et al., 1991) апексы или каллусы микрорастений сначала помещают в альгинатные шарики, после чего материал инкубируют в витрифицирующем растворе для дегидратации и витрификации. Данный метод более результативный и быстрый, чем метод инкапсуляции-дегидратации (Hirai, Sakai, 1999, 2000; Wang et al., 2005).

**Дроплет-метод (дроппет-замораживание)** был разработан в 1993 году в генбанке IPK (Германия) для криоконсервации апексов микрорастений картофеля (Schäfer-Menuhr et al., 1994). Термин «дроппет» отражает специфику данного метода: в капли криопротектора (10% ДМСО), нанесенные на полоски алюминиевой фольги, помещают экспланты на 12 часов. После этого полоски фольги с эксплантами быстро замораживают в жидком азоте. Данный прием облегчает быстрое погружение эксплантов в жидкий азот и их извлечение из него. С помощью этого метода в IPK создана криоколлекция картофеля, насчитывающая 1560 сортов, со средним уровнем регенерации после оттаивания 58% (Kaczmarczyk et al., 2008, 2011).

**Дроплет-витрификация** является комбинацией методов дроплет-замораживания и витрификации. Данная технология была разработана В. Panis с коллегами в 2005 году для криоконсервации *in vitro* коллекции банана, в том же году она была успешно применена для картофеля (Halmagyi et al., 2005), а впоследствии – для многих других видов растений (Panis et al., 2016). Дроплет-витрификация включает все этапы дроплет-метода, отличаясь от него использованием раствора PVS2, содержащим более высокое количество ДМСО (15%) и дополнительные криопротекторы, а также существенно более короткой продолжительностью инкубации эксплантов в этом растворе (30 минут вместо 12 часов). На сегодняшний день данный метод зарекомендовал себя наиболее простым в исполнении и надежным способом криоконсервации. Так, например, по сравнению с дроплет-методом при использовании метода дроплет-витрификации были получены достоверно более высокие показатели посткриогенного восстановления у образцов картофеля (Shvachko, 2012) и арабидопсиса (Stock et al., 2017). В настоящее время метод дроплет-витрификации получил широкое распространение и успешно используется для криоконсервации травянистых и древесных растений, относящихся к разным ботаническим семействам, включая тропические виды, например: банан (Panis et al., 2005, 2009, 2016), таро (Sant

et al., 2008), ананас (Souza et al., 2016) и растения умеренной зоны: лук и чеснок (Kim et al., 2006, 2009, 2012a, b), картофель (Panta et al., 2015; Shvachko, Gavrilenko, 2011; Ukhatova et al., 2017b; Gavrilenko et al., 2018), яблоня (Condello et al., 2011a), пеларгония (Gallard et al., 2008), роза (Halmagyi, Pinker, 2006; Pawlowska, Szewczyk-Taranek, 2013; Le Bras et al., 2014), зверобой (Coste et al., 2012). С использованием метода дроплет-витрификации

созданы криоколлекции многочисленных образцов следующих культур (табл. 1): банана в Бельгии (Panis et al., 2005, 2009); лука и чеснока в Южной Кореи (Kim et al., 2006, 2009, 2012a) и Германии (Keller et al., 2016); картофеля в Перу (Panta et al., 2015; Vollmer et al., 2016, 2017), США (Bamberg et al., 2016; Jenderek, Reed, 2017) и России (Shvachko, Gavrilenko, 2011; Ukhatova et al., 2017b; Gavrilenko et al., 2018); малины и ежевики в США (Reed, DeNoma, 2012; Jenderek, Reed, 2017).

**Таблица 1. Наиболее крупные криоколлекции культурных растений**  
**Table 1. The largest cryocollections of cultivated plants worldwide**

Институт, страна	Экспланты	Материал	Таксон – род (вид)	Число образцов in cryo	Метод крио	Ссылка
IRD, Франция	Семена	Сорта и гибриды кофе	<i>Coffea</i> L.	500	De	Niino, Valle Arizaga, 2015
NBPGR, Индия	Спящие почки	Сорта и гибриды шелковицы	<i>Morus</i> L.	329		Niino, Valle Arizaga, 2015
NIAS, Япония	Спящие почки	Сорта и гибриды шелковицы	<i>Morus</i> L.	1236	SF	Niino, Valle Arizaga, 2015
NCGRP, США	Спящие почки	Сорта и гибриды яблони	<i>Malus</i> Mill.	2200		Forsline et al., 1999
NCGRP/ NCGR, США	<i>In vitro</i> апексы	Сорта и гибриды сливы	<i>Pyrus</i> L.	100	SF	Niino, Valle Arizaga, 2015
NICS, RDA, Корея	Ростки лукович	Сорта лука и чеснока, гибриды	<i>Allium</i> L.	1158	DV	Kim et al., 2012a
INIBAP, Бельгия	<i>In vitro</i> апексы	Сорта и гибриды банана	<i>Musa</i> L.	1536	DV	van Hoeyveld, Bollen, 2017
GFG, Германия	<i>In vitro</i> апексы	Сорта и гибриды земляники	<i>Fragaria</i> L.	194	V	Höfer, Hanke, 2017
CIAT, Колумбия	<i>In vitro</i> апексы	Сорта маниока съедобного	<i>Manihot</i> Mill. ( <i>M. esculenta</i> Crantz)	540	DV	Gonzalez-Armao et al., 2008
IPK, Германия	<i>In vitro</i> апексы	Сорта чеснока	<i>Allium</i> L. ( <i>A. sativum</i> )	101	DV	Keller et al., 2016
IPK, Германия	<i>In vitro</i> апексы	Селекционные сорта картофеля	<i>Solanum</i> L.	1560	Dr	Börner, 2017, personal comm.
CIP, Перу	<i>In vitro</i> апексы	Аборигенные сорта картофеля	<i>Solanum</i> L.	1533	DV	Vollmer et al., 2017
USPG, США	<i>In vitro</i> апексы	Селекционные сорта картофеля	<i>Solanum</i> L.	332	DV	Jenderek, Reed, 2017
ВИР, Россия	<i>In vitro</i> апексы	Аборигенные и селекционные сорта картофеля	<i>Solanum</i> L.	216	DV	Gavrilenko et al., 2018
NAC, Корея	<i>In vitro</i> апексы	Селекционные сорта картофеля	<i>Solanum</i> L.	130	DV	Kim et al., 2006
CAES, Япония	<i>In vitro</i> апексы	Сорта и гибриды картофеля	<i>Solanum</i> L.	100	EV	Hirai, 2011
NLGRP, США	<i>In vitro</i> апексы	Сорта малины и ежевики, гибриды	<i>Rubus</i> L.	209	DV	Jenderek, 2017, personal comm.

Методы криоконсервации: SF – медленное замораживание, De – дегидратация, V – витрификация, EV – инкапсуляция-витрификация, Dr – дроплет-метод, DV – дроплет-витрификация. Генбанки: CIP – International Potato Center, Перу; IPK – Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Германия; CAES – Central Agricultural Experiment Station, Hokkaido Research Organization, Япония; USPG – US Potato Genebank, США; ВИР – Всероссийский институт генетических ресурсов растений, Россия; NCGR – National Clonal Germplasm Repository, США; NCGRP – National Center for Genetic Resources Preservation, США; NLGRP – National Laboratory for Genetic Resources Preservation, США; IRD – Institut de Recherche pour le Développement, Франция; NIAS – National Institute of Agrobiological Sciences, Япония; INIBAP – International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Бельгия; CIAT – International Center for Tropical Agriculture, Колумбия; NICS RDA – National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Корея; GFG – German Fruit Genebank, Германия.

