

УДК 634.8.075:533.5:57.086.13

А.І. Присталов, О.М. Боброва*, Л.Г. Кулешова

Застосування методу вакуум-інфільтрації для кріоконсервування ізольованих бруньок винограду

UDC 634.8.075:533.5:57.086.13

A.I. Prystalov, O.M. Bobrova*, L.G. Kuleshova

Application of Vacuum Infiltration in Cryopreservation of Isolated Grape Buds

Реферат: Збереження генофонду винограду, який відноситься до рослин, що розмножуються вегетативно, є складним завданням, одним із рішень якого може бути кріоконсервування бруньок. Для насичення кріопротекторами таких об'ємних і гетерогенних зразків необхідні сучасні методи. У роботі порівнювали ефективність методу вакуум-інфільтрації та класичного пасивного насичення (вимочування) протягом 60 хв ізольованих бруньок винограду сорту Руський Конкорд кріозахисним розчином PVS 2. Для насичення методом вакуум-інфільтрації бруньки інкубували у кріозахисному розчині 15 хв при 40 кПа, після тиск поступово підвищували до атмосферного. Ефективність насичення бруньок оцінювали методом низькотемпературної диференціальної скануючої калориметрії за зміною ентальпії і температур фазових переходів та інтенсивністю стрибка теплоємності під час склування. Встановлено, що використання вакууму для насичення ізольованих бруньок винограду кріопротекторами значно збільшує концентрацію кріозахисних речовин у них та істотно зменшує кількість вільної води, яка кристалізується протягом охолодження, у порівнянні з пасивним вимочуванням у витрифікуючому розчині PVS 2.

Ключові слова: бруньки винограду, кріоконсервування, вакуум-інфільтрація, витрифікуючий розчин, фазові переходи, калориметрія.

Abstract: Preserving the gene pool of grapes, referred to the vegetatively propagated plants is a complicated task, which can be also solved by cryopreservation of the buds. To saturate such bulk and heterogeneous samples with cryoprotectants the novel methods are required. The effectiveness of vacuum infiltration and 60 min standard passive saturation (soaking) of isolated grape buds of the Russian Concord variety with a cryoprotective solution PVS 2 were compared in this research. To saturate by vacuum infiltration the buds were incubated in cryoprotective solution for 15 min at 40 kPa, afterwards the pressure was gradually increased to atmospheric level. The efficiency of bud saturation was evaluated with low-temperature differential scanning calorimetry by changing the enthalpies and temperatures of phase transitions as well as the intensity of heat capacity jump at glass transition. The use of vacuum in the saturation of isolated grape buds was found to lead to a strong rise in cryoprotectant concentration in them and a significant decrease in the amount of free water crystallized during cooling compared to passive soaking in a PVS 2 vitrification solution.

Key words: grape buds, cryopreservation, vacuum infiltration, vitrification solution, phase transitions, calorimetry.

На даний час проблема збереження генофонду культурних рослин, які розмножуються вегетативно, набуває все більшої актуальності, що пов'язано з загрозою скорочення їх генетичного різноманіття в польових колекціях внаслідок впливу екстремальних абіотичних факторів, розповсюдження захворювань і шкідників [2, 14]. Більшість рослин може зберігатися в генетичних банках у вигляді насіння при температурах до -20°C , які забезпечують достатньо високу життєздатність зразків протягом десятиліть. Слід зазначити, що у культур з вегетативним розмноженням за насінневого розмноження материнські ознаки практично не зберігаються [12]. Сучасним засобом тривалого зберігання вегетативних частин таких рослин (однорічних пагонів, бруньок),

Nowadays the problem of preserving the gene pool of cultured, vegetatively propagated plants gains more and more traction because of the risk of reduction in genetic diversity of field collections due to the influence of extreme abiotic factors, spreading of blights and vermin [2, 14]. The majority of plants can be preserved in gene banks in the form of seeds at temperatures down to -20°C that provide quite a high vital capacity to samples for decades. It should be noted that in vegetatively propagated cultures during seed propagation the mother's traits were hardly preserved [12]. The modern technique of long-term preservation of vegetative parts of such plants (one-year shoots, buds) as well as meristems and pollen is cryopreservation in liquid nitrogen or its vapors [10]. Vitrification, comprising high

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: helen.bobrova.77@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: helen.bobrova.77@gmail.com

Надійшла 14.04.2020

Прийнята до друку 08.02.2021

Received April, 14, 2020

Accepted February, 08, 2021

© 2021 O.M. Bobrova, 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.

