

Леса России и хозяйство в них. 2022. № 4. С. 56–65
Forests of Russia and economy in them. 2022. № 4. P. 56–65

Научная статья
УДК 630*232.29
DOI: 10.51318/FRET.2022.56.46.007

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ – ПЕРЕДОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ СОХРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ЛЕСНЫХ РАСТЕНИЙ (ОБЗОР ИНОСТРАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ)

Деннис Чанотей¹, Алексей Евгеньевич Осипенко²

^{1,2} Уральский государственный лесотехнический университет, Екатеринбург, Россия

¹ denkofi5@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1536-4785>

² osipenkoae@m.usfeu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6148-1747>

Аннотация. Лесные экосистемы играют решающую роль в сохранении и воспроизводстве генетических ресурсов лесных растений и биоразнообразия в целом. Однако в течение уже многих лет существуют проблемы с поддержанием биоразнообразия в лесных экосистемах из-за различных негативных факторов природного и антропогенного происхождения: чрезмерная эксплуатация лесных ресурсов, различные катастрофические явления (пожары, наводнения, ураганы и т. д.). Эти негативные факторы вызывают изменения в структурах лесных экосистем, что приводит к уменьшению и потере определенных генотипов растений и биоразнообразия. Одной из наиболее перспективных и эффективных технологий сохранения генетических ресурсов растений является криоконсервация. В статье приводятся сведения об особенностях различных методов криоконсервации: сушка, инкапсуляция-сушка, витрификация, инкапсуляция-витрификация и витрификация капель. Данные методы криоконсервации растительного материала играют важную роль в сохранении генетических ресурсов лесных растений, а также в предотвращении заражения растений патогенами, что очень важно для устойчивого лесопользования. Широкий спектр возможных направлений применения криоконсервации позволил добиться значительного прогресса в размножении различных видов лесных растений. Особенно там, где важно сохранить определенные генотипы растений или семена, не выдерживающие сушку, а также семена, трудно прорастающие после длительного хранения. Технология криоконсервации способна значительно упростить задачу сохранения генетических ресурсов лесных растений, что позволит эффективно решать проблемы сокращения биоразнообразия лесов. Однако использование потенциала такой технологии требует инвестиций в исследования и разработки, человеческий капитал, инфраструктуру и потоки знаний. Целью данной статьи является обзор зарубежной литературы по вопросу криоконсервации.

Ключевые слова: криоконсервация, технология, биоразнообразии, генетические ресурсы, лесные растения

Scientific article

DOI: 10.51318/FRET.2022.56.46.007

CRYOPRESERVATION – ADVANCED TECHNOLOGY FOR THE CONSERVATION OF GENETIC RESOURCES OF FOREST PLANTS (REVIEW OF FOREIGN LITERATURE)

Dennis Charnotey¹, Alexey E. Osipenko²

^{1,2} Ural State Forest Engineering University, Yekaterinburg, Russia

¹ denkofi5@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1536-4785>

² osipenkoae@m.usfeu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6148-1747>

Abstract. Forest ecosystems play a crucial role in the conservation and reproduction of genetic resources of forest plants and biodiversity in general. However, for many years there have been problems with maintaining biodiversity in forest ecosystems due to various negative factors of natural and anthropogenic origin: overexploitation of forest resources, various catastrophic phenomena (fires, floods, hurricanes, etc.). These negative factors cause changes in the structures of forest ecosystems, which leads to a decrease and loss of certain plant genotypes and biodiversity. Cryopreservation is one of the most promising and effective technologies for the conservation of plant genetic resources. The article provides information about the features of various cryopreservation methods: drying, encapsulation-drying, vitrification, encapsulation-vitrification and vitrification of droplets. These methods of cryopreservation of plant material play an important role in preserving the genetic resources of forest plants, as well as in preventing infection of plants with pathogens, which is very important for sustainable forest management. A wide range of possible applications of cryopreservation has made it possible to achieve significant progress in the reproduction of various types of forest plants. Especially where it is important to preserve certain plant genotypes or seeds that cannot withstand drying, as well as seeds that are difficult to germinate after long-term storage. Cryopreservation technology can significantly simplify the task of preserving the genetic resources of forest plants, which will contribute to an effective solution to the problem of reducing forest biodiversity. However, harnessing the potential of such technology requires investments in research and development, human capital, infrastructure and knowledge flows. The purpose of this article is to review foreign literature on cryopreservation.