**Метод Cryo-plate**, сочетающий приемы инкапсуляции-дегидратации и дроплет-витрификации, является самым новым (Yamamoto et al., 2011, 2012, 2015; Valle Arizaga et al., 2017). В этом методе апексы микропобегов *in vitro* растений прикрепляют тонким слоем альгината кальция к алюминиевым крио-пластинам, обрабатывают

их растворами LS и PVS, а затем быстро погружают крио-пластины в жидкий азот (Yamamoto et al., 2011).

Методы криоконсервации продолжают совершенствоваться в направлениях упрощения исполнения и повышения результативности показателей посткриогенного восстановления меристем.



Отметим, что технологии криоконсервации растений получили мощное развитие за последние 30–50 лет. Так, первые успешные опыты по криоконсервации были проведены в 1960 году Sakai для черенков тутовника с использованием метода медленного замораживания (Sakai, 1960). С тех пор технологии криоконсервации быстро развивались и в настоящее время широко используются для самых разных видов растений (Reed, 2008; Gonzalez-Arno et al., 2008, 2014; Cruz-Cruz et al., 2013; Wang et al., 2014; Panta et al., 2015; Panis et al., 2016). Однако крупных представительных криоколлекций в мире не так много (см. табл. 1).

### Факторы, влияющие на показатели посткриогенной регенерации

**Типы эксплантов, используемые для криоконсервации растений.** В качестве эксплантов для криоконсервации используют различные органы *in vivo* и *in vitro* растений, а также клеточные и тканевые культуры. У *in vivo* растений криоконсервируют семена, пыльцу, черенки, спящие почки. Криоконсервацию пыльцы несложно проводить, поскольку нет необходимости в использовании криопротекторов, т. к. содержание свободной воды в пыльцевых зернах крайне мало. Препараты пыльцы могут быть возвращены из криобанков селекционерам (Ganeshan et al., 2008) в случае выпада необходимого образца из *in vitro* или полевой коллекции. Однако подчеркнем, что при этом образец сохраняется в генбанке на стадии гаметофита.

Криоконсервация ортодоксальных семян дает хорошие результаты, поскольку естественное содержание влаги в таких семенах составляет 12–19%, и они легко переносят высушивание до 5–10% (Panis, Lambardi, 2005; Роров, 2008). Отметим, что методы криоконсервации ортодоксальных семян целесообразно применять только для редких, исчезающих видов. Для длительного и среднесрочного хранения образцов ортодоксальных семян большинства видов растений наиболее эффективно использовать систему низкотемпературного хранения. Например, в ВИР коллекции образцов ортодоксальных семян разных видов сохраняются при +4... –10... –18°C. Для видов с рекальцитрантными семенами (ряд тропических древесных культур), которые часто имеют большие размеры, использование методов обезвоживания проблематично. Поэтому для криосохранения рекальцитрантных семян в качестве эксплантов выбирают изолированные зародыши или апикальные меристемы побега (FAO, 2014).

Криоконсервация спящих почек используется в основном для древесных плодовых культур умеренного климата, в частности, яблони (Forsline et al., 1999; Towill et al., 2004; Volk et al., 2008; Lambardi et al., 2009; Höfer, 2015). Однако для древесных тропических культур данный метод не подходит. В то же время, криоконсервация спящих почек предполагает два варианта посткриогенного восстановления: либо проведение прививки (окулировки) разможенной почки, либо введение ее в культуру *in vitro*. Следует отметить, что методы прививки адаптированы не для

всех культур, в основном – для древесных. При оттаивании спящих почек и введении их в культуру *in vitro* наблюдается большой выпад материала в связи с высоким уровнем контаминации эксплантов (Towill, Ellis, 2008).

Преимуществом криоконсервации образцов *in vitro* коллекций является возможность долгосрочного хранения при сверхнизких температурах эксплантов оздоровленных растений (Gavrilenko et al., 2007). В системе *in vitro* в качестве эксплантов для криоконсервации используют апикальные меристемы, вегетативные почки, апексы побегов микрорастений, зародыши (половые и соматические), каллусы, клеточные суспензии, протопласты (Benson et al., 1996; IPGRI, 2000; Gonzalez-Arno et al., 2014). Криоконсервацию каллусов и клеточных суспензий, протопластов проводят в основном для сохранения коллекций биопродуцентов, например, женьшеня (Роров et al., 2006; Gonzalez-Arno et al., 2014).

Для криоконсервации большинства вегетативно размножаемых культур из *in vitro* коллекций используют как верхушечные (апикальные), так и пазушные (аксиллярные) почки микрорастений. Так, в оригинальном протоколе дроплет-витрификации в качестве эксплантов были использованы только верхушечные почки микрорастений банана размером 1 мм (Panis et al., 2005). Для криоконсервации образцов картофеля Panta с коллегами (2014, 2015) брали верхушечные почки микрорастений размером 1,8–2,5 мм, включая конус нарастания и 4–5 примордиев. Другие авторы (Schäfer-Menuhr et al., 1994; Kaczmarszyk et al., 2008) использовали экспланты практически такого же размера для криоконсервации картофеля дроплет-методом. Экспланты представляли собой верхушки побега микрорастений картофеля (shoot tip), включающие верхушечную почку с частью стебля (Schäfer-Menuhr et al., 1994; Kaczmarszyk, 2008).

Ряд авторов сообщал об отсутствии достоверных различий в уровнях регенерации после оттаивания верхушечных и пазушных почек (Hirai, Sakai, 1999; Lee et al., 2011; Ozudogru et al., 2011; Shvachko, Gavrilenko, 2011; Coste et al., 2012; Shvachko, 2012). Другие авторы (Halmagyi et al., 2005; Yoon et al., 2006) отмечают существенно более высокую способность к регенерации верхушечных почек (Schäfer-Menuhr, 1997; Ukhatoeva et al., 2017b).

**Различные способы предобработки исходных микрорастений** – источников эксплантов для криоконсервации – также влияют на эффективность регенерации после оттаивания. В ряде работ отмечено положительное влияние на регенерацию: холодового закалывания (Reed, 1993; Kaczmarszyk et al., 2008), добавления в питательную среду повышенной концентрации сахарозы (sucrose preculture) (Panis et al., 2005; Nukari et al., 2011), витаминов – Е, С и антиоксидантов (липоевой кислоты, глутатиона, глицина, бетаина) (Uchendu et al., 2010a, b). Folgado et al. (2015) изучали два варианта предобработки исходных *in vitro* растений – холодовое закалывание и 'sucrose preculture', и выявили накопление растворимых сахаров в растительном материале, изменения качественного и количественного



состава белков углеводного обмена, стрессовых белков и белков окислительного гомеостаза (Folgado et al., 2013, 2015), что обуславливало различия в криорезистентности изученных образцов.

В последнее время появляется все больше работ по криоконсервации разных видов растений, в которых достигнуты высокие показатели посткриогенной регенерации эксплантов без этапа холодового закаливания исходных микрорастений (Condello et al., 2011b; Vujović et al., 2011; Ružić, Vujović, 2012; Ružić et al., 2013; Souza et al., 2016; Ukhatova et al., 2017a).

