

Изучение влияния холодого закаливания картофеля на сохранность меристем, криоконсервированных медленным замораживанием

UDC 57.086.83:57.043

T.F. STRIBUL*, N.A. SHEVCHENKO, L.F. ROZANOV

Studying the Effect of Potato Cold Hardening on Integrity of Meristems, Cryopreserved by Slow Freezing

Исследовали влияние холодого закаливания на сохранность меристем картофеля при двухэтапном криоконсервировании. Использовали криопротекторы диметилсульфоксид (ДМСО) и 1,2-пропандиол (1,2-ПД). Установлено, что замораживание закалённых апексов картофеля под защитой ДМСО повышает их сохранность по сравнению с аналогичным показателем у незакалённых меристем. При использовании 1,2-ПД закалка апексов картофеля нецелесообразна. Наблюдение в течение 30 суток за развитием криоконсервированных меристем показало, что обработка криопротекторами и замораживание замедляют рост апексов по сравнению с контролем. Менее токсичным оказался 1,2-ПД. Обработка ДМСО может вызвать каллусогенез.

Ключевые слова: меристема (апекс), холодовая закалка, криопротекторы, криоконсервирование, замораживание, сохранность.

Досліджували вплив холодого загартовування на збереженість меристем картоплі при двоетапному криоконсервуванні. Використовували криопротектори диметилсульфоксид (ДМСО) та 1,2-пропандіол (1,2-ПД). Установлено, що заморожування загартованих апексів картоплі під захистом ДМСО підвищує їх збереженість порівняно з аналогічним показником у незагартованих меристем. При застосуванні 1,2-ПД загартовування апексів картоплі недоцільне. Спостереження протягом 30 діб за розвитком криоконсервованих меристем показало, що обробка криопротекторами і заморожування уповільнюють розвиток апексів порівняно з контролем. Менш токсичним виявився 1,2-ПД. Обробка ДМСО може викликати калусогенез.

Ключові слова: меристема (апекс), холодове загартовування, криопротектори, криоконсервування, заморожування, збереженість.

Cold hardening effect on potato meristem integrity at two-step cryopreservation has been studied. Such cryoprotectants as dimethyl sulfoxide (DMSO) and 1,2-propanediol (1,2-PD) have been used. Freezing of hardened potato apices under DMSO protection was established to increase their integrity in comparison with the same index in non-hardened meristems. Potato apex hardening is inexpedient when using 1,2-PD. Observation for cryopreserved meristem development within 30 days has demonstrated that treatment with cryoprotectants and freezing inhibit an apex growth in comparison with the control. 1,2-PD occurred to be less toxic. DMSO treatment can cause callus-genesis.

Key-words: meristem (apex), cold hardening, cryoprotectants, cryopreservation, freezing, integrity.

Для улучшения результатов криоконсервирования растений используют различные способы их предварительной подготовки к замораживанию, в частности холодое закаливание, которое применяется при криоконсервировании изолированных меристем, каллуса, древесных побегов [2]. Целесообразно проводить закаливание растений, обладающих выраженной холодоустойчивостью. Для улучшения результатов криоконсервирования меристемальных тканей холодое воздействие применяют к материнским растениям, культивируемым *in vitro*, из которых в дальнейшем будут выделяться меристемы для замораживания. Некоторым растениям, например черенкам винограда и побегам плодовых, для холодной адаптации нужны только пониженные температуры [17], большинству же растений требуются изменения условий фотопериода. Чаще всего для них

In order to improve the results of plants cryopreservation one uses different ways for their preliminary preparation to freezing, in particular cold hardening, applied for cryopreservation of isolated meristems, callus, tree shoots to increase their resistance to ultralow temperatures [2]. It is expedient to hard those plants, which have a manifested cold resistance. For enhancing the results of meristemal tissue cryopreservation the cold effect is applied to cultured *in vitro* maternal plants, among which the meristems will be isolated for further freezing. Some plants, for example grape cuttings and fruit shoots require only lowered temperatures for cold adaptation [17], but the majority of plants needs changes in photoperiod conditions. Most often a short light day is set for them: 8 hrs' day/16 hrs's night. *In vitro* hardening of meristem culture of apple tree (*Rubus*), *Amelanchier alnifolia*, *Vaccinium* increased their

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

устанавливают короткий световой день: 8 ч день/16 ч ночь. Закаливание *in vitro* меристем яблони (*Rubus*), *Amelanchier alnifolia*, *Vaccinium* повышало их жизнеспособность после замораживания, однако холодовая обработка меристем гороха и земляники перед замораживанием не повышала их сохранности после размораживания [11, 12].

