

УДК 634.7:633.88:631.527:57.086.13

А.В. Павлов^{1,*}, В.Г. Вержук¹, С.Ю. Орлова¹, О.Е. Радченко¹, М.В. Ерастенкова²,
А.Ш. Додонова³, Е.А. Гаврилькова³, М.Н. Ситников¹, Г.И. Филипенко¹, С.В. Мурашев⁴

Криоконсервирование как метод сохранения отдельных видов плодово-ягодных культур и дикорастущих лекарственных растений

UDC 634.7:633.88:631.527:57.086.13

A.V. Pavlov^{1,*}, V.G. Verzhuk¹, S.Yu. Orlova¹, O.Ye. Radchenko¹,
M.V. Yerastenkova², A.Sh. Dodonova³, Ye.A. Gavrilkova³,
M.N. Sitnikov¹, G.I. Filipenko¹, S.V. Murashev⁴

Cryopreservation as a Method to Preserve Some Fruit and Berry Crops and Wild Medicinal Plants

Реферат: Исследовано влияние криоконсервирования на показатели жизнеспособности черенков черной смородины (*Ribes nigrum* L.), пыльцы черешни (*Cerasus avium* L. Moench), пыльцы сливы диплоидной *Prunus rossica* Erem. и сливы домашней *Prunus domestica* L., а также семян дикорастущих лекарственных растений: гармалы обыкновенной (*Peganum harmala* L.), пижмы улутавской (*Tanacetum ulutavicum* Tzvel.) и серпухи рассеченной (*Serratula dissecta* Ledeb.). Показатель жизнеспособности у черенков 5 сортов *R. nigrum* L. после криоконсервирования снизился; у пыльцы 7 сортов *C. avium* (L.) (всего 17) увеличился, у 6 не изменился, у 4 уменьшился; у 3 сортов *P. rossica* Erem. (всего 9) увеличился, у 3 не изменился, у 3 уменьшился; у 6 сортов *P. domestica* L. (всего 13) увеличился, у 3 не изменился, у 4 снизился; у семян *P. harmala* L. не изменился; у семян *S. dissecta* Ledeb. увеличился. Криопротекторы и отогрев: *P. harmala* L. – глицерин 100%, медленный отогрев; *T. ulutavicum* Tzvel. – сахароза 10%, медленный отогрев; *S. dissecta* Ledeb. – ДМСО 3%, быстрый отогрев.

Ключевые слова: криоконсервирование, вегетативные побеги, пыльца, семена, криопротекторы.

Реферат: Досліджено вплив криоконсервування на показники життєздатності живців чорної смородини (*Ribes nigrum* L.), пилку черешні (*Cerasus avium* L. Moench), пилку сливи диплоїдної *Prunus rossica* Erem. і сливи домашньої *Prunus domestica* L., а також насіння дикорослих лікарських рослин: гармали звичайної (*Peganum harmala* L.), пижма улутавського (*Tanacetum ulutavicum* Tzvel.) і серпухи розсіченої (*Serratula dissecta* Ledeb.). Показник життєздатності у живців 5 сортів *R. nigrum* L. після криоконсервування знизився; у пилку 7 сортів *C. avium* L. (всього 17) збільшився, у 6 не змінився, у 4 зменшився; у 3 сортів *P. rossica* Erem. (усього 9) збільшився, у 3 не змінився, у 3 зменшився; у 6 сортів *P. domestica* L. (всього 13) збільшився, у 3 не змінився, у 4 знизився; у насіння *P. harmala* L. не змінився; у насіння *S. dissecta* Ledeb. збільшився. Кріопротектори та нагрів: *P. harmala* L. – глицерин 100%, повільне відігрівання; *T. ulutavicum* Tzvel. – сахароза 10%, повільне нагрівання; *S. dissecta* Ledeb. – ДМСО 3%, швидке нагрівання.

Ключові слова: криоконсервування, вегетативні пагони, пилок, насіння, криопротектори.

Abstract: The cryopreservation effect on viability of black currant cuttings (*Ribes nigrum* L.), sweet cherry pollen (*Cerasus avium* L. Moench), *Prunus rossica* Erem. diploid plum and *Prunus domestica* L. garden plum pollen, as well as the seeds of wild medicinal plants: Syrian rue (*Peganum harmala* L.), tansy (*Tanacetum ulutavicum* Tzvel.) and sawwort (*Serratula dissecta* Ledeb.) was studied. The viability in 5 cultivars of *R. nigrum* L. was decreased after cryopreservation; in 7 cultivars of *C. avium* L. (17 cultivars totally) it was increased, in 6 cultivars there were no changes, in 4 ones it was decreased; in 3 varieties of *P. rossica* Erem. (9 cultivars totally) the one was increased, in 3 ones there were no changes, in 3 ones it decreased; in 6 cultivars of *P. domestica* L. (13 cultivars totally) this index was increased, in 3 ones there were no changes, in 4 ones it decreased; in *P. harmala* L. seeds it was unchanged; in the seeds of *S. dissecta* Ledeb. it was increased. For the seeds of three medicinal plants there were selected the optimal concentrations of cryoprotectants and thawing modes as follows: *P. harmama* L. – 100% glycerol, slow freeze-thawing; *T. ulutavicum* Tzvel. – 10% sucrose, slow warming; *S. dissecta* Ledeb. – 3% DMSO, rapid warming.

Key words: cryopreservation, vegetative shoots, pollen, seeds, cryoprotectants.

¹Федеральный исследовательский центр «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. М.И. Вавилова», м. Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный аграрный университет, Россия

³Карагандинский государственный университет им. Е.А. Букетова, м. Караганда, Казахстан

⁴Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Россия

¹N.I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

²St. Petersburg State Agrarian University, St. Petersburg, Russia

³E.A. Buketov Karaganda State University, Karaganda, Kazakhstan

⁴St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, St. Petersburg, Russia

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. В. Морська, 42, м. Санкт-Петербург, Росія 190000;
тел.: +7 (812) 314-77-14
електронна пошта: pavlov-al@bk.ru

*To whom correspondence should be addressed:

42, V. Morska str., St. Petersburg, Russian 190000;
tel.: +7 812 314 7714
e-mail: pavlov-al@bk.ru

Надійшла 01.06.2018

Прийнята до друку 18.02.2019

Received June, 01, 2018

Accepted February, 18, 2019

© 2019 A.V. Pavlov, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

В биологическом разнообразии нашей планеты основное место занимают культурные растения [13]. Сохранение растительного биоразнообразия проводится в условиях *in situ* (в полях, лесах, садовых массивах) и *ex situ* (в коллекционных садах и питомниках), а также на опытно-селекционной станции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР). Однако вследствие нестабильности климатических и экологических условий существует угроза потери коллекционных образцов. Альтернативным методом хранения вегетативно размножаемых плодовых и ягодных культур является криоконсервирование в условиях сверхнизких температур ($-185 \dots -196^\circ\text{C}$), что позволяет сохранять жизнеспособность генофонда культурных плодовых и ягодных растений в течение неограниченного времени [10, 24]. При этом растительный материал, подвергаемый воздействию сверхнизких температур, остается генетически стабильным [17].

Криоконсервирование пыльцы плодовых культур важно не только для сохранения генетических ресурсов, но и для проведения селекционных программ [3, 4]. Погодные условия существенно влияют на формирование пыльцы косточковых растений. Так, при аномально неблагоприятных погодных условиях пыльца имеет пониженную жизнеспособность, а криоконсервирование позволяет избирательно использовать в селекции собранную в благоприятные годы качественную пыльцу с высокой жизнеспособностью [5, 15].

Криоконсервирование семян дикорастущих лекарственных растений имеет большое значение для создания национального генетического банка флоры Казахстана. Первые разработки способов замораживания-отогрева семян для хранения в жидком азоте проводили в конце 80-х гг. [26, 29]. В Казахстане на основе методических разработок криокомплекса ВИР [6, 19, 23] впервые начали закладывать на длительное хранение в жидком азоте семена ценных лекарственных растений [9, 14].

Для исследований *Ribes nigrum* L. использовали сорта, пригодные для выращивания в северных регионах: раннеспелые, высокоурожайные, устойчивые к болезням, обладающие качеством сухого отрыва ягод. Ранее исследований пыльцы *Cerasus avium* L. не проводили, а для работы с пыльцой *Prunus domestica* L. и *Prunus rossica* Erem. оценивали привлеченный коллекционный материал.