Большое влияние на посткриогенную регенерацию оказывает **длительность обработки эксплантов криопротекторами** – витрифицирующими растворами PVS2 (Sakai et al., 1990) или PVS3 (Nishizawa et al., 1993), причем PVS2 используется в большинстве работ. В зависимости от вида растения и размера экспланта необходима разная длительность обработки эксплантов раствором PVS2, которая сильно влияет на выживаемость после оттаивания (Sakai et al., 2008). Так, например, для меристем *in vitro* растений банана оптимальное время обработки раствором PVS2 при использовании метода капель-витрификации составляло 30–50 минут при 0°C (Panis et al., 2005). Для незакаленных пазушных почек микрорастений яблони наиболее высокий уровень регенерации после оттаивания был получен после применения 60-минутной инкубации почек в растворе PVS2 (Condello et al., 2011a). Для апексов микропобегов розы обработка PVS2 более 20 минут сильно повреждала ткани (Halmagyi, Pinker, 2006). В случае эксплантов малины криоконсервация методом витрификации со стадией 20-минутной экспозиции в растворе PVS2 при комнатной температуре позволила получить до 71% выживших эксплантов (Gupta, Reed, 2006). По данным Kim с соавторами (2006) выживаемость апексов микропобегов картофеля, криоконсервированных методом капель-витрификации, существенно снижалась после 20 минут обработки раствором PVS2. В то же время в более поздних публикациях сообщается об успешном применении метода капель-витрификации, включающем этап 50-минутной инкубации микропобегов картофеля в растворе PVS2 при 0°C (Panta et al., 2014, 2015). В ВИР используется модификация метода капель-витрификации DV-bio-tech с 30-минутной инкубацией эксплантов в растворе PVS2 при 0°C (Dunaeva et al., 2011; Schwachko, 2012; Ukhatova et al., 2017b).

В разных лабораториях для посткриогенной регенерации используют **питательные среды с разным составом фитогормонов**, в том числе для одних и тех же видов растений. Так, например, в случае картофеля использовали среду MC с кинетином и гибберелловой кислотой (ГК) (Panta et al., 2015; Vollmer et al., 2016), либо среду MC с индол-3-уксусной кислотой (ИУК), зеатином-рибозидом и ГК в разных концентрациях (Kim et al., 2006, 2012b; Wang et al., 2014). Однако при всех различиях в фитогормональном составе питательных сред на этапе подготовки

исходных микрорастений и этапе посткриогенной регенерации в качестве базовой среды всегда используется состав Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962).

**Влияние межвидовых различий** на эффективность регенерации эксплантов после оттаивания обсуждается во многих статьях, однако в большинстве работ сравнительное изучение проведено для единичных образцов разных видов. Ниже мы приведем данные, полученные для представительных выборок разных видов.

Не выявлены статистически достоверные различия по регенерационной способности образцов различных триплоидных видов банана, отличающихся геномным составом (AAA, AAB, ABB) (Panis et al., 2005). R. Vollmer с соавторами (2016) не обнаружили существенных различий в показателях регенерации после оттаивания образцов двух триплоидных культурных видов картофеля *S. chaucha* и *S. juzepczukii*, а также образцов трех диплоидных культурных видов – *S. ajanhuiri*, *S. stenotomum* и *S. phureja* (Vollmer et al., 2016). В этой же работе показано, что частота регенерации образцов аборигенного чилийского картофеля – *S. tuberosum* (2n = 4x) – существенно превышала соответствующие показатели у представителей близкого культурного вида *S. stenotomum* (2n = 2x). Bouafia et al. (1996) сообщают о существенных отличиях в уровне посткриогенной регенерации образцов двух видов – *S. tuberosum* (2n = 4x) и *S. phureja* (2n = 2x). Однако такое сравнение не совсем корректно, поскольку эти близкие культурные виды картофеля отличаются по уровню плоидности и эколого-географической приуроченности.

В ряде работ отмечены существенные различия в частотах выживаемости и регенерации после замораживания-оттаивания между разными генотипами одного и того же вида, отличающихся по уровню плоидности. Так, например, в опытах по криоконсервации гетероплоидных каллусов люцерны, размороженных после 27 лет хранения в жидком азоте, погибали в основном полиплоидные клетки; криорегенеранты были получены из диплоидных клеток (эу- и анеуплоидных, 2n = 2x±); авторы полагают, что причиной гибели преимущественно полиплоидных клеток являлся осмотический стресс (Volkova et al., 2015).

Таким образом, вопрос о влиянии на показатели выживаемости и регенерации после замораживания-оттаивания видовых особенностей и/или уровня плоидности растений остается открытым. Отметим, что в перечисленных выше работах не объясняются причины возможных различий в криорезистентности диплоидных и полиплоидных растений (клеток). В этой связи приведем результаты работы Н. И. Ненько с соавторами (Nenko et al., 2015), в которой проведены физиолого-биохимические и анатомо-морфологические исследования листового аппарата диплоидных и триплоидных сортов яблони в жаркие и засушливые летние сезоны. Авторы отмечают, что у триплоидных сортов яблони выявлено повышенное содержание



связанной формы воды, пролина, катионов калия по сравнению с диплоидными. Биометрические параметры (толщина листовой пластинки, кутикулы и верхнего эпидермиса) у триплоидных сортов яблони также имели существенно более высокие значения соответствующих показателей по сравнению с диплоидными сортами. По мнению авторов, комплекс этих параметров и обеспечивает триплоидным сортам яблони большую экологическую пластичность по сравнению с диплоидными (Nenko et al., 2015). Возможно, что с этими факторами могут быть связаны и различия в криорезистентности полиплоидных и диплоидных растений (клеток) в экспериментах по криоконсервации. Кроме того, возможно, полиплоидные образцы имеют более высокие дозы генетических факторов (аллелей, QTLs), контролирующих устойчивость к абиотическим стрессорам. В любом случае этот вопрос требует дополнительного изучения.

Kaczmarczyk et al. (2008) и Vollmer et al. (2017) сообщают о существенных различиях в криорезистентности образцов разных видов **различного эколого-географического происхождения**. В других работах не выявлено достоверных различий в посткриогенной регенерации между образцами близких культурных видов картофеля, собранными в высокогорных областях и в прибрежных районах (Panta et al., 2015; Vollmer et al., 2016). В подавляющем большинстве работ по криоконсервации больших выборок образцов одного и того же вида, одного и того же уровня плоидности и общего эколого-географического происхождения установлено существенное влияние **генотипических отличий** на способность к посткриогенному восстановлению (Kaczmarczyk et al., 2008; Gonzalez-Arناo et al., 2014; Niino, Valle Arizaga, 2015; Bamberg et al., 2016).

### Регламенты и стандарты для формирования криоколлекций

Вопросы о стандартах и регламенте закладки образцов растений на длительное криохранилище активно обсуждаются в литературе (Dussert et al., 2003; Keller et al., 2011; Volk et al., 2016). Минимальные значения посткриогенной регенерации четко не регламентированы, однако они имеют большое значение для определения числа надежно сохраняемых *in cryo* эксплантов каждого коллекционного образца. Ранее международная организация по сохранению биоразнообразия (IPGRI) рекомендовала криобанкам пополнять криоколлекции образцами, уровень посткриогенной регенерации которых составляет не менее 20% (IPGRI, 2000).

S. Dussert с коллегами (2003) опубликовали в журнале «Cryoletters» статью, в которой приведены статистические расчеты минимально допустимого уровня регенерации после оттаивания для обеспечения безопасности хранения криоконсервированных эксплантов, которые могут служить моделью при создании криоколлекций. Эти авторы рассчитали взаимосвязь между количеством сохраняемых эксплантов и величиной минимально допустимой частоты регенерации, и показали, что эта частота должна состав-

лять 39% от общего количества всех криоконсервированных эксплантов (Dussert et al., 2003). В этом случае вероятность получения как минимум одного регенеранта из каждой криопробирки составляет 0,95. Следует отметить, что 100 эксплантов каждого образца распределяются по 10 криопробиркам. Такой подход позволяет не только сохранить образец в криобанке, но и изымать по необходимости часть материала для мониторинга регенерационной способности данного образца после одного года, 10 и 25 лет криосохранения.