Keywords: cryopreservation, technology, biodiversity, genetic resources, forest plants

Введение

Известно, что из-за обезлесения около 21 % от общего числа видов растений (примерно 390 900 видов) на земле находятся под угрозой исчезновения главным образом из-за индустриализации, урбанизации, засоления почв и потепления климата (Thorn, 2016). Очевидно, что вопрос о сохранении биоразнообразия лесов стоит довольно остро. При этом подходы для сохранения генетических ресурсов могут

быть разными. Виды растений, размножающиеся семенами, могут быть сохранены в банках семян (Seed yield and protein..., 2017), в то время как виды, размножающиеся вегетативно, можно сохранить в полевых коллекциях *ex situ* (вне их естественных мест обитания) (Strategies and priorities..., 2017). Полевые коллекции, как один из старейших и наиболее важных подходов к сохранению генетических ресурсов лесных растений, име-

ют ряд ограничений, например зависимость от климатических условий, необходимость защиты коллекций от вредителей и болезней, потребность в больших площадях земель и высоких затратах на их обслуживание (Engelmann, 1997; Panis, Lambardi, 2006; Häggman et. al., 2008). Из-за таких ограничений возможность сохранения генетических ресурсов лесных древесных растений довольно затруднена, а создание надежных условий для их

сохранения является актуальной проблемой (Engelmann, Engels, 2002; Uosukainen et. al., 2007). Хранение *in vitro* (в пробирке) при низких температурах (4–10 °С) может быть рассмотрено для среднесрочного сохранения генетических ресурсов, обычно до одного года. Однако эта стратегия отнимает много времени и сопряжена с риском потери хранящихся материалов из-за загрязнения и человеческой ошибки (In vitro technology..., 2016). В то же время хранение семян с применением технологии криоконсервации является одним из передовых и инновационных методов, поскольку обеспечивает организованный и благоприятный способ сохранения зародышевой плазмы растений (Linnington, Pritchard, 2001). С середины двадцатого века было успешно предпринято несколько новаторских попыток сохранить генетические ресурсы древесных пород рода *Pinus* путем воздействия на семена или их части сверхнизкими температурами (Engstrom, 1966). Также имеются сведения об эффективном и успешном применении протоколов криоконсервации для семян таких растений, как *Myracrodruon urundeuva* A. (Medeiros, Cavallari, 1992), *Bletilla striata* (Cryopreservation..., 2005), *Fraxinus excelsior* L. (Chmielarz, 2009a), *Prunus avium* L. (Chmielarz, 2009b), *Betula pendula* R. (Chmielarz, 2010), *Salix sp.* и *Populus sp.* (Systematic overestimation..., 2013), *Mimusops sp.* (Differential responses..., 2013), *Parkia sp.*

(Sinniah, Gantait, 2013) и *Populus nigra* L. (Desiccation tolerance..., 2015). Различные методы криоконсервации для многих видов растений продолжают развиваться в сторону защиты посадочного материала; повышения плодородия и предотвращения истощения почвы за счет снижения химического стресса, а также улучшения почвенной микробиоты и сокращения отходов.

Криоконсервация

Криоконсервация основана на хранении образцов биологического посадочного материала при сверхнизких температурах, обычно в жидком азоте (LN, –196 °С), где все клеточные деления и метаболические процессы становятся неактивными. Криоконсервация была признана идеальным методом надежного и экономически эффективного сохранения зародышевой плазмы различных видов растений в течение длительного периода времени без каких-либо изменений (Panis, Lambardi, 2006; Tsai, Hubscher, 2004; Benson, 2008; Potential applications..., 2014). По сравнению с традиционными методами криоконсервация требует минимального объема и ограниченного обслуживания хранящегося материала и снижает риск множества небольших генетических мутаций, а также является относительно дешевой технологией (Panis, Lambardi, 2006; Benson, 2008; Potential applications..., 2014; Harding, 2004).