Цель работы – изучение влияния длительного воздействия сверхнизких температур ($-183 \dots -185^\circ\text{C}$) на показатель жизнеспособности черен-

Cultured plants play a significant role in biological diversity of our planet [4]. Plant biodiversity is conserved *in situ* (in fields, forests, garden areas) and *ex situ* (in collection gardens and forest nurseries). The Experimental Plant-Breeding Station of the N.I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR) is an important participant of these activities. Unstable climate and environmental conditions entail a risk of the loss of the collection specimens. Cryopreservation under extremely low temperatures ($-185 \dots -196^\circ\text{C}$) allows to preserve the viability of gene pool of cultured fruit and berry plants for an unlimited time and thus it is an alternative method for conservation of vegetatively reproduced fruit and berry crops [9, 24]. Herewith, the plant material exposed to ultralow temperatures remains genetically stable [11].

Cryopreservation of fruit crop pollen is important not only for conservation of genetic resources, but also for the breeding programs [26, 27]. Weather conditions significantly affect the formation of pollen of stone fruits. For example, extremely unfavourable weather conditions could result in a reduced viability of pollen and cryopreservation enables the use of the pollen with a high viability, selected in favourable years [28, 33].

Cryopreservation of wild medicinal plant seeds is of great importance for establishing of the Kazakhstan national genetic bank of flora. The methods to freeze-thaw the seeds and store in liquid nitrogen were firstly developed in the late 80 s. [6, 15]. Based on the methodological developments of the VIR cryounit [13, 21, 29] the Kazakh scholars initiated the programs to conserve the seeds of valuable medicinal plants using long-term storage in liquid nitrogen [5, 8].

Investigations in *Ribes nigrum* L. involved the cultivars suitable for growing in the northern regions, namely early ripening, high-yielding, disease-resistant, having quality of dry pick off berries. To date there were no studies conducted in *Cerasus avium* L. pollen, collection material was assessed to work with *Prunus domestica* L. and *Prunus rossica* Erem. pollen.

The research aim was to study the effect of long-term exposure of ultra-low temperatures ($-183 \dots -185^\circ\text{C}$) on viability of *Ribes nigrum* L. cuttings, *Cerasus avium* L., *Prunus rossica* Erem., *Prunus domestica* L. pollen, as well as on growth of seeds of medicinal plants such as *Peganum harmala* L., *Tanacetum ulutavicum* Tzvel., *Serratula dissecta* Ledeb.

To protect the seeds of medicinal plants against possible cryodestruction during cryopreservation by a direct immersion into liquid nitrogen, the

ков *Ribes nigrum* L., пыльцы *Cerasus avium* L., *Prunus rossica* Erem., *Prunus domestica* L., а также на ростовые показатели семян лекарственных растений *Peganum harmala* L., *Tanacetum ulativicum* Tzvel., *Serratula dissecta* Ledeb.

Для предохранения семян лекарственных растений от вероятной криодеструкции в процессе криоконсервирования путем прямого погружения в жидкий азот исследовали защитное действие криопротекторов при быстром и медленном способах отогрева.

Материалы и методы

Для экспериментов использовали черенки черной смородины *Ribes nigrum* L. (5 сортов), пыльцу сливы домашней *Prunus domestica* L. (13 сортов), сливы диплоидной *Prunus rossica* Erem. (9 сортов) и черешни *Cerasus avium* L. Moench. (17 сортов). Все образцы принадлежат коллекции генетических ресурсов растений ВИР. Семена лекарственных растений были собраны в Казахстане, черенки черной смородины отобраны в коллекционном питомнике филиала. Полярной опытной станции ВИР.

Для криоконсервирования черенков *Ribes nigrum* L. использовали способ, применяемый для работы с почками яблони [28], в нашей модификации. Черенки *Ribes nigrum* L. нарезали в зимний период. Жизнеспособность черенков оценивали путем проращивания в воде при 21°C в условиях искусственного освещения. Затем черенки разделяли на небольшие сегменты с 2–3 почками и подсушивали при температуре –4...–5°C до остаточной влажности 28–32%. Далее растительный материал охлаждали по следующей процедуре: температуру в замораживателе марки MDF-U442 (T), («Sanyo Medical Freezer», Sanyo Electric Biomedical Co., LTD., Япония.) каждый час снижали на 2°C в диапазоне –5...–32°C, затем температуру каждый час понижали на 4°C и достигали –50°C. При этом до начала следующего часа биоматериал инкубировали при заданной температуре. После образцы помещали на длительное хранение в пары жидкого азота (–183...–185°C). Через 6 месяцев черенки отогревали на водяной бане при 37°C в течение 4–5 мин. Для определения жизнеспособности растительный материал высаживали в поле в весенне-летний период [8].

Пыльцу *Cerasus avium* L., *Prunus rossica* Erem., *Prunus domestica* L. собирали в мае–июне. С деревьев одного сорта в сухую погоду собирали по 200–250 хорошо развитых бутонов и в лабораторных условиях отделяли пыльники. В течение 2–3-х суток пыльцу подсушивали до сыпу-

protective effect of cryoprotectants at rapid and slow warming was investigated.

Materials and methods

In the experiments the cuttings of *Ribes nigrum* L. black currant (5 cultivars), *Prunus domestica* L. garden plum pollen (13 varieties), *Prunus rossica* Erem. diploid plum pollen (9 cultivars) and *Cerasus avium* L. Moench sweet cherry pollen (17 cultivars) were used. All these samples were obtained from the collection of plant genetic resources of VIR. Seeds of medicinal plants were collected in Kazakhstan, cuttings of black currant were selected in the collection nursery of the branch of the Polar Experimental Station of VIR.

To cryopreserve *Ribes nigrum* L. cuttings, we used own method applied earlier for the apple buds [7]. The cuttings of *Ribes nigrum* L. were collected in winter, their viability was evaluated by sprouting in water at 21°C under artificial lighting. Then, the cuttings were divided into small segments with 2–3 buds and dried at –4...–5°C to a residual humidity of 28–32%. Hereafter, the plant material was cooled according to the following procedure: the temperature in MDF-U442 (T) freezer (Sanyo Medical Freezer, Sanyo Electric Biomedical Co., LTD., Japan) was reduced every hour by 2°C within the range of –5...–32°C, then it was lowered by 4°C every hour and reached –50°C. Herewith prior to the beginning of the next hour the biomaterial was incubated at a fixed temperature. Then the samples were placed into liquid nitrogen vapour for a long-term storage (–183...–185°C). After 6 months, the cuttings were warmed in a water bath at 37°C for 4–5 min. They were planted in a field within spring-summer period to test the viability [31].

Pollen of *Cerasus avium* (L.), *Prunus rossica* Erem., *Prunus domestica* L. was collected in May–June. We collected 200–250 well-grown buds during dry period from the trees of the same variety and the anthers were separated under laboratory conditions. For 2–3 days, the pollen was dried to a loose state at 21°C and immersed into liquid nitrogen in cryotubes. To determine viability, the pollen was warmed for 5–10 mins in air (21°C), then germinated without light in a thermostat (21°C) with agarized nutrient medium containing 10% sucrose. A suspension of pollen in a distilled water was applied to the surface of nutrient medium. Pollen with pollen tube, the length of which was bigger than the diameter of pollen grain were considered as germinated. The number of germinated pollen grains was counted with microscope at a 100-fold magnification



чего состояния при температуре 21°C и в криопробирках погружали в жидкий азот. Для определения жизнеспособности пыльцу отогревали 5–10 мин на воздухе (21°C), затем проращивали без света в термостате (21°C) на агаризованной питательной среде, содержащей 10% сахаразы. На поверхность питательной среды наносили суспензию пыльцы в дистиллированной воде. Проросшей считали пыльцу с пыльцевой трубкой, длина которой была больше диаметра пыльцевого зерна. Количество проросших пыльцевых зерен подсчитывали под микроскопом при 100-кратном увеличении в 30–50 случайных полях зрения в 6–8 каплях суспензии пыльцы [7].

Для эксперимента отбирали образцы семян лекарственных растений трех видов: гармала обыкновенная (*Peganum harmala* L., сем. *Nitrariaceae* Lindl.), пижма улутавская (*Tanacetum ulutavicum* Tzvel., сем. *Asteraceae*.) и серпуха рассеченная (*Serratula dissecta* Ledeb., сем. *Asteraceae*.). Семена для экспериментов отбирали случайным образом и не очищали от плодных оболочек.