а також меристем і пилку є кріоконсервування у рідкому азоті або його парах [10]. Одним із простих для практичного застосування методів кріоконсервування генетичних ресурсів рослин, що не потребує дорогого устаткування, вважається вітрифікація, яка включає високі швидкості охолодження і обробку зразків кріозахисними розчинами [7]. Для кріоконсервування рослинних об'єктів розроблено ряд захисних розчинів, що сприяють формуванню склоподібного стану у компартментах клітин, заповнених рідиною, і таким чином запобігають розвитку внутрішньоклітинної кристалізації. Такі розчини отримали назву вітрифікуючих (PVS, plant vitrification solution) [13]. Невеликі рослинні експланти (пилки, насіння, меристеми) досить легко вітрифікуються з використанням підсушування і PVS [11]. Однак зі збільшенням розмірів експлантів спостерігається неоднорідність насичення їх тканин, що вимагає більшого часу експозиції у PVS. Тривалий контакт із концентрованими кріозахисними розчинами може призводити до загибелі поверхневого шару клітин, у той самий час як внутрішні шари тканин експлантів залишаються ненасиченими [9]. Складності проникнення кріопротекторів групи PVS у міжклітинний простір і клітини рослинних тканин пов'язані також із високою в'язкістю кріозахисних розчинів. Неоднорідність морфології, фізіології та клітинної хімії тканин бруньок може поставити під загрозу ефективність кріопротекції та кріоконсервування. Успіх кріозахисту залежить від часу і температури експозиції, шляху дифузії, ступеня проникності та хімічної токсичності кріопротекторів, достатньої дегідратації рослинних тканин [8].

Забезпечення оптимальних умов для насичення бруньок кріопротекторами можливо з використанням інноваційного методу вакуум-інфільтрації для вітрифікації (VIV). Результати успішного використання методу вакуум-інфільтрації та його модифікації вперше показано нами на живцях винограду [3–5]. Інші дослідники продемонстрували метод VIV на ембріонах деяких рослин [6, 8].

Мета роботи – порівняльний аналіз ефективності методу VIV та пасивного насичення ізольованих бруньок винограду PVS 2.

Матеріали і методи

Сплячі бруньки винограду сорту Руський Конкорд із невеликою ділянкою деревини 20–25 мм виділяли з однорічної лози, зібраної в осінньо-зимовий період. Ізольовані бруньки винограду насичували PVS 2 (30% гліцерину, 15% етиленгліколю, 15% диметилсульфоксиду, 0,4М сахарози), який широко застосовується для

cooling rates and processing of samples with cryoprotective solutions, is one of simpler methods to be applied for cryopreservation of plant genetic resources, which does not require costly equipment [7]. Numerous protective solutions have been developed to cryopreserve plants. They foster the formation of vitreous state in cell compartments, filled with liquid and, thereby prevent the development of intracellular crystallization. Such solutions are called vitrifying ones (PVS – plant vitrification solution) [13]. Small vegetative explants (pollen, seeds, meristems) are rather easily vitrified using preliminary drying and PVS [11]. However, with the enhancement of explants their tissue saturation heterogeneity is observed, that demands longer exposure to PVS. An extensive contact with concentrated cryoprotective solutions can cause the death of surface layer of cells, whereas the inner layers of explant tissues remain unsaturated [9]. The complexity of PVS cryoprotectants to penetrate into intercellular space and the cells of plant tissues is associated with a high viscosity of cryoprotective solutions. The heterogeneity of morphology, physiology and cell chemistry of the buds' tissues could threaten the efficiency of cryoprotection and cryopreservation. The success of cryoprotection depends on the exposure time and temperature, diffusion path, degree of penetration and chemical toxicity of cryoprotectants, sufficient dehydration of plant tissues [8].

Providing optimal conditions for saturation of grape buds with cryoprotectants is possible with innovative method of vacuum infiltration vitrification (VIV). The results of successful application of the vacuum infiltration technique and its modification were for the first time presented by us in grape cuttings [3–5]. Other investigators demonstrated the VIV method in some plant embryos [6, 8].

The research aim was to comparatively analyze the efficiency of the VIV technique and passive saturation of isolated grape buds with PVS2.