Недавнее исследование, проведенное Garcia-Mendiguren

с соавторами (Environmental Conditions..., 2016) для сосны лучистой (*Pinus radiata* D. Don), показало, что более низкая температура инициации (18 °С) способствует процессу соматического эмбриогенеза (SE) по сравнению с таковой для культур, инкубированных при 28 °С, что указывает на то, что стадия инициации имеет долгосрочный эффект эмбриогенеза у этого вида. Скорость инициирования была самой высокой при 18 °С (17 %) и не отличалась от контрольного варианта при 23 °С (13 %), но была значительно ниже при 28 °С (4 %). Пролиферация эмбриональных масс, начавшаяся при 18 и 23 °С (54 %), была выше по сравнению с 28 °С (15 %). Более того, самый высокий процент эмбрионных клеточных линий был получен при этих более низких температурах по сравнению с 28 °С. Панее Montalbán с соавторами (Cold Storage..., 2015) продемонстрировали, что хранение колбочек в холодильнике более 1 мес. увеличивает частоту инициации соматического эмбриогенеза (SE). Gao с соавторами (Key Techniques..., 2000) доказали, что успех стадии индукции у некоторых видов сосны также зависит от происхождения семейства и даты сбора эксплантов.

В настоящее время криоконсервация применима для хранения водорослей, мохообразных, папоротников, дедифференцированных клеточных культур, эмбрионных культур, вырезанных эмбрионов и эмбриональных осей, спящих почек, меристем и кончиков побегов,

кончиков корней, пыльцы и семян (Benson, 2008; Reed, 2008). Организованные растительные ткани, такие как веточки, спящие почки или проростки, размноженные *in vitro* (в пробирке), разрастающиеся скопления меристем, верхушечные и пазушные кончики побегов, кончики побегов, узлы и почки, обычно предпочтительны при криоконсервации вегетативно размноженных растений (Cryopreservation..., 2007; Technical Guidelines..., 2004). Криоконсервация спящих почек была принята в качестве метода криоконсервации плодовых деревьев в холодном климате, где можно использовать естественное закаливание почек от холода. В Северной Америке был разработан стандартный протокол для спящих почек яблони и внедрен в больших масштабах в условиях холодного континентального климата в Отделе генетических ресурсов растений в штате Флорида, США (Cryopreservation..., 2004). Этот метод оказался применимым также к сортам, выращенным в более мягком датском морском зимнем климате (Toldam-Andersen, et. al., 2007).

Целью процедур криоконсервации является удаление замерзающей воды из тканей путем физического или осмотического обезвоживания с последующим сверхбыстрым замораживанием. Наиболее распространенными криозащитными веществами являются диметилсульфоксид (DMSO), полиэтиленгликоль (PEG), сахароза, сорбит и маннит. Эти вещества обладают осмотическим

эффектом и способны проникать в клетки и защищать целостность клеток во время криоконсервации (Rajasekharan, 2006).

Экспланты для криоконсервации

Способность биологических материалов лесных деревьев выдерживать криоконсервацию зависит от их физических и биологических особенностей. Наиболее часто используемыми для криоконсервации тканями являются кончики побегов (апикальная меристема побега). Такой эксплант обычно размером 0,5–2,0 мм, имеет верхушечную почку и 5–6 зачатков листьев (LPs) (Potential applications..., 2014). Почки растений также могут служить в качестве экспланта, они содержат меристему побега и более старые ткани. Размер такого экспланта составляет 2,0–10,0 мм, что значительно больше, чем размер кончиков побегов. Кончики побегов и почки предпочтительны для использования при сохранении генетических ресурсов вегетативно размножаемых растений, поскольку они генетически более стабильны, чем другие экспланты, такие как клетки и эмбрионные ткани (Tsai, Hubscher, 2004; Potential applications..., 2014). Использование кончиков побегов и соматических эмбрионов требует систем культивирования тканей с установленными режимами микроразмножения (In vitro technology..., 2016; Bell, Reed, 2002; Ex situ conservation..., 2002; Conservation in

vitro..., 2006). Некоторые генетические ресурсы, воспроизводимые путем клонирования, сохраняются *in vitro* (в пробирке) и могут быть использованы для криоконсервации (Reed et. al., 2013).