Подобные расчеты приведены и в работе Volk et al. (2016), в которой показано, что при исходной частоте регенерации 35% и выше из одной криопробирки с вероятностью 95% может регенерировать как минимум один эксплант (в каждой криопробирке сохраняется по 10 эксплантов). Авторы (Volk et al., 2016) приводят следующий пример: для получения после оттаивания 50 жизнеспособных эксплантов (с вероятностью 0,95) у определенного образца требуется заложить в криобанк как минимум 120, 150, 210 или 310 эксплантов, в зависимости от уровня их посткриогенной регенерации: 50, 40, 30 и 20%, соответственно (Volk et al., 2016).

Следуя этим расчетам, в генбанке ИРК сохраняют *in cryo* по 200 эксплантов каждого образца. Эту выборку разделяют на две равные части по 100 эксплантов (10 криопробирок по 10 эксплантов в каждой). Дополнительно 100 эксплантов ( $2 \times 50$ ) используют для контроля уровня регенерации (Keller et al., 2011). Итого для одного образца используют 300 эксплантов. Это позволяет обеспечить безопасное хранение всего материала, частота регенерации которого составляет не менее 10%. Для безопасного хранения растительного материала, уровень регенерации которого достигает 30% и выше, *in cryo* закладывают в два раза меньше эксплантов – по 100 на образец, и изучают уровень регенерации у 50 эксплантов (Keller et al., 2011).

По данным В. Panis с соавторами (2016), в Международном центре Bioversity International при пополнении криоколлекции банана соблюдают два условия: проведение трех независимых повторностей для криоконсервации каждого образца, в каждой из которых допустимый уровень регенерации эксплантов - не ниже 39%.

В ведущем генбанке картофеля CIP (Перу) криоконсервируют по 150 эксплантов на образец, 30 из которых используют для контроля частоты регенерации после оттаивания. О необходимости проведения криоконсервации дополнительных эксплантов судят по результатам первой повторности: если частота регенерации превышает 30%, то вторую повторность не делают. Если частота регенерации составляет 20–30% – выполняют вторую повторность, если ниже 20%, то для таких образцов подбирают более специфичный протокол (Vollmer et al., 2016, 2017).

Таким образом, разные генбанки используют различные регламенты и применяют разные подходы к логистике формирования криоколлекций. Общим остается принцип статистических подсчетов: за их основу берется уровень регенерации образца после оттаивания и допустимое число криосохраняемых эксплантов.

Регламенты закладки на длительное хранение в криобанк ВИР образцов из *in vitro* коллекции приведены в таблице 2. Криоконсервация апексов микрорастений из *in vitro* коллекции ВИР проводится с использованием оригинальной модификации метода дроблет-витрификации, разработанной в отделе биотехнологии ВИР (Shvachko, Gavrilenko, 2011; Dunaeva et al., 2011; Shvachko, 2012; Ukhatova et al., 2017 a, b). С использованием этого метода проводится криоконсервация апексов микрорастений из *in vitro*

коллекции ВИР. В настоящее время в криобанке ВИР сохраняется 220 образцов культурных видов картофеля и 17 образцов малины и ежевики, каждый образец представлен 90 эксплантами (в 9 криопробирках) с известным уровнем посткриогенной регенерации. Регламенты закладки на длительное хранение в криобанк ВИР апексов микрорастений образцов картофеля и малины приведены в таблице 2.

**Таблица 2. Регламент закладки образцов в виде апексов микропобегов на длительное хранение в криобанке ВИР**  
**Table 2. Regulations for the long-term cryopreservation of accessions in the form of microplant apices in the VIR cryobank**

Для криоконсервации и криохранения одного коллекционного образца необходимо 180 эксплантов (апексов микрорастений)		
<b>КОНТРОЛЬ:</b> (без погружения эксплантов в азот)	<b>КРАТКОСРОЧНАЯ КРИОКОНСЕРВАЦИЯ:</b> (погружение эксплантов в жидкий азот на 1 час)	<b>ДЛИТЕЛЬНАЯ КРИОКОНСЕРВАЦИЯ:</b> (долгосрочное хранение эксплантов в криобанке)
<b>30 эксплантов (10x3)</b>	<b>60 эксплантов (20x3)</b>	<b>90 эксплантов (30x3)</b>
изучение регенерационной способности эксплантов без замораживания в трех повторностях по 10 эксплантов в каждой	изучение регенерационной способности после оттаивания в трех повторностях по 20 эксплантов в каждой	пополнение криоколлекции ВИР: в трех повторностях по 30 эксплантов (3 криопробирки по 10 эксплантов) в каждой

Исходя из вышесказанного, образцы картофеля в криоколлекции ВИР были дифференцированы на три группы:

А) образцы с высоким уровнем регенерационной способности – выше 40%;

Б) образцы, уровень регенерации которых составил 21–39%;

В) образцы, регенерационная способность которых была ниже 20%.

В группу А вошли 77,3% криоконсервированных образцов, в группу Б – 19% образцов, в группу В – 3,7% образцов криоколлекции картофеля.

Отметим, что помимо криоколлекций картофеля и малины, создаваемых с использованием метода дроблет-витрификации апексов микрорастений, в криобанке ВИР сохраняются образцы различных плодовых и ягодных культур, криоконсервация которых проведена на основе метода медленного (многоэтапного программного замораживания) черенков и почек растений из полевого генбанка ВИР, а также образцы пыльцы (Verzhuk et al., 2012). Регламенты для формирования этих криоколлекций в криобанке ВИР находятся на стадии разработки.

Можно заключить, что несмотря на большое число разработанных к настоящему времени методов криоконсервации и их модификаций для разных видов растений,

задача создания больших криоколлекций с высоким уровнем посткриогенной регенерации образцов, представляющих меж- и внутривидовое разнообразие культивируемых видов растений, остается актуальной и пока труднодостижимой для многих культур.

**Благодарности:** авторы выражают благодарность ведущему научному сотруднику лаборатории длительного хранения семян каден. с.-х. Филипенко Г. И. за ценные замечания. Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по теме № 0662-2018-0004 «Совершенствование стратегии, теории, методов и технологий *ex situ* хранения генетических ресурсов растений без потери их жизнеспособности», номер государственной регистрации ЕГИСУ НИОКР: АААА-А16-116040710363-2.

#### References/Литература

- Arakawa T., Carpenter J. F., Kita Y. A., Crowe J. H. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis // *Cryobiology*. 1990, vol. 27, pp. 405–415.
- Belous A. M., Grishchenko V. I. *Cryobiology* // Kiev, 1994, 432 pp. [in Russian] (Белоус А. М., Грищенко В. И. Криобиология // Киев, 1994. 432 с.)
- Bamberg J. B., Martin M. W., Abad J., Jenderek M. M., Tanner J., Donnelly D. J., Nassar M. K., Veilleux R. E., Novy R. G. *In vitro* technology at the US Potato Genebank // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* –