Peganum harmala L. – многолетнее травянистое растение высотой до 50 см, произрастающее повсеместно в равнинных районах, исключая высокогорья, но значительные заросли встречаются только на территории Южного Казахстана. Гармала обыкновенная является ценным лекарственным растением, поскольку содержит значительное количество алкалоидов, производных хиназолина и индола.

Tanacetum ulutavicum Tzvel. – многолетнее растение, эндемик, встречающийся только на скалах и каменистых склонах гор Улытау (Казахстан) [20, 21, 27]. Исходная всхожесть семенного материала пижмы улутавской составила (33 ± 2)%. Данное растение содержит в соцветиях флавоноиды, которые обладают желчегонным действием.

Serratula dissecta Ledeb. – многолетнее растение, эндемик, произрастающий на каменистых и щебнистых склонах гор, в равнинных степях Центрального и Восточного Казахстана, а также в Джунгарском Алатау [21]. Серпуха рассеченная является ценным лекарственным растением, поскольку содержит фитоэктостероиды, обладающие анаболическим, гипополипидемическим, противовоспалительным, адаптогенным, гемореологическим свойствами [1].

Всхожесть и энергию прорастания семян исследовали по методике, представленной в работах М.С. Зориной и С.П. Кабанова [16], а также М.В. Мальцевой [18]. В лабораторных условиях семена предварительно дезинфицировали 0,5%-м раствором $KMnO_4$ и 75%-м раствором гипохлорита кальция, проращивали в климатической ка-

in 30–50 random fields of view in 6–8 drops of a pollen suspension [30].

In the study we used the seeds of following medicinal plants: Syrian rue (*Peganum harmala* L., *Nitrariaceae* Lindl. family), tansy (*Tanacetum ulutavicum* Tzvel., *Asteraceae* family) and sawwort (*Serratula dissecta* Ledeb. *Asteraceae*). The seeds for experiments were randomly selected and seed coat was not removed.

Peganum harmala L. is a perennial herbaceous plant with a height of up to 50 cm, which occurs widely in lowland areas, excluding high mountains. Significant thickets are found mainly in South Kazakhstan. Syrian rue is a valuable medicinal plant, whereas it contains a significant amount of alkaloids, quinazoline and indole derivatives.

Tanacetum ulutavicum Tzvel. is a perennial plant, endemic, found only on the rocks and stony slopes of the Ulytau Mountains (Kazakhstan) [14, 16, 32]. The initial germination of tansy seed grains was (33 ± 2)%. This plant contains flavonoids in inflorescences having a choloretic effect.

Serratula dissecta Ledeb. is a perennial plant, endemic, growing on rocky and gravelly mountain slopes, in the plain steppes of Central and Eastern Kazakhstan, as well as in the Dzungarian Alatau [16]. Sawwort is a valuable medicinal plant, whereas it contains phytoecdysteroids with anabolic, lipid-lowering, anti-inflammatory, adaptogenic, hemorheological properties [1].

Germination capacity and rate were investigated according to the method reported by M.S. Zorina and S.P. Kabanov [34], as well as M.V. Maltseva [12]. The surface of the seeds was sterilized with 0.5% $KMnO_4$ and 75% calcium hypochlorite solutions under laboratory conditions, and then the seeds were germinated in a climatic chamber at 24°C.

The significance of differences of compared samples for three independent experiments was assessed using Student's t-test after testing for normality of distribution using the method of N.L. Udolskaya [25].

The length of period of seeds stay in a viable state depends significantly on humidity and storage temperature [13, 23]. Optimum moisture content for seeds of most plant species is 4–7% [23]. Species specificity of seed response to storage temperature and rate of cooling or thawing have been shown in many studies [6, 13, 22]. In our work, we used two methods to cryopreserve *Peganum harmala* L. and *Serratula dissecta* Ledeb. seeds [5]. The first method consists in the freezing without cryoprotectants, i. e., the temperature in cooling chamber was reduced by 4°C every hour within the range of –5...–32°C; in another case, the temperature was lo-

мере при температуре 24°C. Значимость различий сравниваемых выборок для трех независимых экспериментов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента после проверки нормальности распределения по методике Н.Л. Удольской [25].

Известно, что длительность хранения семян в жизнеспособном состоянии значительно зависит от влажности и температуры хранения [19, 34]. Для семян большинства видов растений оптимальная влажность составляет 4–7% [34]. Видоспецифичность реакции семян на температуру хранения и скорость замораживания-отогрева показана во многих исследованиях [19, 26, 33]. В нашей работе использовали два способа криоконсервирования семян *Peganum harmala* L. и *Serratula dissecta* Ledeb. [14]. Первый способ – замораживание без криопротекторов. Температуру в холодильной камере каждый час снижали на 4°C в диапазоне –5...–32°C; в другом виде эксперимента температуру каждый час понижали на 8°C в диапазоне –5...–50°C. При этом до начала следующего часа биоматериал инкубировали при заданной температуре. После этого образцы помещали на длительное хранение в пары жидкого азота. Отогрев семян проводили при комнатной температуре. Второй способ – семена после 10-минутного инкубирования в растворах криопротекторов быстро замораживали прямым погружением в жидкий азот. Контролем служили показатели жизнеспособности семян до замораживания. Для замораживания культур, отличающихся строением семенных оболочек, применяли разные криопротекторы. В экспериментах использовали нетоксичные криопротекторы и их смеси: 100% глицерин; водные растворы сахарозы 10 и 20%; смесь 10% сахарозы и 50% глицерина на дистиллированной воде [12, 22, 32]. Известно, что криопротектор диметилсульфоксид (ДМСО) в концентрации 40% практически предотвращает кристаллизацию, но приводит к разрушению клетки, поэтому, как правило, используют концентрацию 10–15% [2]. В нашем исследовании для большей безопасности ДМСО применяли в концентрациях 1, 3 и 5%. Использовали два типа отогрева биоматериала: быстрый (на водяной бане 40°C) и медленный (на воздухе при температуре 22°C). Ранее влияние криопротекторов на семенной материал без замораживания не исследовали, поскольку глицерин и сахароза не являются токсичными веществами, а ДМСО применяли в безопасных для семян концентрациях [2, 22, 30, 31, 35]. Значимость различий сравниваемых выборок оценивали с помощью t-критерия Стьюдента после проверки нор-

wered each hour by 8°C within the range of –5...–50°C. Before the beginning of the next hour, the biomaterial was incubated at the given temperature. Hereafter, the samples were stored for a long time in liquid nitrogen vapour. The seeds were warmed at room temperature. The second method was the rapid freezing of seeds by a direct immersion into liquid nitrogen, after 10 min incubation in cryoprotectant solutions. The indices of seed viability prior to freezing were the control. Different cryoprotectants were used for freezing of the cultivars with variations in the structure of the seed coat. Non-toxic cryoprotectants and their mixtures, *i. e.* 100% glycerol; 10 and 20% sucrose aqueous solutions; a mixture of 10% sucrose and 50% glycerol with distilled water [10, 19, 20] were applied in experiments. Use of dimethyl sulfoxide (DMSO) cryoprotective agent at a concentration of 40% has been known to prevent virtually any crystallization, but may lead to cell injury, therefore, a concentration of 10–15% is more conventional [2]. In our study DMSO was used in safe concentrations of 1, 3 and 5%. Two types of biomaterial warming were applied, *i. e.*, rapid (in 40°C water bath) and slow (in air at 22°C). Previously, the effects of cryoprotectants on seed without freezing were not investigated, because glycerol and sucrose are not toxic substances, and DMSO was used in concentrations safe for seeds [2, 17–19, 35]. The significance of the differences of compared samples was evaluated using Student's t-test after checking the normality of the distribution. The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Numerous findings for pollen and cuttings were statistically processed using StatSoft Statistica 13.0 software (TIBCO Software Inc., USA).

Results and discussion

Table 1 shows the indices of initial (prior to cryopreservation) viability of black currant cuttings (*Ribes nigrum* L.) and the index after cryopreservation.

The initial viability index of currant cuttings among cultivars was 80–90%; after storage in liquid nitrogen vapour, the viability of cuttings decreased significantly for all the cultivars compared to the initial one: from 6.4 (Severnoye siyaniye) to 10.6% (Olesha) (Table 1). During spring-summer, the plants grew well, in summer they sprouted young healthy shoots and formed fruitful buds the following year.