Растительная ткань от здоровых растений должна быть отобрана для криоконсервации, чтобы выжить после процедуры. Маленькие, молодые, богатые цитоплазмой меристематические клетки, как правило, выживают лучше, чем более крупные, сильно вакуолизованные клетки. Предварительное культивирование или предварительный рост включает культивирование зародышевой плазмы на среде, дополненной криопротекторами, такими как сахароза или глюкоза, перед воздействием жидкого азота. Во время предварительного культивирования генетические ресурсы растений упаковывают в криотрубку и добавляют криопротекторы. Упакованные образцы постепенно охлаждают от –20 до –100 °С с помощью программируемой морозильной камеры или этанольных ванн. Частичное обезвоживание тканей может быть достигнуто с помощью осмотически активного соединения для повышения устойчивости растений к стрессу. После замораживания образцов до заданной температуры замораживания их погружают в жидкий азот (LN). Замороженные клетки/ткани хранят при температуре от –70 до –196 °С. Длительное хранение лучше всего проводить при температуре –196 °С (Daisuke, 2012).

Методы криоконсервации

Современные методы криоконсервации включают клеточную дегидратацию. Эту процедуру проводят непосредственно перед введением эксплантов в интенси́вный криозащитный раствор и/или их сушат на воздухе до тех пор, пока большая часть замороженного льда не будет удалена из клеток, что приводит к витрификации и отделению воды и таким образом предотвращает образование внутриклеточного льда. Как правило, стадия обезвоживания проводится путем прямого погружения эксплантов в жидкий азот (LN). Этот метод больше подходит для составных органов, таких как кончики побегов, эмбрионы или эмбриональные оси. Это особенно важно для криоконсервации зародышевой плазмы деревьев тропических лесов, которую применяют в тропических странах, при условии наличия основных средств для культивирования тканей и надежного источника жидкого азота (LN). Как правило, практикуются пять специфических методов криоконсервации, а именно сушка, инкапсуляция-сушка, витрификация, инкапсуляция-витрификация и витрификация капель.

Сушка. Удаление избытка воды из биологической ткани перед обработкой называется сушкой, или обезвоживанием. Избыток свободной воды вызывает образование кристаллов льда. Таким образом, избегая вредного образования кристаллов льда, соблюдают процедуру сушки (Sinniah, Gantait, 2013). Для достижения наилучших ре-

зультатов обезвоживания можно использовать различные методы, включая выдерживание образцов в течение определенных периодов времени в стерильном потоке воздуха (из камеры с ламинарным воздушным потоком), эксикаторах, силикагеле или сушильных растворах. Чаще всего ткани растений сушат стерильным потоком воздуха в шкафу с ламинарным потоком воздуха. В то же время отсутствует контроль за температурой и влажностью воздуха, что существенно влияет на скорость испарения. Способ сушки на воздухе обладает большей воспроизводимостью благодаря использованию фиксированного количества силикагеля, содержащегося в закрытых флаконах (Uragami et al., 1990).

Инкапсуляция-сушка. Инкапсуляция-сушка, или инкапсуляция-обезвоживание, представляет собой комбинацию двух подходов: методов инкапсуляции и обезвоживания (Cryopreservation of oil..., 2020). Это очень эффективный метод криоконсервации, разработанный Fabre и Dereuddre (Fabre, Dereuddre, 1990). В этом способе экспланты сначала предварительно культивируют в среде, содержащей сахарозу, затем инкапсулируют альгинатом кальция, а затем обрабатывают концентрированным раствором сахарозы. Затем инкапсулированные образцы обезвоживают в камере с ламинарным потоком или в эксикаторах с последующим охлаждением в жидком азоте (LN) для ультразамораживания (Johnson, 2002). Существует несколько критиче-

ских факторов, определяющих рост и выживаемость растений после криоконсервации, а именно продолжительность сушки, скорость и тип осмозащитных агентов.

Витрификация. Это наиболее часто используемый метод криоконсервации, и его также называют методом предотвращения замерзания, или стеклованием. Перед непосредственным воздействием на ткани растений образцы обрабатывают высококонцентрированными криопротекторами. При очень низких температурах высококонцентрированные водные криопротекторы становятся вязкими, так что они затвердевают в стекловидно-аморфное состояние без образования каких-либо кристаллов льда (Sinniah, Gantait, 2013; Tariwa, 2019). Основным принципом витрификации заключается в том, что она защищает клетки от внутренних повреждений из-за образования льда и устраняет замерзание воды путем осмотического обезвоживания или физического процесса, поскольку клетки обрабатываются высококонцентрированными криопротекторами с последующим сверхбыстрым замораживанием (Kaviani, 2011; Effect of loading..., 2012). Прямое погружение биологического материала в LN вместо медленного охлаждения материалов (двухступенчатое замораживание) способствует достижению наилучших результатов. Другими словами, экспланты подвергаются воздействию чрезвычайно высококонцентрированных

криопротекторов и быстро погружаются в жидкий азот (LN) (Sakai, Engelmann, 2007).