Materials and Methods

The dormant Russian Concord grape buds alongside with small 20-25 mm wooden section were isolated from one-year vine collected during the autumn-winter period. Isolated grape buds were saturated with PVS 2 (30% glycerol, 15% ethylene glycol, 15% dimethyl sulfoxide, 0.4M sucrose), commonly used for plant cryopreservation [6, 15]. This solution was prepared with Murashige-Skoog nutrient medium. The efficiency of classical passive saturation (60 min soaking in cryoprotective solution under standard atmosphere pressure and 18°C) and the VIV method was compared.



кріоконсервування рослинних об'єктів [6, 15]. Даний розчин готували на живильному середовищі Мурасіге-Скуга. Порівнювали ефективність класичного пасивного насичення (60-хвилинне вимочування у кріозахисному розчині за нормального атмосферного тиску та температури 18 °C) і методу VIV.

Схему пристрою для насичення бруньок винограду методом VIV наведено на рис. 1. Нижче описано принцип роботи даного пристрою та методика насичення. Виділені сплячі бруньки винограду поміщають у вакуумну камеру, з'єднану через патрубок з ємністю, яка заповнена робочим розчином (PVS 2), а крізь горловину – з вакуумним шлангом. Після цього відкривають затискач і включають вакуумний насос. Таким чином в ексикаторі, вакуумній камері та ємності з PVS 2 формується розріджена атмосфера. Тиск визначають за допомогою вакуумметра. Після досягнення тиску 20 кПа перекривають затискач, за рахунок розрідженої атмосфери впродовж 5 хв відбувається дегазація бруньок та робочої рідини. Після закінчення процесу дегазації робочу рідину із ємності переливають у вакуумну камеру із бруньками та експонують 15 хв при 40 кПа за температури 18 °C. Після повільно підвищують тиск до атмосферного за допомогою крану, який приєднано до вакуумної магістралі розділювачем потоку.

Об'ємним і складним для кріоконсервування об'єктом є вегетативні бруньки, які містять значну кількість різноманітних каналів та порожнин. За атмосферного тиску вони заповнені повітрям. Якщо бруньки спробувати дегазувати у робочому розчині (PVS 2), то повітря не встигає виходити і розриває канали та порожнини, що призводить до пошкодження бруньок. Як правило, процес дегазації бруньок ускладнюється надмірною в'язкістю робочих розчинів, тому перед процесом насичення порожнини бруньок слід піддавати дегазації при розрідженій атмосфері. У цьому випадку повітря виходить із порожнин, не пошкоджуючи бруньки. Отже, дегазація бруньок та робочої рідини є одним із основних етапів модернізованого нами методу VIV.

Процес насичення починається з додавання робочої рідини до вакуумної камери з брунь-

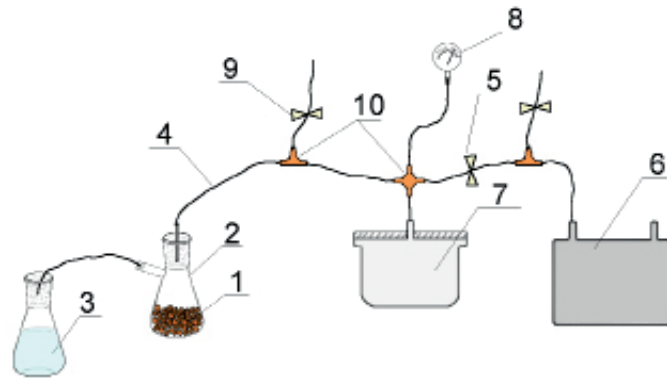


Рис. 1. Пристрій для насичення бруньок винограду методом VIV: 1 – бруньки винограду, 2 – вакуумна камера, 3 – ємність із робочою рідиною, 4 – вакуумний шланг, 5 – затискач подачі вакууму, 6 – вакуумний насос, 7 – ексикатор, 8 – вакуумметр, 9 – кран для стравлювання надлишкового тиску, 10 – розділювачі потоку.

Fig. 1. Device to saturate grape buds by VIV: 1 – grape buds; 2 – vacuum chamber; 3 – container with working solution; 4 – vacuum tube; 5 – vacuum supply clamp; 6 – vacuum pump; 7 – desiccator; 8 – vacuum gauge; 9 – overpressure relief valve; 10 – flow dividers.