Существуют разные мнения о возможности холодной заделки растений картофеля. Одни авторы считают, что картофель относится к растениям, которые не переносят действия пониженных положительных температур, а значит не имеют генетически обусловленной возможности к холодовому закаливанию [7], другие – что закаливание материнских растений картофеля, совмещенное с насыщением меристем криопротектором перед замораживанием методом витрификации не изменяет жизнеспособности криоконсервированного материала [15]. Однако действие холодового закаливания на меристемы картофеля при использовании медленных режимов замораживания не изучено.

Метод криоконсервирования меристем картофеля медленным замораживанием получил развитие в 80-х годах [8, 10, 16]. К концу 90-х годов было показано, что криоконсервирование меристем с использованием медленных скоростей замораживания приводит к повреждению большей части апикального конуса, что вызывает развитие каллуса [14, 15], поэтому более широко начал применяться метод “витрификации”, при котором все или большинство апексов после отогрева дают развитие проростков без стадии каллусообразования. Согласно [1] вероятность возникновения каллуса после медленного замораживания относительно невелика, следовательно, сохранение генетической стабильности образцов остается высоким.

В методах криоконсервирования с использованием медленных скоростей замораживания наиболее часто применяется криопротектор ДМСО, в 5-10%-м растворе которого выделенные для замораживания меристемы выдерживают в течение 60 мин, замораживают со скоростью $0,3 \div 0,5^\circ\text{C}/\text{мин}$ до температуры $-30 \div -40^\circ\text{C}$ с последующим погружением объектов в жидкий азот. Отогревают материал в водяной бане при температуре 40°C [8, 10, 16].

При использовании одного и того же протокола криоконсервирования жизнеспособность разных сортов картофеля может варьировать от 0 до 100% [16].

Цель работы – определение возможности использования холодной заделки растений картофеля для увеличения устойчивости их меристем к замораживанию, а также исследование

viability after freezing, however cold treatment for pea and strawberry meristems before freezing did not augment their integrity after freeze-thawing [11, 12].

There are various opinions about possibility of cold hardening for potato plants. Some authors believe that potato is related to those plants, not enduring the effect of lowered positive temperatures and not having genetically stipulated possibility to cold hardening [7], the others think that hardening of potato maternal plants, combining with meristem saturation with cryoprotectant before freezing by means of vitrification method does not change the viability of cryopreserved material. However the effect of cold hardening on potato meristems at slow freezing regimens is not studied.

Method for potato meristem cryopreservation using slow freezing had been developed within the 80s [8, 10, 16]. To the end of the 90s meristem cryopreservation using slow freezing rates was demonstrated as resulting in damaging the majority of apical cone, that caused the callus development [14, 15]. Therefore the “vitrification” method was getting widely spread, when all or the majority of apexes after thawing get rise for sprouts without callus-formation stage. As the paper described [1] the probability of callus formation after slow freezing was relatively low, consequently the preservation of samples’ genetic stability remains high.

In cryopreservation methods with using slow freezing rates the most frequently applied is DMSO cryoprotectant, in 5-10% solution of which the meristems, isolated for freezing are exposed within 60 min then frozen with $0.3 \div 0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ down to $-30 \div -40^\circ\text{C}$ with following objects immersion into liquid nitrogen. Material is thawed on water bath at 40°C [8, 10, 16].

When using the same cryopreservation protocol the viability of different potato varieties can differ from 0 to 100% [16].

The work was aimed to determine the possibilities of using cold hardening for potato plants to increase the resistance of their meristems to freezing, as well as to study cryoprotective activity of 1,2-PD cryoprotectant, manifested no toxicity in studied concentration [5].

Materials and methods

Material for investigation was obtained by artificial *in vitro* growing of “Kosyn” potato variety shoots under similar conditions, described in the paper [6]. One part of plants were subjected to hardening by moderately low temperatures. For this purpose 2 weeks prior to experiment the plants were *in vitro* exposed within 16 hrs per day without light at $5 \div 8^\circ\text{C}$. Plants were returned to the standard culturing condition for 8 hrs [6].