Инкапсуляция-витрификация. Это процесс, включающий как методы инкапсуляции, так и витрификации. В этом методе эксплантаты инкапсулируют шариками альгината кальция, а затем выполняют тот же протокол витрификации. Этот метод менее вреден для эксплантов, чем витрификация, поскольку инкапсулированные экспланты не вступают в прямой контакт с растворами для витрификации. Широкий спектр видов растений, принадлежащих к различным родам, положительно отреагировали на этот метод с момента открытия этого метода (Sakai et al., 2008). Silayo (2001) сообщил, что инкапсулированные меристемы, высушенные в каплях раствора для витрификации растений (PVS) при 25 °C в течение 25 мин, привели к самой высокой регенерации и пролиферации побегов (85 %).

Витрификация капель. Витрификация капель аналогична процессу витрификации; однако в случае первого метода протокол погружения в раствор отличается (Improved cryopreservation..., 2015). В этом методе перед погружением в жидкий азот (LN) отдельные эксплантаты помещают на алюминиевую фольгу и к каждому экспланту добавляют капли раствора для витрификации растений (PVS). Этот способ позволяет получить очень высокие скорости охлаждения при замораживании и очень высокие температуры нагрева

при оттаивании, поскольку экспланты помещают в минимальное количество криозащитной среды (Sakai, Engelmann, 2007; Cryoconservation methods..., 2017).

Восстановление растительных материалов после криоконсервации

Восстановление для сохранения генетических ресурсов растений становится важной формой оценки во время посткриоконсервации зародышевой плазмы растений (Cryopreservation of forest..., 2016). Скорость экстракции зависит от выбора растительного материала, предварительной обработки, воздействия жидкого азота (LN) и надлежащего размораживания растительного материала после обработки жидким азотом (LN). Криогенные процедуры включают в себя не только замораживание в жидком азоте (LN), но и другие этапы, такие как предварительное культивирование и обезвоживание. Все эти стадии вызывают серьезные нагрузки на образцы и могут привести к генетическим вариациям в регенерантах, извлеченных из криоконсервации (Harding, 2004; Benson, 2008). Оценка генетической стабильности с использованием простых повторов последовательностей (SSR) в растениях *Picea abies*, полученных после витрификации на основе раствора для витрификации растений (PVS), не выявила никаких полиморфных полос по сравнению с таковыми на контроле,

который не подвергался криоконсервации (Survival and genetic stability..., 2013). Fernandes и др. (Cryopreservation of Quercus..., 2008) сообщили, что SSR не выявил полиморфных полос в регенерантах, полученных из криоконсервированных соматических эмбрионов путем инкапсуляции-дегидратации у *Quercus suber*, но некоторые незначительные вариации генетической стабильности были обнаружены с помощью проточной цитометрии (FCM) и полиморфизма длины амплифицированного фрагмента (AFLP). Эти различия были вызваны степенью обезвоживания, и их можно было бы избежать, если бы образцы были обезвожены до 35 % содержания воды, но не до 25 % (Cryopreservation of Quercus..., 2008). Следовательно, необходимо оценить генетическую стабильность регенерантов, полученных в результате криогенных процессов (Harding, 2004; Benson, 2008; Potential applications..., 2014).

Использование растительных тканей, таких как кончики побегов, для криоконсервации может значительно поддерживать генетическую стабильность у регенерантов после криоконсервации, в то время как тщательные манипуляции с растениями, подлежащими криоконсервации, могут помочь сохранить их генетическую стабильность после криоконсервации у лесных деревьев (Tsai, Hubscher, 2004; Harding, 2004; Benson, 2008; Potential applications..., 2014; Cryopreservation as a tool..., 2009).

Заключение

Достижения в области науки и техники имеют решающее значение для устойчивого управления лесным хозяйством, чтобы удовлетворить потребности расту-

щего населения во всем мире. Сегодня в лесном хозяйстве активно идет внедрение инновационных технологий, благодаря которым уже достигнут значительный прогресс. Однако использование

потенциала такой технологии требует инвестиций в исследования и разработки, человеческий капитал, инфраструктуру и потоки знаний.