The scheme of the device to saturate the grape buds by the VIV is shown in Figure 1. Hereinafter an operating principle of this device and method of saturation are described. The isolated dormant grape buds were placed into a vacuum chamber connected through a nozzle with a container full of working solution (PVS 2), and through a neck with a vacuum tube. Then the clamp was opened and vacuum pump was turned on. Thus in desiccator, vacuum chamber and container with PVS 2 a rarefied atmosphere was formed. The pressure was measured using a vacuum gauge. After reaching 20 kPa the clamp was closed. Due to a rarefied atmosphere there was a 5 min degassing of grape buds and working solution. After degassing the work solution was being moved from the container to the vacuum chamber with grape buds, where they were exposed for 15 min under 40 kPa at 18°C. Afterwards, the pressure was being gradually increased to atmospheric level using a tap connected to vacuum line by a flow splitter.

Vegetative buds containing a significant number of various channels and cavities are bulky and complicated objects for cryopreservation. Under the atmospheric pressure they are full of air. If grape buds are degassed in the working solution (PVS 2) then an air will not be able to get out in time and thereby it ruptures the channels and cavities, resulting in a damage of grape buds. As a rule, the process of grape buds' degassing is complicated by excessive viscosity of working solutions, therefore the grape buds' cavities have to be exposed to degassing under rarefied

ками, які повинні бути повністю занурені у рідину. Це досягається завдяки встановленню обмежувача спливання бруньок. Процес закінчується лише після повільного підвищення тиску до атмосферного, під час якого рідина спрямовується у більш глибокі шари бруньок. При цьому повільне зниження вакууму зменшує вірогідність травмуючого ефекту на бруньки. Кількісною ознакою якісного насичення є відсутність плаваючих на поверхні бруньок після підвищення тиску до атмосферного. За наявності плаваючих бруньок їх вибраковують із подальших експериментів. Такий ефект може бути пов'язаний із різною анатомо-морфологічною структурою бруньок та пагонів винограду, яка формується упродовж всього вегетаційного періоду.

Ефективність насичення бруньок оцінювали методом низькотемпературної диференціальної скануючої калориметрії (ДСК) за зміною температур фазових переходів, зниженням ентальпії кристалізації води і збільшенням стрибка теплоємності при склуванні [16]. У роботі використовували ДСК на основі традиційної конструкції калориметра Кальве [1], який було модифіковано на базі СКТБ ІПКіК НАН України для дослідження широкого діапазону об'ємів зразка та можливості охолодження з високими швидкостями. Бруньки (маса ≈ 1 г) без криозахисного розчину поміщали у калориметричну комірку. Для кращого контакту бруньок зі стінками комірки застосовували порошок бронзи. Зразки охолоджували зі швидкістю 200 °C/хв. Термограми реєстрували під час нагрівання зі швидкістю $0,5$ °C/хв.

Для перевірки статистичної значущості відмінностей досліджуваних числових показників використовували U-критерій Манна-Уїтні ($n = 6$). Дані наведено як середнє значення \pm стандартне відхилення.

Результати і обговорення

Аналіз ДСК-термограм показав наступне. На ДСК-термограмі криозахисного розчину PVS 2 зареєстровано тільки стрибок теплоємності 1 при температурі $-115,3$ °C, пов'язаний з переходом із твердоаморфного стану в стан переохолодженої рідини (рис. 2а, 1). Екзо- або ендотермічних піків не зареєстровано, що свідчить про відсутність кристалізації як на етапі охолодження, так і на етапі нагріву. Тобто PVS 2 на етапі охолодження повністю переходить у склоподібний стан із високою стабільністю аморфної фази, яка, навіть за повільного нагріву вище температури склування, не кристалізується. Саме

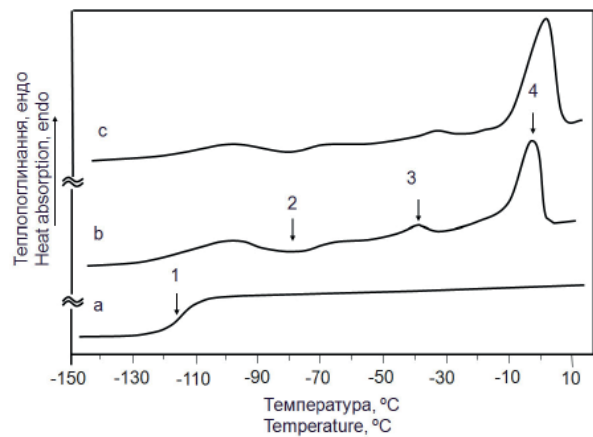


Рис. 2. ДСК-термограми: а – PVS 2; б – бруньки винограду, насичені PVS 2 методом VIV; с – бруньки винограду, насичені PVS 2 методом вимочування. 1 – розсклування; 2 – кристалізація; 3 – передплавлення; 4 – плавлення.