- Plant. 2016, vol. 52, no. 3, pp. 213–225. DOI 10.1007/s11627-016-9753-x.
- Benson E. E. Cryoconserving algal and plant diversity: historical perspectives and future challenges // In: Fuller B, Lane N, Benson EE (eds.) Life in the frozen state. London : CRC Press, 2004, pp. 299–328.
- Benson E. E. Cryopreservation theory // In: Reed B. M. (ed.) Plant cryopreservation: a practical guide. New York : Springer, 2008, pp. 15–32.
- Benson E. E., Wilkinson M., Todd A., Ekuere U., Lyon J. Developmental competence and ploidy stability in plants regenerated from cryopreserved potato shoot-tips // CryoLetters. 1996, vol. 17, pp. 119–128.
- Bouafia S., Jelti N., Lairy G., Blanc A., Bonnel E., Dereuddre J. Cryopreservation of potato shoot tips by encapsulation-dehydration // Potato Research. 1996, vol. 39, pp. 69–78.
- Condello E., Caboni E., André E., Piette B., Druart P., Swennen R., Panis B. Cryopreservation of in vitro axillary buds of apple following the droplet-vitrification method // CryoLetters. 2011a, vol. 32, no. 2, pp. 175–185.
- Condello E., Ruzić D., Panis B., Caboni E. Raspberry cryopreservation by droplet vitrification technique // Acta Hort. 2011b, vol. 918, pp. 965–969. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.918.127.
- Coste A., Halmagyi A., Butiuc-Keul A. L., Deliu C., Coldea G., Hurdu B. In vitro propagation and cryopreservation of Romanian endemic and rare *Hypericum* species // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2012, vol. 110, pp. 213–226.
- Cruz-Cruz C. A., Gonzalez-Arnao M. T., Engelmann F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity // Resources. 2013, vol. 2, pp. 73–95.
- Dereuddre J., Scottez C., Arnaud Y., Duron M. Resistance of alginate-coated axillary shoot tips of pear tree (*Pyrus communis* L. cv. Beurré Hardy) in vitro plantlets to dehydration and subsequent freezing in liquid nitrogen: effects of previous cold hardening // Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. 1990, vol. 310, série III, pp. 317–323.
- Dunaeva S. E., Pendinen G. I., Antonova O. Ju., Shvachko N. A., Volkova N. N., Gavrilenko T. A. Preservation vegetatively propagated crops in the in vitro and cryocollection. Guidelines ed. by Gavrilenko T. A. (Sohranenie vegetativno razmnzhaemykh kul'tur v in vitro i kriokollekcijah. Pod. red. Gavrilenko T. A. Metodicheskie ukazaniya). GNU VIR Rossel'hoz akademii Publ. St Petersburg : VIR, 2011, 64 p. [in Russian] (Дунаева С. Е., Пендинен Г. И., Антонова О. Ю., Швачко Н. А., Волкова Н. Н., Гавриленко Т. А. Сохранение вегетативно размножаемых культур в in vitro и криоколлекциях: методические указания / Под редакцией Т. А. Гавриленко. СПб. : ГНУ ВИР Россельхозакадемии, 2011. 64 с.).
- Dussert S., Engelmann F., Noirot M. Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections // CryoLetters. 2003, vol. 24, no. 3, pp. 149–160.
- Engelmann F. Cryopreservation of clonal crops: a review of key parameters // Acta Hort. 2014, vol. 1039, pp. 31–39.
- Fabre J., Dereuddre J. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoots tips // CryoLetters. 1990, vol. 11, pp. 413–426.
- FAO. Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rev. ed. Rome. 2014, 182 p.
- Feng C., Wang R., Li J., Wang B., Yin Z., Cui Z., Li B., Bi W., Zhang Z., Li M., Wang Q. C. Production of pathogen-free horticultural crops by cryotherapy of in vitro-grown shoot tips // In: Lombardi M., Ozudogru E. A., Jain S. M. (eds.) Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants, Methods in Molecular Biology. New York : Spinger, 2013, vol. 994, pp. 463–482.
- Filipenko G. I. Development of the system of low-temperature storage and cryopreservation of plant genetic resources at VIR // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2007, vol. 164, pp. 263–272 [in Russian] (Филипенко Г. И. Развитие системы низкотемпературного хранения и криоконсервации генофонда растений в ВИР имени Н. И. Вавилова // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2007. Т. 164. С. 263–272).
- Finkle B. J., Ulrich J. H. Effects of cryoprotectants in combination on the survival of frozen sugarcane cells // Plant Physiol. 1979, vol. 63, pp. 598–604. DOI: https://doi.org/10.1104/pp.63.4.598.
- Folgado R., Panis B., Sergeant K., Renaut J., Swennen R., Hausman J. F. Differential protein expression in response to abiotic stress in two potato species: *Solanum commersonii* Dun and *Solanum tuberosum* L. // Int. J. Mol. Sci. 2013, vol. 14, pp. 4912–4933.
- Folgado R., Panis B., Sergeant K., Renaut J., Swennen R., Hausman J. F. Unravelling the effect of sucrose and cold pretreatment on cryopreservation of potato through sugar analysis and proteomics // Cryobiology. 2015, vol. 71, pp. 432–441. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2015.09.006.
- Forsline P. L., McFerson J. R., Lamboy W. F., Towill L. E. Development of base and active collections of *Malus* germplasm with cryopreserved dormant buds // Acta Hort. 1999, vol. 484, pp. 75–78.
- Gallard A., Panis B., Dorion N., Swennen R., Grapin A. Cryopreservation of *Pelargonium* spices by droplet-vitrification // CryoLetters. 2008, vol. 29, no. 3, pp. 243–251.
- Ganeshan S., Rajasekharan P. E., Shashikumar S., Decruze W. Cryopreservation of pollen // In: Reed B. M. (ed.) Plant cryopreservation: a practical guide. New York : Springer, 2008, pp. 443–464.
- Gavrilenko T., Dunaeva S., Truskinov E., Antonova O., Pendinen G., Lupisheva J., Rogovaja V., Shvachko N. Strategy of long-term conservation of germplasm of vegetatively propagated crops under controlled conditions // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Plant Breeding. 2007, vol. 164, pp. 273–285 [in Russian] (Гавриленко Т., Дунаева С., Трускинов Э., Антонова О., Пендинен Г., Лутышева Ю., Роговая В., Швачко Н. Стратегия долгосрочного сохранения генофонда вегетативно размножаемых сельскохозяйственных растений в контролируемых условиях среды // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2007, Т. 164, С. 273–285).
- Gavrilenko T., Ukhatova Yu., Shvachko N., Antonova O., Volkova N., Klimenko N. Creation of potato cryocollection at VIR // Abstract Book 10th WPC-XXVIII ALAP 2018 Congress: biodiversity, food Security and business. Cusco, Peru. 27–31 of May 2018, p. 154.
- Golmirzaie A. M., Panta A. Advances in potato cryopreservation at CIP // In: Engelmann F., Takagi H. (eds.) Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. 2000. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, pp. 250–254.
- Gonzalez-Arnao M. T., Martinez-Montero M. E., Cruz-Cruz C. A., Engelmann F. Advances in Cryogenic Techniques for the Long-Term Preservation of Plant Biodiversity // Chapter 8 in: Springer International Publishing Switzerland Ahuja M. R., Ramawat K. G. (eds.), Biotechnology and Biodiversity, Sustainable Development and Biodiversity. 2014, vol. 4, pp. 129–170. DOI 10.1007/978-3-319-09381-9\_8.
- Gonzalez-Arnao M. T., Panta A., Roca W. M., Escobar R. H., Engelmann F. Development and large-scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2008, vol. 92, pp. 1–13.
- Gupta S., Reed B. M. Cryopreservation of shoot tips of blackberry and raspberry by encapsulation-dehydration and vitrification // CryoLetters. 2006, vol. 27, no. 1, pp. 29–42.
- Halmagyi A., Pinker I. Plant regeneration from *Rosa* shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2006, vol. 84 no. 2, pp. 100129–100137.
- Halmagyi A., Deliu C., Coste A. Plant regrowth from potato shoot tips cryopreserved by a combined vitrification-droplet method // CryoLetters. 2005, vol. 26, no. 5, pp. 313–322.
- Hirai D., Sakai A. Cryopreservation of in vitro grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation vitrification // Potato Research. 1999, vol. 42, pp. 153–160.
- Hirai D., Sakai A. Cryopreservation of in vitro-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification // In: Engelmann F., Takagi H. (eds.) Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application.