References

- Bell R. L., Reed B. M. In vitro tissue culture of pear: advance in techniques for micropropagation and germplasm preservation. Proc. 8th IS on Pear // Acta Hort. 2002. № 596. P. 412–418.
- Benson E.E. Cryopreservation of Phyto diversity: A critical appraisal of theory & practice // Critical Reviews in Plant Sciences. 2008. № 27. P. 141–219.
- Chmielarz P. Cryopreservation of conditionally dormant orthodox seeds of *Betula pendula* // Acta Physiol Plant. 2010. № 32. P. 591–596.
- Chmielarz P. Cryopreservation of dormant European ash (*Fraxinus excelsior*) orthodox seeds // Tree Physiol. 2009a. № 29. P. 1279–1285.
- Chmielarz P. Cryopreservation of dormant orthodox seeds of forest trees: mazzard cherry (*Prunus avium* L.) // Ann For Sci. 2009b. № 66. P. 405.
- Cold Storage of Initial Plant Material Affects Positively Somatic Embryogenesis in *Pinus radiata* / I. A. Montalbán, O. García-Mendiguren, T. Goicoa, M. D. Ugarte, P. Moncaleán // New For. 2015. № 46. P. 309–317.
- Conservation in vitro of threatened plants—progress in the past decade / V. Sarasan, R. Crips, M. M. Ramsey, C. Atherton, M. McMichen, G. Prendergast, J. K. Rowntree // In Vitro Cell Dev Biol Plant. 2006. № 42. P. 206–214.
- Cryoconservation methods for extended storage of plant genetic resources. In: Ansari A. A., Gill S. S., Abbas Z. K., Naeem M (eds) Plant biodiversity: Monitoring, assessment and conservation / S. Gantait, U. R. Sinniah, G. Shukla, N. C. Sahu. CAB International, Oxfordshire. 2017. P. 454–468. URL: <https://doi.org/10.1079/9781780646947.0458>
- Cryopreservation as a tool for the conservation of *Eucalyptus* genetic variability: concepts and challenges / K. Padayachee, M. P. Watt, N. Edwards, D. J. Mycock // South For. 2009. № 71. P. 165–170.
- Cryopreservation of forest tree seeds: A mini-review / S. Gantait, S. Kundu, S. H. Wani, P. K. Das // J For Environ Sci. 2016. № 32. P. 311–322.
- Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification / T. Hirano, T. Godo, M. Mii, K. Ishikawa // Plant Cell Rep. 2005. № 23. P. 534–539.
- Cryopreservation of *Malus* germplasm using a winter vegetative bud method: results from 1915 accessions / L. E. Towill, P. L. Forsline, C. Walters, J. W. Waddell, J. Laufmann // CryoLetters. 2004. № 25. P. 323–334.
- Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids via encapsulation–desiccation / S. R. Palanyandy, S. Gantait, S. Subramaniam, U. R. Sinniah // 3 Biotech. 2020. № 10. P. 9. URL: <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1997-9>
- Cryopreservation of *Quercus suber* somatic embryos by encapsulation-dehydration and evaluation of genetic stability / P. Fernandes, E. Rodriguez, G. Pinto, I. Roldán-Ruiz, M. de Loose, C. Santos // Tree Physiol. 2008. № 28. P. 1841–1850.
- Cryopreservation of the banana germplasm collection at the internationala Transit Centre – Biodiversity International / B. Panis, I. Van den Houwe, B. Piette, R. Swennen // Advances in Horticultural Science. 2007. № 21. P. 235–238.

Daisuke K. Cryopreservation of Plant Genetic Resources, Current Frontiers in Cryobiology, Prof. Igor Katkov (Ed.). 2012. 574 p. ISBN: 978-953-51-0191-8.

Desiccation tolerance and cryopreservation of seeds of black poplar (*Populus nigra* L.), a disappearing tree species in Europe / M. Michalak, B.P. Plitta, T. Tytkowski, P. Chmielarz, J. Suszka // *Eur J For Res.* 2015. № 134. P. 53–60.

Differential responses of *Mimusops elengi* and *Manilkara zapota* seeds and embryos to cryopreservation / B. Wen, X. Wang, Y. Tan, S. Song // *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 2013. № 49. P. 717–723.