The results of viability evaluation for sweet cherry pollen of 17 cultivars (*Cerasus avium* L. Moench) prior to and after cryopreservation are presented in Table 2. After storage of pollen of Iput', Rondo, Krasnaya Plotnaya, Orlovskaya rozo-



мальности распределения. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистическую обработку большого количества данных исследования пыльцы и черенков выполняли в программе «StatSoft Statistica 13.0» («TIBCO Software Inc.», США).

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены показатели исходной (до криоконсервирования) жизнеспособности черенков черной смородины (*Ribes nigrum* L.) и после криоконсервирования.

Показатель исходной жизнеспособности черенков смородины по сортам составлял 80–90%, после криоконсервирования в парах жидкого азота процент жизнеспособных черенков по сравнению с исходным значимо снизился у всех сортов: от 6,4 (сорт Северное сияние) до 10,6%

(сорт Олеша) (табл. 1). В период весенне–летней вегетации растения хорошо развивались, летом они дали молодые здоровые побеги и заложили на следующий год плодоносящие почки.

Результаты оценки показателя жизнеспособности пыльцы 17 сортов черешни (*Cerasus avium* L. Moench) до и после криоконсервирования представлены в табл. 2. После криоконсервирования пыльцы сортов Ипуть, Рондо, Красная Плотная, Орловская розовая, Veidenbergi maguskirss, Tõmmu и Речица показатель жизнеспособности значимо увеличился, у сортов Бряночка, Алебастровая, Брянская розовая и Аделина – значимо снизился (на 8,7–17,9%), у сортов Ленинградская розовая, Заря Востока, Красная сладкая, Памяти Астахова, Радица и Кати – различия были незначимыми.

Показатель жизнеспособности пыльцы сливы до и после криоконсервирования в парах жидкого азота изучали у 9 сортов сливы диплоидной *Prunus rossica* Erem. и у 13 сортов сливы домашней *Prunus domestica* L. (табл. 3). Исходная жизнеспособность пыльцы у образцов сливы диплоидной *Prunus rossica* Erem. значительно различается, что определяется, по-видимому, сортовыми особенностями и погодными условиями в период формирования мужского гаметофита. У 9-ти сортов сливы *Prunus domestica* L. (всего 13 сортов) показатель исходной жизнеспособности пыльцы значимо превысил 25,27%. Жизнеспособность пыльцы сортов сливы домашней западноевропейского происхождения Pixy и Vil-

Таблица 1. Показатели жизнеспособности черенков черной смородины *Ribes nigrum* L. до и после хранения в парах жидкого азота по данным 2017 г. ($M \pm SE$)

Table 1. Viability indices of cuttings of *Ribes nigrum* L. black currant prior to and after storage in liquid nitrogen vapour according to the data of 2017 ($M \pm SE$).

Сорт Cultivar	Номер каталога ВИР Code in VIR catalogue	Жизнеспособность черенков, % Viability of cuttings, %		Значимость различий (p) Significance of differences (p)
		исходная Initial	после хранения в парах жидкого азота After storage in liquid nitrogen vapors	
Лазурь Lazur'	32651	83,3 ± 0,9	73,3 ± 1,8	0,007
Кольский сувенир Kol'skiy сувенир	40740	90,7 ± 0,7	83,3 ± 1,7	0,015
Сюрприз Елсаковой Syurpriz Elsakovoy	40739	83,3 ± 1,7	73 ± 1,5	0,010
Северное сияние Severnoye siyaniye	40738	90,7 ± 0,7	84,3 ± 0,7	0,003
Олеша Olesha	42634	86,3 ± 1,9	75,7 ± 0,7	0,006

vaya, Veidenbergi maguskirss, Tõmmu and Re-chitsa varieties, the viability index increased significantly, in Bryanochka, Alebastrovaya, Bryanskaya rozovaya and Adelina cultivars it was significantly decreased (by 8.7–17.9%), in Leningradskaya rozovaya, Zarya Vostoka, Krasnaya Sladkaya, Pamyati Astakhova, Raditsa and Kati cultivars the differences were insignificant.

The plum pollen viability prior to and after cryopreservation in liquid nitrogen vapor was studied in 9 cultivars of *Prunus rossica* Erem. diploid plum and in 13 cultivars of *Prunus domestica* L. garden plum (Table 3). Initial viability of pollen in *Prunus rossica* Erem. diploid plum samples considerably differs, that is likely determined by the varietal characteristics and weather conditions during the formation of male gametophyte. In 9 varieties of *Prunus domestica* L. plums (out of 13 varieties), the initial viability of pollen significantly exceeded 25.27%. The pollen viability of garden plum of Western European origin Pixy and Vilmitar, as well as Sinyaya Porkhovskaya (Pskov Region, Russia) was less than 10%, due to their varietal characteristics. After storage the viability index of *Prunus rossica* Erem. pollen of Aureus, Podarok Sankt Peterburgu, №19–32 cultivars was significantly increased; in Asaloda, Timiryazevskaya and Nesmeyana cultivars it was significantly decreased compared to the initial index, in Mara, Soneyka and № 34–33 cultivars the differences were insignificant. After cryopreservation of *Prunus domestica* L. garden plum pollen

Таблица 2. Показатели жизнеспособности пыльцы черешни *Cerasus avium* L. до и после хранения в парах жидкого азота по данным 2017 г. ($M \pm SE$)

Table 2. Viability indices of *Cerasus avium* L. sweet cherry pollen prior to and after storage in liquid nitrogen vapour according to the data of 2017 ($M \pm SE$)

Сорт Cultivar	Номер каталога Code in VIR catalogue	Прорастание пыльцы, % Pollen germination, %		Значимость различий (p) Significance of differences (p)
		до криоконсервирования Prior to cryopreservation	после криоконсервирования After cryopreservation	
Ленинградская розовая Leningradskaya rozovaya	5724	61,8 \pm 4,0	67,8 \pm 2,2	0,181
Ипуть Iput'	42192	17,6 \pm 2,4	65,7 \pm 3,3	< 0,001
Заря Востока Zarya Vostoka	42122	60,3 \pm 6,5	64,6 \pm 2,8	0,540
Рондо Rondo	15882A	46,4 \pm 3,2	63,8 \pm 3,2	< 0,001
Красная плотная Krasnaya Plotnaya	5713	18,5 \pm 1,6	57,0 \pm 3,1	< 0,001
Красная сладкая Krasnaya Sladkaya	5714	50,0 \pm 4,1	53,7 \pm 4,5	0,549
Брянская Розовая Bryanskaya rozovaya	15874A	48,9 \pm 1,8	37,1 \pm 2,9	0,001
Аделина Adelina	15873A	53,5 \pm 4,0	36,2 \pm 2,0	< 0,001
Алебастровая Alebastrovaya	11652	43,9 \pm 2,9	35,0 \pm 1,3	0,004
Орловская Розовая Orlovskaya rozovaya	42099	14,0 \pm 1,3	31,8 \pm 1,6	< 0,001
Памяти Астахова Pamyati Astakhova	15903A	35,6 \pm 4,4	31,4 \pm 1,4	0,351
Радица Raditsa	42092	23,5 \pm 3,5	31,0 \pm 2,4	0,086
Veidenbergi maguskirss Veidenbergi maguskirss	38712	21,5 \pm 1,7	26,9 \pm 1,5	0,022
Тõтму Tõtmu	38716	15,0 \pm 3,4	26,1 \pm 2,3	0,015
Речица Rechitsa	42093	13,6 \pm 1,3	25,0 \pm 1,1	< 0,001
Бряночка Bryanochka	42191	27,2 \pm 1,8	18,5 \pm 1,4	< 0,001
Kati Kati	38717	14,9 \pm 2,2	17,6 \pm 1,1	0,290

Таблица 3. Показатель жизнеспособности пыльцы сливы диплоидной *Prunus rossica* Erem. и сливы домашней *Prunus domestica* L. до и после хранения в парах жидкого азота по данным 2017 г. ($M \pm SE$)

Table 3. Viability of pollen of *Prunus rossica* Erem. diploid plum and *Prunus domestica* L. garden plum prior to and after storage in liquid nitrogen vapour according to the data of 2017 ($M \pm SE$)