криозащитной активности криопротектора 1,2-пропандиола (1,2-ПД), не проявившего токсичности в исследуемой концентрации [5].

Материалы и методы

Материал для исследования получали искусственным выращиванием *in vitro* побегов картофеля сорта Косынь аналогично условиям, описанным в [6]. Одну часть растений подвергали закалке умеренно низкими температурами. Для этого за 2 недели до эксперимента растения *in vitro* выдерживали 16 ч без освещения при температуре $5\pm 8^\circ\text{C}$. На 8 ч растения возвращали в обычные условия культивирования [6].

Другую часть растений – незакаленных – выращивали при 16-часовом фотопериоде и температуре $22\pm 2^\circ\text{C}$ (контрольная группа).

Затем из незакаленных и закаленных растений вычленили апексы и готовили к криоконсервированию. Подготовка к криоконсервированию при медленном замораживании менее трудоёмка по сравнению с подготовкой к быстрому замораживанию. Она состоит в следующем: апексы после выделения помещают в чашки Петри на жидкую питательную среду без фитогормонов, содержащую соли по Murashige and Skoog [9] и витамины $B_1 - 0,1$ мг/л, $B_6 - 0,5$ мг/л, PP – 0,5 мг/л, pH среды 5,7.

На этой среде культивировали меристемы в течение 2-х суток в стандартных условиях: температура $24-26^\circ\text{C}$, освещённость $2000\div 3000$ люкс, фотопериод 16 ч день/8 ч ночь. Затем меристемы подвергали эквilibрации с криопротекторами: закаленные и незакаленные меристемы выдерживали в 1M растворах ДМСО и 1,2-ПД в течение 60 мин при температуре 22°C . Растворы криопротекторов готовили на питательной среде Murashige and Skoog (MS) [9].

После этого апексы на полосках фильтровальной бумаги, смоченных раствором криопротекторов, помещали в полиэтиленовые ампулы ёмкостью 1 см^3 с вставленными в дно алюминиевыми стержнями, способствующими самопроизвольной инициации кристаллизации жидкости в ампулах [4].

Меристемы замораживали на 1-м этапе (от 0 до $-10\div -15^\circ\text{C}$) со скоростью $0,3^\circ\text{C}/\text{мин}$, инициация кристаллизации происходила при -7°C . Скорость охлаждения меристем на 2-м этапе (от -15 до -40°C) составила $0,5^\circ\text{C}/\text{мин}$. Затем контейнеры с меристемами погружали в жидкий азот.

Через 3-е суток меристемы деконсервировали погружением на 1 мин в водяную баню с температурой 37°C .

Апексы отмывали от криопротекторов следующим образом: в течение 60 мин их дважды переносили на чистую питательную среду MS. После отмывания меристемы помещали на среду

Another part of plants (non-hardened) was grown at 16 hrs' photoperiod and temperature of $22\pm 2^\circ\text{C}$ (control group).

Then apices were separated from non-hardened and hardened plants and prepared to cryopreservation. Preparing to cryopreservation at slow freezing is less labor-intensive in comparison with that to rapid freezing. It comprises the following steps: apices after isolation are placed into Petri dishes on liquid nutrient medium without phytohormones, containing salts by Murashige and Skoog [9] and vitamins $B_1: 0.1\text{ mg/l}$, $B_6: 0.5\text{ mg/l}$, PP: 0.5 mg/l , pH medium is 5.7.

With this medium meristems were cultured within 2 days under the standard conditions: $24-26^\circ\text{C}$, $2000\div 3000$ lux illumination, 16 hrs' day/8 hrs' night photoperiod. Afterwards the meristems were subjected to equilibration with cryoprotectants: hardened and unhardened meristems were exposed in 1 M DMSO and 1,2-PD solutions within 60 min at 22°C . Cryoprotective solutions were prepared on Murashige and Skoog (MS) nutritive medium [9].

Afterwards apices on filter paper strips, moistened with cryoprotective solution were placed into 1 cm^3 polyethylene ampoules with aluminium cores adjusted into bottom, contributing to spontaneous initiation of liquid crystallization into ampoules [4].