2000. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba
- Hirai D. Gelled droplet vitrification improves recovery of cryopreserved potato germplasm // *CryoLetters*. 2011, vol. 32, no. 4, pp. 287–296.
- Höfer M. Cryopreservation of winter-dormant apple buds: establishment of a duplicate collection of *Malus* germplasm // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2015, vol. 121, no. 3, pp. 647–656. DOI: 10.1007/s11240-015-0735-1.
- Höfer M., Hanke M.V. Cryopreservation of fruit germplasm // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 2017, vol. 53, no. 4, pp. 372–381. DOI: 10.1007/s11627-017-9841-6.
- IPGRI. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and applications // *Engelmann F., Takagi H. (eds.)*. 2000, 496 p.
- Jenderek M. M., B. M. Reed Cryopreserved storage of clonal germplasm in the USDA National Plant Germplasm System // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 2017, vol. 53, no. 4, pp. 299–308. DOI: 10.1007/s11627-017-9828-3.
- Kaczmarczyk A., Funnekotter B., Menon A., Phang P. Y., Al-Hanbali A., Bunn E., Mancera R. L. Current issues in plant cryopreservation // In: *Katkov I. I. (ed.)* Current frontiers in cryobiology. InTech, Rijeka. 2012, pp. 417–438. DOI: 10.5772/32860. ISBN 978-953-51-0191-8.
- Kaczmarczyk A., Shvachko N., Lupysheva Y., Hajirezaei M.-R., Keller E. R. J. Influence of alternating temperature preculture on cryopreservation results for potato shoot tips // *Plant Cell Rep.* 2008, vol. 27, no. 9, pp. 1551–1558. DOI: 10.1007/s00299-008-0574-1.
- Kaczmarczyk A. Physiological, biochemical, histological and ultrastructural aspects of cryopreservation in meristematic tissue of potato shoot tips // *Dissertation*. 2008, 100 p.
- Kaczmarczyk A., Rokka V.-M., Keller E. R. J. Potato Shoot Tip Cryopreservation. A Review // *Potato Research*. 2011, pp. 45–79.
- Keller E. R. J., Semula A., Zanke Ch., Grübe M., Kaczmarczyk A. Cryopreservation and *In Vitro* Culture – State of the Art as Conservation Strategy for Genebanks // *Acta Hort.* 2011, vol. 918, pp. 99–111.
- Keller E. R. J., Grübe M., Hajirezaei M.-R., Melzer M., Mock H.-P., Rolletschek H., Semula A., Subbarayan K. Experience in large-scale cryopreservation and links to applied research for safe storage of plant germplasm // *Acta Hort.* 2016, vol. 1113, pp. 239–250. DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1113.36.
- Kim H. H., Popova E., Shin D. J., Yi J. Y., Kim C. H., Lee J. S., Yoon M. K., Engelmann F. Cryobanking of Korean *Allium* germplasm collections: results from a 10 year's experience // *CryoLetters*. 2012a, vol. 33, no. 1, pp. 45–57.
- Kim H. H., Yoon J. W., Park Y. E., Cho E. G., Sohn J. K., Kim T. S., Engelmann F. Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species: critical factors in droplet vitrification // *CryoLetters*. 2006, vol. 27, no. 4, pp. 223–234.
- Kim H. H., Popova E., Shin D. J., Bae C. H., Baek H. J., Park S. U., Engelmann F. Development of a droplet-vitrification protocol for cryopreservation of *Rubia akane* (Nakai) hairy roots using a systematic approach // *CryoLetters*. 2012b, vol. 33, no. 6, pp. 506–517.
- Kim H. H., Lee Y. G., Park S. U., Lee S. C., Baek H. J., Gwag J. G., Cho E. G., Engelmann F. Development of alternative loading solutions in droplet-vitrification procedures // *CryoLetters*. 2009, vol. 30, no. 4, pp. 291–299.
- Lambardi M., Benelli C., De Carlo D., Previati A. Advances in the cryopreservation of fruit plant germplasm at the CNRIVALSA Institute of Florence // *Acta Hort.* 2009, vol. 839, pp. 237–244.
- Le Bras C., Le Besnerais P. H., Hamama L., Grapin A. Cryopreservation of ex-vitro grown *Rosa chinensis* 'Old Blush' buds using droplet-vitrification and encapsulation-dehydration // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2014, vol. 116, pp. 235–242. DOI: 10.1007/s11240-013-0400-5.
- Lee Y. G., Popova E., Cui H. Y., Kim H. H., Park S. U., Bae C. H., Lee S. C., Engelmann F. Improved cryopreservation of *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum morifolium*) using droplet-vitrification // *CryoLetters*. 2011, vol. 32, no. 6, pp. 487–497.
- Martinez-Montero M. E., Harding K. Cryobionomics: evaluating the concept in plant cryopreservation // In: *D. Barth et al. (eds.)* PlantOmics: the omics of plant science, Springer India. 2015, pp. 655–682. DOI: 10.1007/978-81-322-2172-2\_23.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiol Plantarum*. 1962, vol. 15, pp. 473–497.
- Nenko N. I., Kiseleva G. K., Karavaeva A. V., Ulyanovskaya E. V. Specific features of the water regime of apple varieties of various ploidy in connection with adaptation to drought [Electronic resource] // *Fruit growing and viticulture of the South of Russia*. 2015, vol. 31 (1), pp. 107–118 (Osobennosti vodnogo rezhima sortov yabloni razlichnoy ploidnosti v svyazi s adaptatsiyey k zasukhe // *Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii*) [in Russian] (Ненько Н. И., Киселева Г. К., Каравеева А. В., Ульяновская Е. В. Особенности водного режима сортов яблони различной ploйдности в связи с адаптацией к засухе [Электронный ресурс] // *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2015. № 31 (1). С. 107–118. URL: <http://journal.kubansad.ru/pdf/15/01/11.pdf>. (дата обращения: 28.06.2018).
- Niino T., Valle Arizaga M. Cryopreservation for preservation of potato genetic resources // *Breed. Sci.* 2015, vol. 65, no. 1, pp. 41–52. DOI: 10.1270/jsbbs.65.41.
- Nishizawa S., Sakai A., Amano Y., Matsuzawa T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryonic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification // *Plant Sci.* 1993, vol. 91, no. 1, pp. 67–73. DOI: 10.1016/0168-9452(93)90189-7.
- Nukari A., Uosukainen M., Laamanen J., Rantala S. Cryopreservation of horticultural plants at MTT // In: *Grapin A., Keller E. R. J., Lynch P. T., Panis B., Revilla Bahillo A., Engelmann F. (eds.)* Proceeding of the final meeting COST Action 871 CryoPlanet "Cryopreservation of crop species in Europe". 2011, pp. 93–97.
- Ozudogru E. A., Kirdok E., Kaya E., Capuana M., Benelli C., Engelmann F. Cryopreservation of redwood (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.) *in vitro* buds using vitrification-based techniques // *CryoLetters*. 2011. V. 32. No. 2. Pp. 99–110.
- Panis B., Van den Houwe I., Swennen R., Rhee J., Roux N. Securing plant genetic resources for perpetuity through cryopreservation // *Indian J Plant Genet Resour.* 2016, vol. 29, no. 3, pp. 300–302.
- Panis B. Cryopreservation of *Musa* germplasm: 2nd edition // *Technical Guidelines No. 9* / *Engelmann F., Benson E. eds.* Bioversity International, Montpellier, France. 2009. 51 p.
- Panis B., Piette B., Swennen R. Droplet vitrification of apical meristems: A cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae* // *Plant Sci.* 2005. V. 168. Pp. 45–55.
- Panis B., Lambardi M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees) // *The role of biotechnology*. 2005, pp. 43–54.
- Panta A., Panis B., Ynouye C., Swennen R., Roca W. Development of a PVS2 droplet vitrification method for potato cryopreservation // *CryoLetters*. 2014, vol. 35, no. 3, pp. 255–266.
- Panta A., Panis B., Ynouye C., Swennen R., Roca W., Tay D., Ellis D. Improved cryopreservation method for the long-term conservation of the world potato germplasm collection // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2015, vol. 120, pp. 117–125.
- Pawlowska B., Szewczyk-Taranek B. Droplet-vitrification cryopreservation of *Rosa canina* and *Rosa rubiginosa* using shoot tips from *in situ* plants // *Sci Hort.* 2013, vol. 168, pp. 151–156. DOI: 10.1016/j.scienta.2013.12.016.
- Popov A. S. Cryopreservation of plants and their cells // *Veterinary pathology*, 2008, vol. 2, pp. 158–160 [in Russian] (Попов А. С. Криосохранение растений и их клеток // *Ветеринарная патология*. 2008. № 2. С. 158–160).
- Popov A. S. Some mechanisms of *in vitro* plant cells cryodamage and the features of their cryopreservation // *Russian Journal of Plant Physiology*. 1993, vol. 40, no. 3, pp. 485–496 [in Russian] (Попов А. С. Некоторые механизмы криоповреждений клеток растений *in vitro* и особенности их криосохранения // *Физиология растений*. 1993. Т. 40. № 3. С. 485–496).