Fig. 2. DSC-thermograms: a – PVS2; b – grape buds saturated with PVS2 by VIV; c – grape buds saturated with PVS2 by soaking; 1 – vitrification; 2 – crystallization; 3 – pre-melting; 4 – melting.

atmosphere before saturation. In this case the air goes out of cavities without any damage to grape buds. Thus, the degassing of buds and work solution is one of the principal stages of the VIV method modernized by us.

The saturation begins from adding the working solution to vacuum chamber containing grape buds that must be submerged into the solution. This is achieved by installing the grape buds' floating limiter. The process ends only after a slow increase of the pressure to atmospheric levels, under which the solution is being directed into the deeper layers of the grape buds. In addition, the slow decrease in vacuum reduces the probability of causing the traumatizing effect on grape buds. The quantitative characteristic of high-quality saturation is the absence of floated buds after the increase in pressure to atmospheric levels. The floated buds are being excluded from the following experiments. Such effect can be attributed to the different anatomical and morphological structure of grape buds and cuttings that forms during the whole vegetation period.

The efficiency of saturating grape buds was assessed using Low-Temperature Differential Scanning Calorimetry (DSC) by changing the temperatures of phase transitions, reduction of water crystallization enthalpy and increase in heat capacity jump at glass transition [16]. In the research there was used the DSC based on the Calve calorimeter [1], which was modified at the Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of



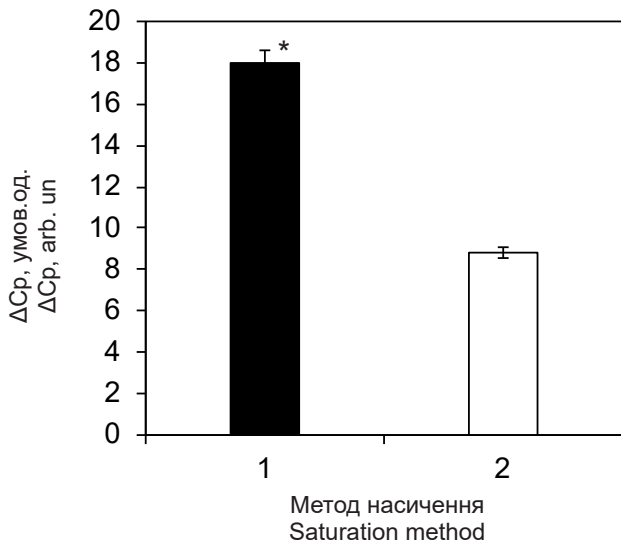


Рис. 3. Стрибок теплопоглинання (ΔC_p) у бруньках винограду, насичених PVS2 методом VIV (1) і пасивним вимочуванням (2); * – відмінності статистично значущі по відношенню до пасивного вимочування ($p < 0,01$, $n = 6$).

Fig. 3. Heat absorption jump (ΔC_p) of grape buds saturated with PVS2 by VIV (1) and passive soaking (2); * – differences are significant compared to passive soaking ($p < 0.01$, $n = 6$).

з цим пов'язане широке застосування цього розчину для криоконсервування рослинних об'єктів [15].

На ДСК-термограмах бруньок винограду, які були насичені PVS 2, крім склування, зареєстровано екзотермічний пік завершення кристалізації на етапі нагріву (рис. 2b, 2). Це обумовлено високими швидкостями охолодження, які використано у роботі для отримання максимальної кількості склоподібної фази. Подальше нагрівання бруньок приводило до розвитку передплавлення (рис. 2b, 3), яке пов'язують із плавленням зв'язаної води. Інтенсивний ендотермічний пік 4 відповідає плавленню льоду. Слід відмітити, що інтенсивність переходів у зразках бруньок, які були насичені методами VIV і пасивного насичення, суттєво відрізняються. Так, на ДСК-термограмах бруньок за використання методу VIV стрибок теплоємності під час склування в два рази більше у порівнянні з пасивним вимочуванням (рис. 3), що свідчить про перехід значуще більшої кількості рідини бруньок до склоподібної фази. Температура плавлення після використання методу VIV на 4°C нижче, а ентальпія плавлення зв'язаної води вище в 2,9 рази у порівнянні з традиційним методом пасивного насичення (рис. 4). При цьому значуще нижчою є ентальпія плавлення льоду.