Effect of loading and vitrification solutions on survival of cryopreserved oil palm polyembryoids / P. Suranthran, S. Gantait, U. R. Sinniah, S. Subramaniam, S. R. S. A. Sarifa, S. H. Roowi // *Plant Growth Regul.* 2012. № 66. P. 101–109. URL: <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9633-7>

Engelmann F. In vitro conservation methods. In: J. A. Callow, B. V. Ford-Lloyd, H. J. Newbury (eds) // *Biotechnology and plant genetic resources.* CAB International, Oxford. 1997. P. 119–161.

Engelmann F., Engels J. M. M. Technologies and strategies for ex situ conservation. In: Engels J. M. M., Rao V. R., Brown A. H. D., Jackson M. T. (eds.). *Managing Plant Genetic Diversity.* CAB International, Wallingford, UK/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 2002. P. 89–104.

Engstrom A. Will deep freeze damage tree seed? // *Tree Plant Notes.* 1966. № 77. P. 28–29.

Environmental Conditions at the Initial Stages of *Pinus radiata* Somatic Embryogenesis Affect the Production of Somatic Embryos / O. García-Mendiguren, I. A. Montalbán, T. Goicoa, M. D. Ugarte, P. Moncaleán // *Trees Struct. Funct.* 2016. № 30. P. 949–958.

Ex situ conservation of tropical rare fruit species. Proc. IS on Trop. & Subtrop / M. N. Normah, M. M. Cyde, E. G. Cho, R. V. Ramantha // *Fruits Acta Hortic.* 2002. № 575. P. 221–230.

Fabre J., Dereudde J. Encapsulation dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips // *CryoLetters.* 1990. № 11. P. 413–426.

Häggman H., Rusanen M., Jokipii S. Cryopreservation of in vitro tissues of deciduous trees. In: Reed B. M. (ed) *Plant cryopreservation: a practical guide* // Springer, New York. 2008. P. 365–386.

Harding K. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review // *CryoLett.* 2004. № 25. P. 3–22.

Improved cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids using droplet-vitrification approach and assessment of genetic fidelity / S. Gantait, U. R. Sinniah, P. Suranthran S. Subramaniam // *Protoplasma.* 2015. № 252. P. 89–101. URL: <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0660-x>

In vitro technology at the US Potato Genebank / J. B. Bamberg, M. W. Martin, J. Abad, M. M. Jenderek, J. Tanner, D. J. Donnelly, A. M. K. Nassar, R. E. Veilleux, R. G. Novy // *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant.* 2016. № 52. P. 213–225.

Johnson K.A. In vitro conservation including rare and endangered plants, heritage plants and important agricultural plants. In: Proceedings of the 7th meeting of the International Association for Plant Tissue Culture and Biotechnology, University of New England, UK. 2002. P. 79–90.

Kaviani B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation // *Aust J Crop Sci.* 2011. № 5. P. 778–800. URL: http://www.cropj.com/kaviani_5_6_2011_778_800.pdf

Key Techniques for Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of *Pinus koraiensis* / F. Gao, C. Peng, H. Wang, I. N. Tretyakova, A. M. Nosov, H. Shen, L. Yang // *Forests.* 2000. № 11. P. 912.

Linington S. H., Pritchard H. W. Gene banks. In: *Encyclopedia of biodiversity* (Levin SA, ed). 3rd ed. Academic Press, New York, USA. 2001. P. 165–181.

Medeiros A. C. S., Cavallari D. A. N. Conservação de germoplasma de Aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl.) I. Germinação de sementes após imersão em nitrogênio líquido (–196 °C) // *Re Bras Sementes.* 1992. № 14. P. 73–75.

Panis B., Lambardi M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: Ruane J., Sonnino A. (eds) *The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources.* FAO, Rome, 2006. P. 61–78.

Potential applications of cryobiotechnology to plant genetic transformation and pathogen eradication / B. Wang, R.-R. Wang, Z.-H. Cui, J.-W. Li, W.-L. Bi, B.-Q. Li, E. A. Ozudogru, G. M. Volk, Q.-C. Wang // *Biotechnol Adv.* 2014. № 34. P. 583–595.