- 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, no 3, pp. 403–410.
- Reed B. M., Chang Y. Medium- and long-term storage of *in vitro* cultures of temperate fruit and nut crops // In: Conservation of plant genetic resources *in vitro* / Razdan M. K., Cocking E. C. eds. 1997, vol. 1, pp. 67–103.
- Reed B. M. Cold acclimation as a method to improve survival of cryopreserved *Rubus* meristems // CryoLetters. 1988, vol. 9, pp. 166–171.
- Reed B. M., Lagerstedt H. B. Freeze preservation of apical meristems of *Rubus* in liquid nitrogen // HortScience. 1987, vol. 22, no. 2, pp. 302–303.
- Reed B. M. Improved survival of *in vitro*-stored *Rubus* germplasm // J Amer Soc Hort Sci. 1993, vol. 11, pp. 890–895.
- Reed B. M. Plant cryopreservation: A practical guide // Springer, New York. 2008, 496 p.
- Reed B. M., DeNoma J. Tissue Culture and Cryopreservation // In: Hummer K. (ed.) Corvallis repository annual report for 2012. United States Department of Agriculture. P. 29.
- Reed B. M. Plant cryopreservation: a continuing requirement for food and ecosystem security // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2017, vol. 53, no. 4, pp. 285–288. DOI: 10.1007/s11627-017-9851-4.
- Romadanova N., Kushnarenko S., Karasholakova L. Development of a common PVS2 vitrification method for cryopreservation of several fruit and vegetable crops // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2017, vol. 53, no. 4, pp. 382–393. DOI: 10.1007/s11627-017-9849-y.
- Ružić D., Vujović T. Cryopreservation *in vitro* of Blackberry 'Čačanska Bestna' shoot tips by encapsulation dehydration // Acta Hort. 2012, vol. 946, pp. 5–60. DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.946.5.
- Ružić D., Vujović T., Cerović R. *In vitro* conservation of two plant species (*Prunus cerasifera* Ehrh. and *Rubus fruticosus* L.) shoot tips by encapsulation dehydration // Genetika. 2013, vol. 45, no. 1, pp. 1–10.
- Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification // Plant Cell Rep. 1990, vol. 9, no. 1, pp. 30–33. DOI: 10.1007/bf00232130.
- Sakai A., Hirai D., Takao N. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols // In: Reed B. M. (ed.) Plant cryopreservation: A practical guide. Springer, USA. 2008, pp. 33–51.
- Sakai A. Survival of the twig of woody plants at  $-196^{\circ}\text{C}$  // Nature. 1960, vol. 185, pp. 393–394.
- Sant R., Panis B., Taylor M., Tyagi A. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2008, vol. 92, pp. 107–111.
- Schäfer-Memhr A., Schumacher H. M., Mix-Wagner G. Langzeitlagerung alter Kartoffelsorten durch Kryokonservierung der Meristeme in flüssigem Stickstoff // Landbauforschung Völkenrode. 1994, vol. 44, pp. 301–313.
- Schäfer-Memhr A., Schumacher H. M., Mix-Wagner G. Long-term storage of old potato varieties by cryopreservation of shoot-tips in liquid nitrogen // Plant Genetic Resources Newsletter. 1997, vol. 111, pp. 19–24.
- Shvachko N. A. Изучение генетического разнообразия сортов картофеля отечественной селекции на основе SSR-анализа и совершенствование методов *ex situ* сохранения сортового генофонда в контролируемых условиях: автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.: ВИР. 2012. 25 p. [in Russian] (Швачко Н. А. Изучение генетического разнообразия сортов картофеля отечественной селекции на основе SSR-анализа и совершенствование методов *ex situ* сохранения сортового генофонда в контролируемых условиях: автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.: ВИР. 2012. 25 с.)
- Shvachko N., Gavrilenko T. Cryopreservation of potato landraces using droplet-vitrification method // In: Proceeding of COST Action 871 Cryopreservation of crop species in Europe Final meeting. Grapin A., Keller J., Lynch P., Panis B., Revilla A., Engelmann F. (eds.). Angers. 2011, pp. 135–137.
- Souza F. V., Ergun K., Viera De Jesus L., De Souza E. H., Amorim V., Skogerboe D. M., Matsumoto T., Alves A. A., Ledo C., Jenderek M. M. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2016, vol. 124, pp. 351–360. DOI: 10.1007/s11240-015-0899-8.
- Steponkus P. L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation // Annu Rev Plant Phys. 1984, vol. 35, no. 1, pp. 543–584. DOI: 10.1146/annurev.pp.35.060184.002551
- Stock J., Semula A., Nagel M., Mock H.-P., Keller E. R. J. A simple method for cryopreservation of shoot tips of *Arabidopsis* genotypes // CryoLetters. 2017, vol. 38, no. 5, pp. 364–371.
- Tannoury M., Ralambosoa J., Kaminski M., Dereuddre J. Cryopreservation by vitrification of coated shoot-tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultured *in vitro* // Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Pamo. 1991, vol. 313, série III, pp. 633–638.
- Towill L. E., Ellis D. D. Cryopreservation of dormant buds // In: Reed B. M. (ed.) Plant cryopreservation: A practical guide. Springer, USA. 2008, pp. 421–442.
- Towill L. E., Forsline P. L., Walters C., Waddell J. W., Laufmann M. J. Cryopreservation of *Malus* germplasm using a winter vegetative bud method: results from 1915 accessions // CryoLetters. 2004, vol. 25, no. 5, pp. 323–334.
- Tumanov I. I., Krasavtsev O. A., Khvalin N. N. Increase of frost resistance of birch and black currant to  $-254^{\circ}\text{C}$  by hardening // Reports of Acad. Sciences of the USSR, T. 127, no. 6, 1959, pp. 1301–1303 (Tumanov I. I., Krasavtsev O. A., Khvalin N. N. Povysheniye morozostoykosti berezy i chernoy smorodiny do  $-254^{\circ}\text{C}$  putem zakalivaniya // Doklady Akad. Nauk SSSR. 1959, vol. 127, no. 6, pp. 1301–1303) [in Russian] (Туманов И. И., Красавцев О. А., Хвалин Н. Н. Повышение морозостойкости березы и черной смородины до  $-254^{\circ}\text{C}$  путем закаливания // Доклады Акад. Наук СССР, 1959, Т. 127, № 6, С. 1301–1303).
- Uchendu E. E., Muminova M., Gupta S., Reed B. M. Antioxidant and anti-stress compounds improve regrowth of cryopreserved *Rubus* shoot tips // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2010a, vol. 46, pp. 386–393. DOI: 10.1007/s11627-010-9292-9.
- Uchendu E. E., Leonard S. W., Traber M. G., Reed B. M. Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation // Plant Cell Rep. 2010b, vol. 29, pp. 25–35.
- Ukhatova Y. V., Dunaeva S. E., Antonova O. Y., Apalikova O. V., Pozdniakova K. S., Novikova L. Y., Shvalova L. E., Gavrilenko T. A. Cryopreservation of red raspberry cultivars from the VIR *in vitro* collection using a modified droplet-vitrification method // In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant. 2017a, vol. 53, no. 4, pp. 394–401. DOI: 10.1007/s11627-017-9860-3.
- Ukhatova Yu. V., Owes E. V., Volkova N. N., Gavrilenko T. A. Cryoconservation of potato breeding cultivars at VIR // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2017b, vol. 178, no. 3, pp. 13–20 [in Russian] (Ухатова Ю. В., Овэс Е. В., Волкова Н. Н., Гавриленко Т. А. Криоконсервация селекционных сортов картофеля в ВИРе // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2017. Т. 178. № 3. С. 13–20). DOI: 10.30901/2227-8834-2017-3-13-20.
- Valle Arizaga M., Villalobos Navarro O. F., Castillo Martinez C. R., Cruz Gutiérrez E. J., López Delgado H. A., Yamamoto S., Watanabe K., Niino T. Improvement to the D cryo-plate protocol applied to practical cryopreservation of *in vitro* grown potato shoot tips // The Horticulture Journal Preview. 2017, vol. 86, pp. 222–228.
- Van Hoeyveld B., K. Bollen. World's largest banana gene bank celebrates 30th anniversary. <https://nieuws.kuleuven.be/en/content/2017/worlds-largest-banana-genebank-celebrates-30th-anniversary> (23-06-2018).
- Verzhuk V. G., Filipenko G. I., Pavlov A. V. Cryopreservation of vegetative buds of sweet and sour cherry using cryoprotectors // Dostizheniya nauki i tekhniki APK. 2015, vol. 29, no. 7, pp. 65–67 [in Russian] (Вержук В. Г., Филипенко Г. И., Павлов А. В. Криоконсервация вегетативных почек черешни и