Отримані результати підтверджують, що концентрація криозахисних речовин у бруньках ви-

the IPC&C of the NAS of Ukraine for studying a wide range of sample sizes and possibility of high-rate cooling. The buds (mass $\approx 1\text{g}$) were placed into calorimetric chamber without cryoprotective solution. Bronze powder was used to provide better contact of buds with the chamber walls. The samples were cooled with the rate of 200 deg/min . The thermograms were recorded at heating with the rate of 0.5 deg/min .

The Mann-Whitney U-test ($n = 6$) was used to examine a significance of the differences of the studied numerical indices. The data were presented as the mean \pm standard deviation.

Results and discussion

The analysis of DSC-thermograms showed the following. In the DSC-thermogram of cryoprotective solution PVS 2 there was recorded only a heat capacity jump 1 at -115.3°C , that was associated with the transition from solid-amorphous to supercooled liquid state (Fig 2a, 1). Exo- and endothermic peaks were not recorded that suggested the absence of crystallization both at the stages of cooling and heating. Thus, when cooling PVS 2 completely transforms into a vitreous state with a high stability of amorphous phase, which even at slow heating being higher than the glass transition temperature, did not crys-

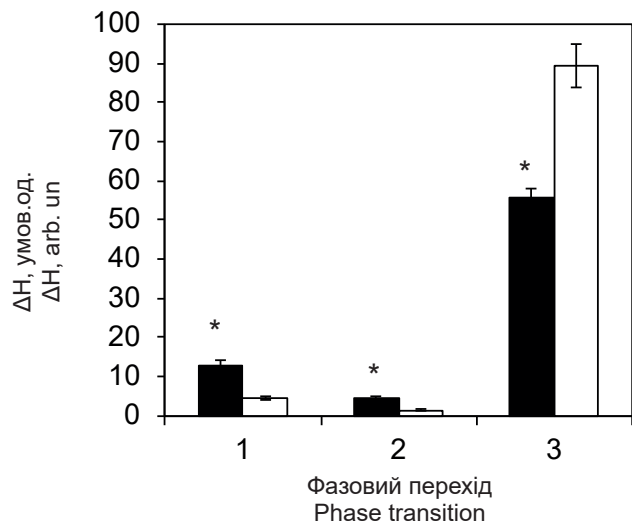


Рис. 4. Зміни ентальпії (ΔH) під час кристалізації (1), передплавлення (2) та плавлення (3) бруньок винограду, насичених PVS2 методом VIV (■) і пасивним вимочуванням (□); * – відмінності статистично значущі по відношенню до пасивного вимочування ($p < 0,01$, $n = 6$).

Fig. 4. Changes in enthalpy (ΔH) during crystallization (1), pre-melting (2) and melting (3) of grape buds saturated with PVS2 by VIV (■) and passive soaking (□); * – differences are significant compared to passive soaking ($p < 0.01$, $n = 6$).

нограду значно збільшується, а кількість вільної води, яка кристалізується під час охолодження за використання методу VIV, істотно зменшується. Термічний аналіз рослинних матеріалів із застосуванням ДСК демонструє міцний взаємозв'язок між кристалізацією або плавленням льоду та пошкодженнями біологічних об'єктів [15]. Адже саме фізико-хімічні фактори, що супроводжують фазовий перехід «вода-лід» та «лід-вода», є головними у впливі на збереженість біологічних об'єктів. Таким чином, застосування запропонованого методу насичення бруньок винограду може значно підвищити їх виживання під час кріоконсервування.

Запропонований метод VIV може стати основою загальної високопродуктивної технології для збереження *ex situ* генетичних ресурсів рослин із різноманітних середовищ існування.

Висновки

1. Встановлено, що етап дегазації тканин бруньок винограду перед зануренням у кріозахисний розчин знижує вірогідність їх пошкодження та приводить до ефективного проникнення кріозахисних речовин у тканини бруньок порівняно з традиційним методом насичення.

2. Метод вакуум-інфільтрації дозволяє в два рази скоротити час інкубації бруньок винограду у кріозахисному розчині, що зменшує вірогідність його токсичної дії на зразки.