Сорт Cultivars	Номер каталога Code in VIR catalogue	Прорастание пыльцы, % Pollen germination, %		
		до криоконсервирования Prior to cryopreservation	после криоконсервирования After cryopreservation	Значимость различий (p) Significance of differences (p)
Тулская Черная Tulskaya Chernaya	36704	49,2 ± 1,6	71,0 ± 2,7	< 0,001
Татарская Желтая Tatarskaya Zheltaya	35655	63,9 ± 1,3	69,1 ± 2,7	0,085
Десертная Ранняя Desertnaya Rannyyaya	41143	44,6 ± 2,9	62,3 ± 2,2	< 0,001
№49–15	14571A	65,6 ± 1,6	51,5 ± 1,9	< 0,001
Тернослива №1 Ternosliva №1	15850A	48,4 ± 4	51,3 ± 4,1	0,609
Ворон Эрик Крупный Voron Erik Krupnyi	15559A	28,1 ± 1,8	50,0 ± 3,9	< 0,001
Нарач Narach	43018	27,9 ± 5,8	46,2 ± 1,9	0,006
Поздноцветущая 19–19 Pozdnotsvetushchaya 19–19	45283	43,7 ± 2	36,1 ± 2,2	0,010
Синяя Порховская Sinyaya Porkhovskaya	4016	6,0 ± 1,5	12,5 ± 2,3	0,015
Pixy	36709	4,3 ± 0,5	8,4 ± 1,3	< 0,001
Кисаровская Желтая Kisarovskaya Zheltaya	43007	33,3 ± 12,6	7,0 ± 3,9	0,009
Vilmitar	15380A	3,4 ± 0,6	2,4 ± 0,4	0,191
Венгерка Поздняя Vengerka Pozdnyaya	43001	37,5 ± 12,5	2,1 ± 2,1	< 0,001
Ауреус Aureus	43068	5,6 ± 2,8	54,8 ± 4,9	< 0,001
Асалода Asaloda	43046	75 ± 3,4	36,3 ± 1,9	< 0,001
№19–32	43047	13,6 ± 1,7	28,1 ± 2,6	< 0,001
Тимирязевская Timiryazevskaya	43041	29 ± 3,8	20,5 ± 1,4	0,024
Подарок Санкт-Петербургу Podarok Sankt Peterburgu	41445	5,6 ± 1,2	10,5 ± 2,4	0,034
Мара Mara	43047	9,4 ± 0,8	8,5 ± 2,9	0,776
Сонейка Soneyka	43043	1,1 ± 1,1	2,4 ± 0,5	0,419
№34–33	43069	1,9 ± 0,9	1,4 ± 0,5	0,650
Несмеяна Nesmeyana	430042	4,4 ± 1,4	0,8 ± 0,3	< 0,001

mitar, а также Синей Порховской (Псковская область, Россия) была менее 10%, что обусловлено их сортовыми особенностями. После криоконсервирования показатель жизнеспособности пыльцы *Prunus rossica* Erem. сортов Ауреус, Подарок Санкт-Петербургу, №19–32 значительно увеличился; у сортов Асалода, Тимирязевская и Несмеяна значительно уменьшился по сравнению

of Voron Erik Krupnyi, Desertnaya Rannyyaya, Sinyaya Porkhovskaya, Tulskaya Chernaya, Pixy, Narach cultivars this index was significantly increased; in №49–15, Kisarovskaya Zheltaya, Pozdnotsvetushchaya, Vengerka Pozdnyaya cultivars it was decreased, in Tatarskaya Zheltaya, Ternosliva №1 and Vilmitar varieties, the differences were insignificant.

с исходным, у сортов Мара, Сонейка и № 34–33 различия были незначимы. После криоконсервирования пыльцы сливы домашней *Prunus domestica* L. сортов Ворон Эрик Крупный, Десертная Ранняя, Синяя Порховская, Тульская Черная, Риху, Нарач данный показатель значимо увеличился, у образцов сортов № 49–15, Кисаровская Желтая, Поздноцветущая, Венгерка Поздняя – значимо снизился, у сортов Татарская Желтая, Тернослива №1 и Vilmitar различия были незначимыми.

В табл. 4 представлены результаты влияния криоконсервирования с двухэтапным охлаждением на показатель жизнеспособности семян гармалы *Peganum harmala* L. и серпухи рассеченной *Serratula dissecta* Ledeb. Охлаждение семян гармалы до -30°C с последующим погружением в жидкий азот приводило к незначительному снижению показателей всхожести по сравнению с контролем. У семян, охлажденных до -50°C и затем погруженных в жидкий азот, а также охлажденных до -50°C без погружения в жидкий азот, ростовые показатели сохранялись на уровне контроля после 7-суточного хранения, что позволяет использовать данные режимы криоконсервирования для сохранения семян гармалы *Peganum harmala* L. Результаты анализа всхожести семян серпухи рассеченной *Serratula dissecta* Ledeb. демонстрируют увеличение показателя жизнеспособности по сравнению с контролем во всех вариантах эксперимента. Наиболее высокие результаты были получены при охлаждении образцов до -50°C с последующим погружением в жидкий азот.

Было проведено быстрое замораживание семян гармалы *Peganum harmala* L. путем прямого погружения в жидкий азот с использованием криопротектора глицерина (100%). Отмечено, что после медленного отогрева изучаемые показатели значительно увеличились (табл. 5). У семян пижмы *Tanacetum ulutavicum* Tzvel. в результате использования 100%-го глицерина и быстрого отогрева показатель жизнеспособности семян повысился по сравнению с контролем. Аналогичные результаты были получены в случае применения смеси растворов глицерина (50%) и сахарозы (10%), а также медленного отогрева. Применение 10%-й сахарозы и медленного отогрева повысили всхожесть семян пижмы *Tanacetum ulutavicum* Tzvel. по сравнению с контрольной практически в 2,5 раза, однако при повышении концентрации сахарозы до 20% жизнеспособность семян снизилась. У семян пижмы *Tanacetum ulutavicum* Tzvel. после быстрого отогрева на водяной бане с 10

Table 4 shows the data of effect of cryopreservation with two-stage cooling on the viability index of Syrian rue *Peganum harmala* L. and sawwort *Serratula dissecta* Ledeb. seeds. The seeds cooling of Syrian rue down to -30°C with subsequent immersion into liquid nitrogen led to a insignificant decrease in germination rates if compared with the control. Growth parameters remained at the control level after 7 days of storage in the seeds cooled down to -50°C and then immersed into liquid nitrogen, as well as in the seeds cooled down to -50°C without immersion into liquid nitrogen. This allows to use these cryoregimens to preserve the seeds of Syrian rue *Peganum harmala* L. The analysis of the resulted germination of the seeds of sawwort *Serratula dissecta* Ledeb. demonst-

Таблица 4. Ростовые показатели семян гармалы *Peganum harmala* L. и серпухи *Serratula dissecta* Ledeb. после режима криоконсервирования без криопротекторов (сбор 2013 г.)

Table 4. Growth parameters of Syrian rue *Peganum harmala* L. and sawwort *Serratula dissecta* Ledeb. seeds after cryopreservation without cryoprotectants (harvesting in 2013)

Вид эксперимента Type of experiment	Энергия прорастания, % Germination rate, %	Всхожесть, % Germination capacity, %
<i>Peganum harmala</i> L.		
Контроль Control	88 ± 0,7	88 ± 0,7
Охлаждение до -30°C , погружение в жидкий азот Cooling down to -30°C , immersion into liquid nitrogen	70,3 ± 0,9*	74 ± 0,8*
Охлаждение до -50°C , погружение в жидкий азот Cooling down to -50°C , immersion into liquid nitrogen	85 ± 0,5*	90 ± 0,7
Охлаждение до -50°C Cooling down to -50°C	86,9 ± 0,8	91,3 ± 1,0
<i>Serratula dissecta</i> Ledeb.		
Контроль Control	60,9 ± 2,0	69,6 ± 2,1
Охлаждение до -30°C , погружение в жидкий азот Cooling down to -30°C , immersion into liquid nitrogen	73,5 ± 2,1*	79,4 ± 2,5*
Охлаждение до -50°C , погружение в жидкий азот Cooling down to -50°C , immersion into liquid nitrogen	86,9 ± 2,3*	86,9 ± 2,7*
Охлаждение до -50°C Cooling down to -50°C	84,6 ± 2,2*	84,6 ± 2,5*

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Note: * – differences are statistically significant if compared with the control, $p < 0.05$.