Meristems were frozen at the 1st stage (from 0°C to $-10\div -15^\circ\text{C}$) with $0.3^\circ\text{C}/\text{min}$ rate, crystallization initiation was at -7°C . Meristem cooling rate at the 2nd stage (from -15 down to -40°C) made $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$. Then containers with meristems were immersed into liquid nitrogen.

In 3 days meristems were frozen-thawed by immersing for 1 min into 37°C water bath.

Procedure of apex washing-out from a cryoprotectant was as follows: within 60 min they were twice transferred on a pure MS nutritive medium. After washing-out meristems were placed into MS culturing medium with adding the following phytohormones (mg/l): indoleacetic acid – 0.5, kinetin – 0.5, gibberellin – 0.2.

Within 24 hrs after freeze-thawing apices were cultured in the dark and then under standard conditions.

Integrity of cryopreserved apices of "Kosyn" potato variety was assessed to the 5th day of culturing. Meristems of green color and with positive dynamics were considered as preserved ones.

Results were statistically processed using Student's methods at significance level $p=0.95$.

Results and discussion

Hardening does not affect the integrity of control meristems (without treatment) as well as the cryoprotectant-treated, but not frozen-thawed ones (Table). During freeze-thawing unhardened apices the 1,2-PD-treated meristems demonstrated higher

культивирования MS с добавлением фитогормонов (мг/л): индолилуксусной кислоты – 0,5, кинетин – 0,5, гиббереллин – 0,2.

В течение 24 ч после размораживания апексы культивировали в темноте, а затем – в стандартных условиях.

Сохранность криоконсервированных апексов картофеля сорта Косынь оценивали на 5-й день культивирования. Сохранными считали меристемы, имеющие зелёный цвет и положительную динамику роста.

Статистическая обработка результатов проведена по методу Стьюдента при уровне значимости $p=0,95$.

Результаты и обсуждение

Закалка не влияет на сохранность как необработанных, так и обработанных криопротекторами, но не замораживаемых меристем (таблица). При замораживании незакалённых апексов лучшую сохранность показали меристемы, обработанные 1,2-ПД (70% жизнеспособных), по сравнению с обработанными ДМСО (50%). Закалка способствовала повышению сохранности после замораживания апексов, обработанных ДМСО (72% для закалённых меристем, 50% для незакалённых), и несколько снижала (в пределах ошибки) сохранность меристем, консервируемых под защитой 1,2-ПД (60 и 70% соответственно). В связи с тем, что сохранность закалённых и незакалённых меристем после замораживания-оттаивания с 1,2-ПД в пределах ошибки измерения не отличается, то при его применении закалка апексов картофеля нецелесообразна.

За развитием некоторых сохранившихся меристем наблюдали в течение последующих 30 суток. Следует отметить, что обработка криопротекторами и последующее криоконсервирование вызывают замедление развития апексов по сравнению с контролем. Например, контрольные (не подвергавшиеся обработке криопротекторами и замораживанию) апексы через месяц культивирования подросли. У каждого из них появилось по 2 листика и несколько корешков. За это время обработанные 1,2-ПД и не подвергавшиеся замораживанию меристемы также увеличились в размерах, но меньше чем не обрабатываемые криопротекторами апексы. У некоторых из них появилось по одному корешку и по 1,2 междоузлия.

integrity (70% viability) in comparison with DMSO-treated ones (50%). Hardening contributed to integrity increase after freezing the DMSO-treated apices (72% for hardened meristems, 50% for unhardened ones) and slightly reduced (within error limit) the integrity of meristems, cryopreserved under 1,2-PD protection (60 and 70%, correspondingly). Due to the fact, that the integrity of hardened and unhardened meristems after freeze-thawing with 1,2-PD within measurement limits does not differ, the potato apex hardening at its application is not expedient.

Development of some preserved meristems was observed within following 30 days. Of note is that cryoprotectant treatment and even in a greater extent following freezing cause the inhibition of apex development in comparison with the control. For example, the control (cryoprotectant-free and non-frozen-thawed) apices in a month of culturing grew up. Each of them had 2 leaves and some rootlets. For this time the 1,2-PD treated (non-frozen-thawed) meristems also increased, but less than cryoprotectant-free apices. Some of them had by one rootlet and by 1-2 internodes. DMSO treatment inhibited even more the meristem growth and development: they grew up but less if to compare with 1,2-PD treatment. In some DMSO-treated meristems a callus was developed instead of roots.