Література

1. Кирьянов КВ. Калориметрические методы исследования. Нижний Новгород: Образовательно-научный центр; 2007. 78 с.
2. Присталов АИ, Бондарь ИН, Полулях АА, и др. Виноградство Слобожанщины: история, проблемы, перспективы создания и сохранения коллекций. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Сер. Біологія. 2014; 20(1100): 53–60.
3. Присталов АІ, Кулешова ЛГ, Розанов ЛФ, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Пристрій для вакуум-інфільтрації живців плодово-ягідних культур. Патент України на корисну модель № 121556. 11.12.2017.
4. Присталов АІ, Шевченко НО, Зеленянська НМ, Кулешова ЛГ, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб відмивання живців плодово-ягідних культур від кріозахисних середовищ. Патент України на корисну модель № 136543. 27.08.2019
5. Шевченко НО, Присталов АІ, Стрибуль ТФ, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Лабораторний пристрій для вакуум-інфільтрації живців плодово-ягідних культур. Патент України на корисну модель № 85644. 25.11.2013.5.

tallize. This prompts the wide-spread usage of this solution for cryopreservation of plants [15].

Besides glass transition, in DSC-thermograms of grape buds saturated with PVS 2 an exothermic peak of crystallization termination at the heating stage (Fig. 2b, 2) was recorded. This is caused by high cooling rates used in the research for obtaining maximal quantity of vitreous phase. Further heating of buds resulted in the development of pre-melting (Fig. 2b, 3), associated with melting of bound water. The intensive endothermic peak 4 corresponds to an ice melting. It should be noted that the intensity of transitions in the samples of grape buds saturated by the VIV and soaking are notably different. Thus, when using the VIV technique in DSC-thermograms of grape buds a heat capacity jump at glass transition is twice higher than the one that occurs during the passive soaking (Fig. 3), that indicates the transition of much higher amount of grape buds' liquid to a vitrified state. The melting temperature after using the VIV is by 4°C lower, and the melting enthalpy of bound water is by 2.9 times higher if compared with traditional method of passive saturation (Fig. 4). In addition the enthalpy of ice melting is significantly lower.

The findings confirm that the concentration of cryoprotective solutions in grape buds significantly increases and amount of free water crystallizing during cooling by means of the VIV is much lower. The thermal analysis of grape buds using DSC demonstrates the strong correlation between crystallization or ice melting and damage of plants [15]. Namely the physical and chemical factors accompanying the 'water-ice' and 'ice-water' phase transitions are the leading factors, affecting the integrity of plants. Thus, the application of the proposed technique or saturating grape buds can significantly improve their survival rate during cryopreservation.

The VIV proposed can become the basis of the unified highly productive technology for the *ex situ* preservation of genetic resources of plants from various habitats.

Conclusions

1. It has been established that before submerging into cryoprotective solution the degassing stage of grape bud tissues decreases the probability of their damage and causes an effective penetration of cryoprotective solutions into the tissues of buds compared to the traditional saturation.

2. The vacuum infiltration technique enables the incubation of grape buds in cryoprotective solution at half the time that decreases the probability of exposing the samples to toxins.



6. Funnekotter B, Whiteley SE, Turner SR, et al. Evaluation of the new vacuum infiltration vitrification (viv) cryopreservation technique for native Australian plant shoot tips. *CryoLetters*. 2015; 36(2): 104–13.
7. Kalaiselvi R, Rajasekar MA, Sankara GS. Cryopreservation of plant materials - a review. *Int J Chem Stud*. 2017; 5(5): 560–4.
8. Nadarajan J, Pritchard HW. Biophysical characteristics of successful oilseed embryo cryoprotection and cryopreservation using vacuum infiltration vitrification: an innovation in plant cell preservation. *PLOS ONE*. [Internet]. 2014 May 1 [cited 2020 May 29]; 9(5): e96169. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0096169>
9. Ogawa Y, Sakurai N, Oikawa A, et al. High-throughput cryopreservation of plant cell cultures for functional genomics. *Plant Cell Physiol*. 2012; 53(5): 943–52.
10. Ruzic D, Vujović T, Cerović R. Cryopreservation of cherry rootstock Gisela 5 (*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*) shoot tips by droplet-vitrification technique. *Journal of Horticultural Research*. 2013; 21(2): 79–85.
11. Sakai A, Hirai D, Niino T. Development of PVS-based vitrification protocol. In: Reed B, editor. *Plant cryopreservation: a practical guide*: New York: Springer; 2008. p. 33–57.
12. Tanaka D, Niino T, Uemura M. Cryopreservation of plant genetic resources. *Adv Exp Med Biol*. 2018; 1081: 355–69.
13. Uragami A, Sakai A, Nagai M, et al. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Reports*. 1989; 8(7): 418–21.
14. Volis S. How to conserve threatened Chinese plant species with extremely small populations? *Plant Diversity*. 2016; 38(1): 45–52. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pld.2016.05.003>
15. Volk GM, Walters C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology*. 2006; 52: 48–61.
16. Zamecnik J, Faltus M, Bilavcik A, Kotkova R. Comparison of cryopreservation methods of vegetatively propagated crops based on thermal analysis. In: Igor Katkov, editor. *Current Frontiers in Cryopreservation*; [Internet]. 2012 Mar 14; [cited 2020 May 29]: 333–58. Available from: <http://www.intechopen.com/books/current-frontiers-in-cryopreservation/comparison-of-cryopreservation-methods-of-vegetatively-propagated-crops-based-on-thermal-analysis>