Rajasekharan P. E. Seed cryoservation: problems and prospects // *ICAR Short Course on In Vitro Conservation and Cryopreservation-New Options to Conserve Horticultural Genetic Resources*, Bangalore, India. 2006. P. 21–30.

Reed B., Gupta S., Uchendu E. In vitro genebanks for preserving tropical diversity. In: Normah M. N., Chin H. F., et B.M. (eds) *Conservation of tropical plant species*. Springer, New York. 2013. P. 77–106.

Reed B. M. (ed.). *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer Science+Business Media, LLC, New York. 2008. P. 3–13.

Sakai A., Engelmann F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review // *CryoLetters*. 2007. № 28. P. 151–172.

Sakai A., Hirai D., Niino T. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In: Reed BM (ed) *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, New York. 2008. P. 33–57. URL: https://doi.org/10.1007/978-0-387-72276-4_3

Seed yield and protein content in the Weibullsholm Pisum collection / S. Ø. Solberg, F. Yndgaard, G. Poulsen, R. von Bothmer // *Genet Resour Crop Evol.* 2017. T. 64. № 8. – P. 2035-2047. URL: <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0494-4> (дата обращения: 07.07.2022).

Silayoi B. Cryopreservation of Kluai Namwa (*Musa x paradisiaca* ‘Kluai Namwa’) // *Agric Nat Resour.* 2001. № 35. P. 225–230.

Sinniah U. R., Gantait S. Cryopreservation of immature *Parkia speciosa* Hassk. zygotic embryonic axes following desiccation or exposure to vitrification solution // *Acta Physiol Plant.* 2013. № 35. P. 2629–2634. URL: <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1284-z>

Strategies and priorities in field collections for ex situ conservation: the case of the Israel plant gene bank / O. Barazani, E. Mayzlish-Gati, D. Lifshitz, R. Hadas, A. Keren-Keiserman, S. Golan, T. Faraj, A. Singer, A. Beeran, A. Perevolotsky // *Genet Resour Crop Evol.* 2017. № 64. P. 1–5.

Survival and genetic stability of *Picea abies* embryogenic cultures after cryopreservation using a pregrowth-dehydration method / T. Hazubska-Przybył, P. Chmielarz, M. Michalak, M. Dering, K. Bojarczuk // *Plant Cell Tiss Org Cult.* 2013. № 113. P. 303–313.

Systematic overestimation of Salicaceae seed survival using radicle emergence in response to drying and storage: implications for ex situ seed banking / E. V. Popova, D. H. Kim, S. H. Han, E. Moltchanova, H. W. Pritchard, Y. P. Hong // *Acta Physiol Plant.* 2013. № 35. P. 3015–3025.

Tapiwa K. A. A review on the effectiveness of cryopreservation as a germplasm management option // *JOJ Wild Biodivers.* 2019. № 1. P. 80–83.

Technical Guidelines on management of field and in vitro germplasm collections / B. M. Reed, F. Engelmann, M. E. Dulloo, J. M. M. Engels // *Handbooks for gene banks*, IPGRI, Rome, Italy. 2004. № 7. 106 p.

Thorn J. P. R. Royal Botanic Gardens Kew // *State of the World's Plants*. United Kingdom, London. 2016. URL: https://www.researchgate.net/publication/320673453_State_of_the_World's_Plants_2016 (дата обращения: 07.07.2022).

Toldam-Andersen T. B., Nygaard T. B., Krogholm K. S. Cryopreservation of dormant buds of apple cultivars in a mild maritime winter climate // *Advances in Horticultural Science.* 2007. № 21. P. 193–197.

Tsai C.-J., Hubscher S.J. Cryopreservation in *Populus* functional genomics // *New Phytol.* 2004. № 164. P. 73–81.

Uosukainen M., Laamanen J., Nukari A. Cryo-preservation in certified plant production // *Advances in Horticultural Science.* 2007. № 21. P. 258–260.

Uragami A., Sakai A., Nagai M. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown in vitro // *Plant Cell Rep.* 1990. № 9. P. 328–331.

Информация об авторах

Д. Чанотей – магистр;

А. Е. Осипенко – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент.

Information about the authors

D. Chanotey – master's degree;

A. E. Osipenko – candidate of agricultural sciences, associate professor.

Статья поступила в редакцию 07.07.2022; принята к публикации 30.08.2022.

The article was submitted 07.07.2022; accepted for publication 30.08.2022.