Dependency of phenotypic indices of apices on toxic effect of cryoprotectants is the same in hardened and non-hardened meristems within the mentioned observation term.

Frozen-thawed potato meristems delayed in development from their control variants. 1,2-PD- and DMSO-treated meristems increased in size, their primordia began to transform into leaf sprouts. No rootlets were observed. However in some DMSO-treated meristems a callus began to develop.

Сохранность криоконсервированных меристем картофеля сорта Косынь после медленного замораживания (меристемы, выжившие после размораживания на 5-й день культивирования)

Preservation of cryopreserved meristems of Kosyn potato after slow freezing (meristems, survived after freeze-thawing to the 5th day of culturing)

Криопротектор Cryoprotectant	Без закалывания No hardening		Закалывание Hardening	
	Без замораживания No freeze-thawing	Замораживание Freeze-thawing	Без замораживания No freeze-thawing	Замораживание Freeze-thawing
Без обработки No treatment	100	–	100	–
ДМСО DMSO	95±6	50±4*	95±5	72±7*
1,2-ПД 1,2-PD	91±3	70±9*	88±4	60±6*

* – различие достоверно по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

* – statistically significant changes comparing to control data ($p \leq 0,05$).

Обработка ДМСО ещё больше угнетала рост и развитие меристем: рост наблюдался, однако в меньшей степени, чем после обработки 1,2-ПД. У части меристем, обработанных ДМСО, вместо корней развивался каллус.

Зависимость фенотипических показателей апексов от токсического действия криопротекторов аналогична у закалённых и незакалённых меристем на протяжении указанного срока наблюдения.

Криоконсервированные меристемы картофеля отставали в развитии от контрольных вариантов. Обработанные 1,2-ПД и ДМСО меристемы увеличились в размерах, примордии у них начали превращаться в зачатки листочков. Корешков не наблюдалось. Однако у части меристем, обработанных ДМСО, начал развиваться каллус.

Выводы

Криоконсервирование незакалённых и закалённых меристем картофеля сорта Косынь, обработанных как ДМСО, так и 1,2-ПД, снижает количество выживших апексов по сравнению с контрольными меристемами.

Замораживание-оттаивание закалённых апексов картофеля под защитой ДМСО приводит к увеличению их сохранности по сравнению с аналогичным показателем у незакалённых.

Если в качестве криопротектора применяется 1,2-ПД, то закалка апексов картофеля нецелесообразна.

Наблюдение в течение 30 суток за развитием меристем, криоконсервированных под защитой 1,2-ПД и ДМСО, показало, что обработка криопротекторами и последующее замораживание-оттаивание приводят к замедлению роста апексов по сравнению с меристемами, не подвергавшимися воздействию криопротекторов и замораживанию-оттаиванию. Менее токсичным в этом отношении оказался 1,2-ПД. Обработка ДМСО может вызвать образование каллуса.

Литература

1. *Высоцкая О.Н., Попов А.С.* Сравнение технологических приемов криосохранения апикальных меристем растений // *Цитология.*– 2004.– Т. 46, №9.– С. 774.
2. *Мануильский В.Д.* Формирование криорезистентности и устойчивости растений к низким температурам.– Киев: Наук. думка, 1992.– 188 с.
3. *Стрибуль Т.Ф., Олейник С.Т., Новиков А.Н., Григорашенко А.И.* Оптимизация метода криоконсервирования меристем картофеля // *Пробл. криобиологии.*– 1999.– №1.– С. 57-60.
4. *Олейник С.Т.* Иницирование фазового перехода вода-лёд в биологических системах при низкотемпературном консервировании: Автореф. дис... канд. биол. наук.– Харьков, 1987.– 19 с.

Conclusions

Freezing-thawing of non-hardened and hardened meristems of “Kosyn” potato variety, treated with both DMSO and 1,2-PD reduces the amount of survived apices in comparison with the control meristems.

Freezing-thawing of hardened potato apices under DMSO protection results in an increase of their integrity in comparison with the same indices in unhardened ones.

If one applies 1,2-PD as cryoprotectant, the potato apex hardening is not expedient.