References

1. Funnekotter B, Whiteley SE, Turner SR, et al. Evaluation of the new vacuum infiltration vitrification (viv) cryopreservation technique for native Australian plant shoot tips. *CryoLetters*. 2015; 36(2): 104–13.
2. Kalaiselvi R, Rajasekar MA, Sankara GS. Cryopreservation of plant materials - a review. *Int J Chem Stud*. 2017; 5(5): 560–4.
3. Kiryanov KV [Calorimetric research methods]. Nizhny Novgorod: Educational and scientific center; 2007. 78 p. Russian.
4. Nadarajan J, Pritchard HW. Biophysical characteristics of successful oilseed embryo cryoprotection and cryopreservation using vacuum infiltration vitrification: an innovation in plant cell preservation. *PLOS ONE*. [Internet]. 2014 May 1 [cited 2020 May 29]; 9(5): e96169. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0096169>
5. Ogawa Y, Sakurai N, Oikawa A, et al. High-throughput cryopreservation of plant cell cultures for functional genomics. *Plant Cell Physiol*. 2012; 53(5): 943–52.
6. Prystalov AI, Bondar IN, Polulyakh AA, et al. [Viticulture of Sloboda Ukraine: history, problems, prospects for establishing and preservation of collections]. *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series: biology*. 2014; 20(1100): 53–60. Russian.
7. Prystalov AI, Rozanov LF, Kuleshova LG, inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, assignee. [Device for vacuum infiltration of cuttings of fruit and berry crops]. Patent of Ukraine № 121556, 2017 Dec 11. Ukrainian.
8. Prystalov AI, Shevchenko NO, Zelenjanska NM, Kuleshova LG, inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, assignee. [Method of washing cuttings of fruit and berry cultures from cryoprotectants]. Patent of Ukraine № 136543, 2019 Aug 27. Ukrainian.
9. Ruzic D, Vujović T, Cerović R. Cryopreservation of cherry rootstock Gisela 5 (*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*) shoot tips by droplet-vitrification technique. *Journal of Horticultural Research*. 2013; 21(2): 79–85.
10. Sakai A, Hirai D, Niino T. Development of PVS-based vitrification protocol. In: Reed B, editor. *Plant cryopreservation: a practical guide*: New York: Springer; 2008. p. 33–57.
11. Shevchenko NO, Prystalov AI, Stribul TF, inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, assignee. [Laboratory device for vacuum infiltration of cuttings of fruit and berry crops]. Patent of Ukraine № 85644, 2013 Nov 25. Ukrainian.
12. Tanaka D, Niino T, Uemura M. Cryopreservation of plant genetic resources. *Adv Exp Med Biol*. 2018; 1081: 355–69.
13. Uragami A, Sakai A, Nagai M, et al. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Reports*. 1989; 8(7): 418–21.
14. Volis S. How to conserve threatened Chinese plant species with extremely small populations? *Plant Diversity*. 2016; 38(1): 45–52.
15. Volk GM, Walters C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology*. 2006; 52: 48–61.
16. Zamecnik J, Faltus M, Bilavcik A, Kotkova R. Comparison of cryopreservation methods of vegetatively propagated crops based on thermal analysis. In: Igor Katkov, editor. *Current Frontiers in Cryopreservation*; [Internet]. 2012 Mar 14; [cited 2020 May 29]: 333–58. Available from: <http://www.intechopen.com/books/current-frontiers-in-cryopreservation/comparison-of-cryopreservation-methods-of-vegetatively-propagated-crops-based-on-thermal-analysis>