Таблица 5. Показатели жизнеспособности семян трех видов лекарственных растений после обработки криопротекторами и криоконсервирования путем быстрого погружения в жидкий азот по данным сбора 2014 г.

Table 5. Seed viability for three species of medicinal plants after treatment with cryoprotectant and cryopreservation by rapid immersion into liquid nitrogen according to the data of harvesting in 2014

Виды семян Seed types	Криопротектор Cryoprotectant	Способ отогрева Type of freeze-warming	Энергия прорастания, % Germination rate, %	Всхожесть, % Germination capacity, %
Гармала (<i>Peganum harmala</i> L.) Syrian rue <i>Peganum harmala</i> L.	Контроль Control		70 ± 0,2	75 ± 0,2
	Глицерин 100% Glycerol 100%	A	85 ± 0,9*	90 ± 1,0*
		B	40 ± 0,8*	40 ± 0,7*
Пижма улутавская (<i>Tanacetum ulutavicum</i> Tzvel.) Tansy <i>Tanacetum ulutavicum</i> Tzvel.	Контроль Control		33 ± 2	33 ± 2%.
	Глицерин 100% Glycerol 100%	A	20 ± 0,8*	22 ± 0,9*
		B	38 ± 1,1*	44 ± 1,2*
	Сахароза 10% Sucrose 10%	A	62 ± 1,6*	72 ± 1,7*
		B	–	–
	Сахароза 20% Sucrose 20%	A	24 ± 0,9*	30 ± 0,9
		B	–	–
	Сахароза 10%, глицерин 50% Sucrose 10%, Glycerol 50%	A	4 ± 0,5*	44 ± 1,8*
		B	12 ± 0,5*	36 ± 0,9
	Серпуха рассеченная (<i>Serratula dissecta</i> Ledeb.) Sawwort <i>Serratula dissecta</i> Ledeb.	Контроль Control		32,1 ± 1,1
ДМСО 1% DMCO 1%		A	46,9 ± 1,8*	53,2 ± 1,9*
		B	39,5 ± 1,5*	45,7 ± 1,7
ДМСО 3% DMCO 3%		A	50 ± 1,3*	68 ± 2,0*
		B	83,3 ± 1,8*	100 ± 2,0*
ДМСО 5% DMCO 5%		A	52 ± 1,2*	60 ± 1,4*
		B	60 ± 1,3*	74 ± 1,3*
Глицерин 100% Glycerol 100%		A	58 ± 1,8*	64 ± 1,9*
		B	74 ± 1,6*	80 ± 1,7*

Примечания: А – медленный отогрев при 22°C; В – быстрый отогрев на водяной бане при 40°C. * – различия статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0.05$; «–» – отсутствие всхожести.

Notes: A – slow warming at 22°C; B – rapid warming in water bath at 40°C. * – differences are statistically significant if compared with the control, $p < 0.05$; «–» – no germination capacity.

и 20%-ми растворами сахарозы отсутствовала всхожесть, то есть при использовании данного криопротектора рекомендуется только медленный отогрев (табл. 5). Были исследованы защитные свойства глицерина (100%) и безопасных концентраций ДМСО на семенах *Serratula dissecta* Ledeb. Применение криопротектора ДМСО в исследуемых концентрациях увеличило всхожесть семенного материала по сравнению с контролем, наиболее высокие показатели отмечены при концентрации 3% (в 2,5 раза). Глицерин в качестве криопротектора также зна-

rated a rise in viability if compared with the control in all the experiments. The highest results were obtained when the samples were cooled down to –50°C and then immersed into liquid nitrogen.

Seeds of Syrian rue *Peganum harmala* L. were rapidly frozen by direct immersion into liquid nitrogen using glycerol as a cryoprotectant (100%). It has been noted that after a slow warming the studied indices were significantly increased (Table 5). The viability of *Tanacetum ulutavicum* Tzvel. tansy seeds was increased in comparison with the control after using the 100% glycerol and rapid warming.

чимо увеличивал всхожесть семян по сравнению с контролем (табл. 5).

Следует отметить, что стратификационный эффект после глубокого замораживания сухих семян проявляется не всегда, при проращивании семян после криоконсервирования для преодоления состояния покоя необходимо проводить стратификацию в холодильнике при 4°C. Так, криоконсервирование не повлияло на длительность стратификации и всхожесть семян яблони, клена остролистного и клена татарского [11, 23]. В качестве неожиданного эффекта после криоконсервирования была выявлена стратификация у семян *Tanacetum ulutavicum* Tzvel. и *Serratula dissecta* Ledeb.

Таким образом, при использовании нетоксичных криопротекторов и их смеси для хранения растительных объектов в низкотемпературных условиях повышался показатель их выживаемости. Кроме того установлено, что вариативность полученных результатов обусловлена сортовыми, особенностями и видом растительного материала.

Выводы

1. Показатель жизнеспособности черенков черной смородины *Ribes nigrum* L. у всех сортов после криоконсервирования снизилась на 6,4–10,6%. Растения в полевых условиях хорошо развивались, летом сформировали здоровые побеги и заложили на следующий год плодоносящие почки.

2. После криоконсервирования пыльцы черешни *Cerasus avium* L. Moench (всего 17 сортов) показатель ее жизнеспособности значительно увеличился (7 сортов), сохранился на исходном уровне (6 сортов), поскольку различия были незначимыми, и значительно снизился (4 сорта).

3. После криоконсервирования пыльцы сливы диплоидной *Prunus rossica* Erem. (всего 9 сортов) показатель ее жизнеспособности увеличился (3 сорта), не изменился (3 сорта) и значительно снизился (3 сорта). У сливы домашней *Prunus domestica* L. (всего 13 сортов) данный показатель значительно увеличился (6 сортов), не изменился по сравнению с контролем (3 сорта) и значительно снизился (4 сорта).

4. Наиболее эффективным способом криоконсервирования без криопротекторов семян гармалы *Peganum harmala* L. было охлаждение до –50°C с последующим погружением в жидкий азот и охлаждение до –50°C без погружения в жидкий азот, а серпухи рассеченной *Serratula dissecta* Ledeb. – охлаждение до –50°C с последующим погружением в жидкий азот.

Similar results were obtained when using a mixture of glycerol (50%) and sucrose (10%) solutions as well as slow warming. The using of 10% sucrose and slow warming increased the germination of *Tanacetum ulutavicum* Tzvel. tansy seeds compared to the control almost in 2.5 times, however, with an increase in the concentration of sucrose up to 20%, seed viability was decreased. There was no germination of tansy *Tanacetum ulutavicum* Tzvel seeds after rapid warming in a water bath with 10 and 20% sucrose solutions and rapid. It could be supposed that in case of using this cryoprotectant only slow warming is recommended (Table 5). The protective properties of glycerol (100%) and safe concentrations of DMSO were investigated with sawwort *Serratula dissecta* Ledeb. seeds. The use of DMSO cryoprotectant in the studied concentrations even increased the germination of seeds if compared with the control, the highest rates were observed at a concentration of 3% (in 2.5 times). Glycerol as a cryoprotectant also significantly increased seed germination if compared with the control (Table 5).

It should be noted that stratification effect after deep freezing of dry seeds does not always appear; when germinating seeds after cryopreservation, it is necessary to carry out stratification in a refrigerator at 4°C to overcome the dormant state. In particular, cryopreservation did not affect the duration of stratification and seed germination of apple tree, Norway maple and Tatarian maple [3, 21]. It was unexpected to found stratification in the seeds of *Tanacetum ulutavicum* Tzvel. and *Serratula dissecta* Ledeb. after cryopreservation.

Thus, when using non-toxic cryoprotectants and their mixtures to store the plants under low-temperature conditions, their survival rate was increased. In addition, it has been established that the variability of the obtained results is due to the varietal characteristics and the plant type.

Conclusions

1. The viability of cuttings of *Ribes nigrum* L. black currant for all the cultivars decreased by 6.4–10.6% after cryopreservation. The plants developed well under field conditions, in the summer they sprouted healthy shoots and formed fruitful buds for the next year.

2. After cryopreservation of *Cerasus avium* L. Moench sweet cherry pollen (altogether 17 cultivars), its viability was significantly increased (in 7 cultivars), remained at the initial level, *i. e.* the difference was insignificant (in 6 cultivars), or was significantly decreased (4 cultivars).