- вишни с использованием криопротекторов // Достижения науки и техники АПК. 2015. Т. 29. № 7. С. 65–67).
- Verzhuk V. G., Filipenko G. I., Pavlov A. V., Porotnikov I. V., Bondaruk D. D. Effect of light and sucrose concentration in germination medium on germination of apple pollen // The way of science. 2016, no. 3, pp. 14–19 [in Russian] (Вержук В. Г., Филипенко Г. И., Павлов А. В., Поротников И. В., Бондарук Д. Д. Влияние света и концентрации сахарозы в среде прорастивания на прорастание пыльцы яблони // Путь науки. 2016. № 3. С. 14–19).
- Verzhuk V. G., Filipenko G. I., Safina G. F., Pavlov A. V., Zhestkov A. S. Cryopreservation is an effective method of fruit crops genetic resources conservation // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2012, vol. 169, pp. 270–279 [in Russian] (Вержук В. Г., Филипенко Г. И., Сафина Г. Ф., Павлов А. В., Жестков А. С. Криоконсервация – эффективный метод сохранения генетических ресурсов плодовых и ягодных культур // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2012. Т. 169. С. 270–279).
- Verzhuk V. G., Filipenko G. I., Tikhonova N. G., Zhestkov A. S., Lupysheva Yu. V., Pupkova N. A., Mikhailova E. V., Savelyev N. I., Dorokhov D. S. Developing techniques for cryopreservation of fruit and berry genetic resources // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2009, vol. 166, pp. 353–357 [in Russian] (Вержук В. Г., Филипенко Г. И., Тихонова Н. Г., Жестков А. С., Лупышева Ю. В., Пупкова Н. А., Михайлова Е. В., Савельев Н. И., Дорохов Д. С. Разработка методов криосохранения генетических ресурсов растений плодовых и ягодных культур // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2009. Т. 166. С. 353–357).
- Volk G. M., Waddell J., Bomart R., Towill L., Ellis D., Luffmann M. High viability of dormant *Malus* buds after 10 years of storage in liquid nitrogen vapor // CryoLetters. 2008, vol. 29, no. 2, pp. 89–94.
- Volk G. M., Henk A. D., Jenderek M. M., Richards C. M. Probabilistic viability calculations for cryopreserving vegetatively propagated collections in genebanks // Genet Resour Crop Ev. 2016, vol. 64, no. 7, pp. 1613–1622. DOI: 10.1007/s10722-016-0460-6.
- Volkova L. A., Urmantseva V. V., Burgutin A. B., Nosov A. M. Recovery of cytogenetic and physiological characteristics of a population of alfalfa cells after cryogenic storage // Russian Journal of Plant Physiology. 2015, vol. 62, no. 5, pp. 676–683.
- Vollmer R., Villagaray R., Egusquiza V., Espirilla J., Garcia M., Torres A., Rojas E., Panta A., Barkley N. A., Ellis D. The potato cryobank at the International Potato Center (CIP) : a model for long term conservation of clonal plant genetic resources collections of the future // CryoLetters. 2016, vol. 37, no. 5, pp. 318–329.
- Vollmer R., Villagaray R., Cárdenas J., Castro M., Chávez O., Anglin N. L., Ellis D. A large-scale viability assessment of the potato cryobank at the International Potato Center (CIP) // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2017, vol. 53, no. 4, pp. 309–317. DOI: 10.1007/s11627-017-9846-1.
- Vujović T., Sylvestre I., Ružić D. J., Engelman F. Droplet vitrification of apical shoot tips of *Rubus fruticosus* L. and *Prunus cerasifera* Ehrh // Scientia Horticulturae. 2011, vol. 130, pp. 222–228.
- Vysotskaya O. N., Popov A. S. Method for cryogenic *in vitro* keeping of meristems isolated from red raspberry plants // Patent RF, no. 2248121. 2005 [in Russian] (Высоцкая О. Н., Попов А. С. Способ криосохранения меристем, изолированных из растений малины красной (*Rubus idaeus* L.) *in vitro* // Патент РФ, № 2248121. Бюлл. Изобретений. 2005. № 8. Ч. II. С. 338).
- Wang B., Wang R. R., Cui Z. H., Bi W. L., Li J. W., Li B. Q., Ozudogru E. A., Volk G. M., Wang Q. C. Potential applications of cryogenic technologies to plant genetic improvement and pathogen eradication // Biotechnology Advances. 2014, vol. 32, pp. 583–595.
- Wang Q. C., Laamanen J., Uosukainen M., Valkonen J. P. T. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration // Plant Cell Rep. 2005, vol. 24, pp. 280–288.
- Yamamoto S., Rafique T., Priyantha W. S., Fukui K., Matsumoto T., Niino T. Development of a cryopreservation procedure using aluminum cryo-plates // CryoLetters. 2011, vol. 32, no. 3, pp. 256–265.
- Yamamoto S., Wunna T., Rafique M., Valle Arizaga K., Fukui E., Cruz Gutierrez C., Watanabe K., Niino T. The aluminum cryo-plate increases efficiency of cryopreservation protocols for potato shoot tips // Am. J. Potato Res. 2015. V. 92. Pp. 250–257.
- Yamamoto S., Rafique T., Fukui K., Sekizawa K., Niino T. V-cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: case study of mint cryopreservation // CryoLetters. 2012, vol. 33, no. 1, pp. 12–23.
- Yoon J. W., Kim H. H., Ko H. C., Hwang H. S., Hong E. S., Cho E. G., Engelman F. Cryopreservation of cultivated and wild potato varieties by droplet vitrification: effect of subculture of mother-plants and of preculture of shoot tips // CryoLetters. 2006, vol. 27, no. 4, pp. 211–222.