5. Подобраны оптимальные концентрации криопротекторов и способы отогрева семян трех видов лекарственных растений: гармалы *Peganum harmala* L. – глицерин 100% и медленный отогрев; пижмы улутавской *Tanacetum ulutavicum* Tzvel. – сахароза 10% и медленный отогрев; серпухи рассеченной *Serratula dissecta* Ledeb. – ДМСО 3% и быстрый отогрев.

На основании полученных результатов можно считать, что криоконсервирование позволяет сохранять плодово-ягодные культуры и семена дикорастущих лекарственных растений длительное время без существенной потери жизнеспособности.

Исследования поддержаны государственным заданием ВИР на выполнение научно-исследовательской работы № 0662-2018-0003 АААА-А17-117030910078-3 и грантовым научным проектом МОН РК «Изучение современного состояния популяций эндемичных растений Северного и Центрального Казахстана и разработка методов сохранения генетического материала».

Литература

1. Ангаскиева АС, Андреева ВЮ, Калинин ГИ, и др. Исследование химического состава серпухи венценосной, культивируемой в Сибири. *Химия растительного сырья*. 2003; (4): 47–50.
2. Белоус АМ, Грищенко ВИ. *Криобиология*. Киев: Наукова думка, 1994. 432 с.
3. Вержук ВГ, Павлов АВ, Мурашев СВ, и др. Регулирующая роль криопротекторов и антиоксидантов при хранении геноплазмы плодовых и ягодных культур. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2016; (11, Ч. 2): 115–8.
4. Вержук ВГ, Жестков АС, Котов ВМ, и др. Перспективы использования криоконсервации для черенков груши (*Pyrus L.*), сохраняемых в парах жидкого азота. *Проблемы криобиологии*. 2012; 22 (3): 255.
5. Вержук ВГ, Павлов АВ, Дзюбенко НИ, и др. Криоконсервация в жидком азоте – перспективный метод сохранения биоразнообразия растений косточковых и семечковых плодовых культур. *Плодоводство и ягодоводство России*. 2017; 48 (1): 33–6.
6. Вержук ВГ, Филипенко ГИ, Сафина ГФ, и др. Криоконсервация – эффективный метод сохранения генетических ресурсов плодовых и ягодных культур. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2012; 169: 270–9.
7. Вержук ВГ, Филипенко ГИ, Павлов АВ и др. Влияние света и концентрации сахарозы в среде прорастивания на прорастание пыльцы яблони. *Путь науки*. 2016; 3(25):14–9.
8. Вержук ВГ, Павлов АВ, Тихонова ОА и др. Оценка жизнеспособности геноплазмы плодовых культур после криосохранения в парах жидкого азота при 183...185°C. В: Кунах ВА, редактор. *Факторы экспериментальной эволюции организмов*. Киев: Логос; 2013. Т. 13; с. 27–30.
9. Гаврилькова ЕА, Додонова АШ, Вержук ВГ, и др. Низкотемпературное хранение семенного материала *Peganum harmala*. *Вестник Карагандинского университета, Серия Биология. Медицина. География*. 2015; (4) : 17–23.

3. After cryopreservation of *Prunus rossica* Erem. diploid plum pollen (9 cultivars), its viability was increased (3 cultivars), there were no changes (3 cultivars), and was significantly decreased (3 cultivars). In the *Prunus domestica* L. garden plum pollen (13 varieties) this index was significantly increased (in 6 cultivars), remained unchanged if compared with the control (in 3 cultivars) and was significantly decreased (in 4 cultivars).

4. The most effective method of cryopreservation without cryoprotectants for the seeds of *Peganum harmala* L. wild rue was cooling down to –50°C followed by immersion into liquid nitrogen and cooling down to –50°C without immersion into liquid nitrogen, and for *Serratula dissecta* Ledeb. sawwort cooling down to –50°C with the following immersion into liquid nitrogen.

5. Optimal concentrations of cryoprotectants and the thawing methods of seeds for three types of medicinal plants were selected. These were 100% glycerol and slow warming for *Peganum harmala* L., Syrian rue; 10% sucrose and slow warming for *Tanacetum ulutavicum* Tzvel tansy; 3% DMSO and rapid warming for *Serratula dissecta* Ledeb. sawwort.

Based on the obtained results, we suggest that cryopreservation enables preserving the fruit and berry crops and seeds of wild medicinal plants for a long time without significant loss of viability.

The research has been supported by the VIR State Research Target №0662–2018–0003AAAA–A17–117030910078–3 and the grant research project of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan 'Study of current state of populations of endemic plants in northern and central Kazakhstan and development of preservation methods of genetic material'.

References

1. Angaskieva AS, Andreeva VY, Kalinkina GI, et al. [Researching chemical composition of *Serratula coronata* cultivated in Siberia]. *Xhimija Rastitel'nogo Syr'ya*. 2003; (4): 47–50. Russian.
2. Belous AM, Grischenko VI. [Cryobiology]. Kyiv: Naukova dumka; 1994. 430 p. Russian.
3. Daletskaya TV, Polyakova EN. [The effect of cryopreservation on seed germination and some aspects of metabolism.] *Biofizika Zhivoy Kletki*. 1994; 6: 81–5. Russian.
4. Dzyubenko NI. [Vavilov's collection of cultivated plants: history and modernity]. In: [Preservation of biological diversity in Russia as a base for sustainable development and high technologies]. Moscow: GNU VSTISP Rosselkhozakademii; 2011. p. 80–109. Russian.
5. Dodonova ASH, Gavrilkova EA, Verzhuk VG. [Cryostorage of *Serratula dissecta* seed material]. In: [Biological features of medicinal and aromatic plants and their role in medicine.

10. Грищенко ВИ. Достижения и перспективы развития криобиологии в Украине. Проблемы криобиологии. 2005;15(3): 231–40.
11. Далецкая ТВ, Полякова ЕН. Влияние криоконсервации на прорастание семян и некоторые стороны метаболизма. Биофизика живой клетки. 1994; 6: 81–5.
12. Джеймс ЕР. Хранение клеток в условиях низких температур. В: Мэнтелл СГ, Смит Г. редакторы. Биотехнология сельскохозяйственных растений. Перевод с английского. Москва: ВО Агропромиздат, 1987. с. 153–75.
13. Дзюбенко НИ. Вавиловская коллекция культурных растений: история и современность. В: Сохранение биологического разнообразия России – основа устойчивого развития и наукоемких технологий. Москва: ГНУ ВСТИСП Россельхозакадемии; 2011. с. 80–109.
14. Додонова АШ, Гаврилькова ЕА, Вержук ВГ. Криохранение семенного материала *Serratula dissecta*. В: Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине. Сборник научных трудов международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию ВИЛАР. Москва, 23–25 июня. Москва: ФГБНУ ВИЛАР; 2016. с. 46–9.
15. Замбурова ДС, Шериева СА, Ситников МН и др. Изучение жизнеспособности пыльцы плодовых культур после воздействия сверхнизких температур. Современные проблемы науки и образования. [Интернет] 2016; (3):414. [Цитировано 10.10.2018] Доступно на: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24849>.
16. Зорина МС, Кабанов СП. Определение семенной продуктивности и качества семян интродуцентов. Методики интродукционных исследований в Казахстане. Сборник научных трудов. Алма-Ата: Наука. 1976. с. 75–85.
17. Киселева АА, Вержук ВГ, Савельев НИ, и др. Методы мониторинга генетической стабильности плодовых культур в условиях криоконсервирования. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2012; 169: 280–8.
18. Мальцева МВ. Пособие по определению посевных качеств семян лекарственных растений. Москва: Медгиз, 1950. 56 с.
19. Молодкин ВЮ. Значение влажности семян некоторых зерновых и зерновых бобовых культур при криоконсервации в жидком азоте. Бюллетень ВИР. 1986; 165: 22–4.
20. Мухитдинов НМ, Паршина ГН. Лекарственные растения. Алматы: Казак университеті, 2002. 313 с.
21. Павлов НВ. Флора Казахстана. Алма-Ата: Изд-во Академии Наук Казахстана; 1960. Т. 9: 639 с.
22. Попов АС. Криоконсервация культивируемых клеток. В: Пинаев ГП, Богданова МС. редакторы. Методы культивирования клеток. Санкт-Петербург: Изд-во политех. ун-та; 2008. с. 236–50.
23. Сафина ГФ, Бурмистров ЛА. Низкотемпературное и криогенное хранение семян груши *Pyrus L.* Цитология. 2004; 46 (10): 851.
24. Тихонова НГ, Филипенко ГИ, Вержук ВГ, и др. Стратегия и методы длительного хранения генофонда растений. Проблемы криобиологии 2008; 18(2): 227.
25. Удольская НЛ. Методика биометрических расчетов. Алма-Ата: Наука; 1976. 45 с.
26. Федосенко ВА. Использование сверхнизких температур для длительного хранения семян (методы и техника). Бюллетень ВИР. 1978; 77: 53–7.
27. Яковлев ГП, Блинова КФ. Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия. Санкт-Петербург: Специальная литература; 2004. 763 с.
28. Forsline F, Towill L, Waddell J, et al. Recovery and longevity of cryopreserved dormant apple buds. Amer Soc Hort Sci. 1998;123(3): 365–70.
29. Omura M, Sato Y, Seike K. Long-term preservation of Japanese pear seeds under extra-low temperatures. In: Akihama T, Nakajama K, editors. Long-term Preservation of Favourable Germplasm in Arboreal Crops. Rome: IBPGR; 1978. p. 26–30.
- Collection of scientific papers of the international scientific-practical conference dedicated to the 85th anniversary of VILAR]. June 23-25, Moscow, Russia. Moscow: FGBNU VILAR; 2016. p. 46–9. Russian.
6. Fedosenko VA. [Use of ultralow temperatures for long-term seed storage (methods and practices)]. Bulletin VIR. 1978; 77: 53–7. Russian.
7. Forsline F, Towill LE, Waddell JW, et al. Recovery and longevity of cryopreserved dormant apple buds. Amer Soc Hort Sci. 1998; 123(3): 365–70.
8. Gavrilkova EA, Dodonova A Sh, Verzhuk VG, et al. [Low-temperature preservation of Peganum harmala seed material]. Bulletin of the Karaganda University. Biology. Medicine. Geography Series. 2015. (4): 17–23. Russian.
9. Grischenko VI. [Achievements and prospects of cryobiology development in Ukraine]. Problems of Cryobiology. 2005; 15(3): 231–40. Russian.
10. James ER. [Cell storage at low temperatures.] In: [Mantell SH, Smith H, editors. Plant biotechnology]. Translated from English. Moscow: Agropromizdat, 1987. p. 153–75. Russian.
11. Kiseleva AA, Verzhuk VG, Savelyev NI, et al. [Methods for monitoring genetic stability in fruit crop plants under cryopreservation]. Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2012; 169: 280–8. Russian.
12. Maltseva MV. [Handbook on determining sowing qualities of medicinal plant seeds]. Moscow: Medgiz; 1950. 56 p. Russian.
13. Molodkin VY. [Significance of seed moisture content in some cereals and grain legumes during their cryopreservation in liquid nitrogen]. Bulletin VIR. 1986; 165: 22–4. Russian.
14. Mukhitdinov NM., Parshina GN. [Medicinal plants]. Almaty: Kazak Universiteti; 2002. 313 p. Russian.
15. Omura M, Sato Y, Seike K. Long-term preservation of Japanese pear seeds under extra-low temperatures. In: Akihama T, Nakajama K, editors. Long-term preservation of favourable germplasm in arboreal crops. Rome: IBPGR; 1978: p. 26–30.
16. Pavlov NV. [The flora of Kazakhstan]. Alma-Ata: Izdatel'stvo Akademii Nauk Kazakhstana; 1960: Vol.9: 639 p. Russian.
17. Pegg DE. Principles of cryopreservation. Methods Mol Biol. 2007; 368:39–57.
18. Pegg DE. Principles of cryopreservation. Methods Mol Biol. 2015; 1257:3–19.
19. Popov AS. [Cryopreservation of cultured cells]. In: Pinaev GP, Bogdanova MS, editors. [Methods for cell culturing]. St. Petersburg: Izdatel'stvo Politekhnikeskogo Universiteta; 2008. p. 236–50. Russian.
20. Reed BM. Plant cryopreservation: a practical guide. New York, NY: Springer; 2008. 532 p.
21. Safina GF, Burmistrov LA. [Low-temperature and cryogenic storage of pear-tree (*Pyrus L.*) seeds]. Tsitologiya. 2004; 46(10): 851. Russian.
22. Sakai A, Noshiro M. Some factors contributing to the survival of crop seeds cooled to the temperature of liquid nitrogen. In: Frankel H, Hawkes JG, editors. Crop genetic resources for today and tomorrow. Cambridge Univ Press; 1975. p. 317–26.
23. Stanwood P, Bass L. Ultracold preservation of seed germplasm. In: Li PH., Sakai A. editors. Plant cold hardiness and freezing stress. Mechanisms and crop implications. Cambridge: Academic press, Inc.; 1978.V.1; p. 361–71.
24. Tikhonova NG, Filipenko GI, Verzhuk VG, et al. Strategy and methods of long-term storage of gene fond of plants. Problems of Cryobiology. 2008; 18 (2): 227.
25. Udolskaya NL. [Methodology of biometric calculations]. Alma-Ata: Nauka; 1976. 45 p. Russian.
26. Verzhuk, VG, Pavlov AV, Murashev SV, et al. [The regulating role of cryoprotectants and antioxidants during the storage of fruit and berry plant germplasm]. Mezhdunarodnyy Nauchno-Issledovatel'skiy Zhurnal. 2016; (11 Pt 2): 115–8. Russian.
27. Verzhuk VG, Zhestkov AS, Kotov VM, et al. Perspectives of using cryopreservation for pear (*Pyrus L.*) shoots preserved

30. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.* 2007;368:39–57.
31. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.* 2015;1257:3–19.
32. Reed BM, editor. *Plant cryopreservation: a practical guide.* New York: Springer science + Business Media, LLC. 2008. 532 p.
33. Sakai A, Noshiro M. Some factors contributing to the survival of crop seeds cooled to the temperature of liquid nitrogen. In: Frankel O H, Hawkes JG, editors. *Crop genetic resources for today and tomorrow.* Cambridge; New York: Cambridge University Press. 1975. p. 317–26.
34. Stanwood P, Bass L. Ultracold preservation of seed germplasm. In: Li PH, Sakai A, editors. *Plant cold hardiness and freezing stress. Mechanisms and crop implications.* Cambridge: Academic press, Inc. 1978. V.1; 361–71.
35. Wusterman MC, Boylan S, Pegg DE. Cryopreservation of rabbit corneas in dimethyl sulfoxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38(10):1934–43.
28. Verzhuk VG, Pavlov AV, Dzyubenko NI, et al. [Cryopreservation in liquid nitrogen as a promising method of preserving the plant biodiversity of drupe and pome fruit crops]. *Plodovodstvo i Yagodovodstvo Rossii.* 2017; 48(1): 33–6. Russian.
29. Verzhuk VG, Filipenko GI, Safina GF, et al. [Cryoconservation as an effective method of preserving fruit and berry plant genetic resources]. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding.* 2012; 169: 270–9. Russian.
30. Verzhuk VG, Filipenko GI, Pavlov AV, et al. [The effect of light and sucrose concentration in the germination medium on apple-tree pollen germination]. *The Way of Science.* 2016; 3(25): 14–9. Russian.
31. Verzhuk VG, Pavlov AV, Tikhonova OA, et al. [Evaluation of fruit plant germplasm's viability after cryopreservation in liquid nitrogen vapor at 183–185°C]. In: Kunakh VA, editor. [Factors of experimental evolution of organisms]. Kyiv. Logos: 2013. Vol. 13; p. 27–30. Russian.
32. Yakovlev G.P, Blinova KF. [Medicinal plant materials. Pharmacognosy]. St. Petersburg: Spetsialnaya Literatura; 2004. 763 p. Russian.
33. Zamburova DS, Sherieva SA, Sitnikov MN, et al. [Studying viability of fruit crop pollen after exposure to ultralow temperatures]. *Sovremennye Problemy Nauki i Obrazovaniya.* [Internet] 2016 [Cited 10.10.2018]; (3):414. Available from: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24849>. Russian.
34. Zorina MS, Kabanov SP. [Determining seed productivity and seed quality in newly introduced plants]. In: [Techniques of introduction studies in Kazakhstan]. Collection of research papers. Alma-Ata: Nauka; 1976. p.75–85. Russian.
35. Wusterman MC, Boylan S, Pegg DE. Cryopreservation of rabbit corneas in dimethyl sulfoxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38(10):1934–43.