Observation within 30 days for the development of cryopreserved meristems demonstrated that cryoprotectant treatment and even in a greater extent following freezing caused a delay of apex growth in comparison with the control. In this respect 1,2-PD occurred to be less toxic. DMSO treatment can cause callus formation.

References

1. *Vysotskaya O.N., Popov A.S.* Comparison of technological methods for plant apical meristem cryopreservation // *Tsitologia.*– 2004.– Vol. 46, N9.– P. 774.
2. *Manuilsky V.D.* Formation of cryoresistance and resistance to low temperatures in plants.– Kiev: Naukova Dumka, 1992.– 188 p.
3. *Stribul T.F., Olejnik S.T., Novikov A.N., Grigoraschenko A.I.* Optimizing method for potato meristem cryopreservation // *Problems of Cryobiology.*– 1999.– N1.– P. 57-60.
4. *Olejnik S.T.* Initiation of water-ice phase transition in biological systems at low temperature preservation: Author's abstract of thesis of candidate of biological sciences.– Kharkov, 1987.– 19 p.
5. *Shevchenko N.A., Stribul T.F., Rozanov L.F.* Effect of multiatom alcohols, amides and DMSO on grape and potato meristems integrity // *Problems of Cryobiology.*– 2004.– N3.– P. 79-85.
6. *Shevchenko N.A., Stribul T.F., Rozanov L.F.* Optimizing method for potato meristem vitrification // *Problems of Cryobiology.*– 2005.– Vol.15, N4.– P. 657-664.
7. *Grospietsch M., Stodulkova E., Zamechnik J.* Effect of osmotic stress on dehydration tolerance and cryopreservation of *Solanum tuberosum* shoot tips // *Cryo-Letters.*– 1999.– Vol.20, N6.– P. 339-346.
8. *Harding K., Benson E.E., Smith H.* The effect of pre-freeze in vitro culture period on the recovery of cryopreserved shoot-tips of *Solanum tuberosum* // *Cryo-Letters.*– 1991.– Vol.12, N1.– P. 17-22.
9. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid grown and bioassay with tobacco tissue culture // *Physiologia Plantarum.*– 1962.– Vol. 15, N3.– P. 473-497.
10. *O'Hara J.F., Henshaw G.G.* Cryopreservation and strategies for plant germplasm conservation // *Cryo-Letters.*– 1980. – Vol.1, N8.– P. 261-266.
11. *Reed B.M.* Cold acclimation as a method to improve survival of cryopreserved *Rubus* meristems // *Cryo-Letters.*– 1988.– Vol. 9, N3.– P. 166-171.
12. *Reed B.M.* The effect of cold hardening and cooling rate on survival of apical meristems of *Vaccinium* species frozen in liquid nitrogen // *Cryo-Letters.*– 1989.– Vol.10, N5.– P. 315-322.
13. *Reed B.M., Chang Y.* Medium- and long-term storage of in vitro cultures of temperate fruit and nut crops // *Conservation of plant genetic resources in vitro.* Vol.1: General Aspects /

5. Шевченко Н.А., Стрибуль Т.Ф., Розанов Л.Ф. Действие многоатомных спиртов, амидов и ДМСО на сохранность меристем винограда и картофеля // Пробл. криобиологии.– 2004.– №3.– С. 79-85.
6. Шевченко Н.А., Стрибуль Т.Ф., Розанов Л.Ф. Оптимизация метода витрификации меристем картофеля // Пробл. криобиологии.– 2005.– Т. 15, №4.– С. 657-664.
7. Grospietsch M., Stodulkova E., Zamechnik J. Effect of osmotic stress on dehydration tolerance and cryopreservation of *Solanum tuberosum* shoot tips // Cryo-Letters.– 1999.– Vol.20, N6.– P. 339-346.
8. Harding K., Benson E.E., Smith H. The effect of pre-freeze in vitro culture period on the recovery of cryopreserved shoot-tips of *Solanum tuberosum* // Cryo-Letters.– 1991.– Vol.12, N1.– P. 17-22.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid grown and bioassay with tobacco tissue culture // Physiologia Plantarum.– 1962.– Vol. 15, N3.– P. 473-497.
10. O'Hara J.F., Henshaw G.G. Cryopreservation and strategies for plant germplasm conservation // Cryo-Letters.– 1980. – Vol.1, N8.– P. 261-266.
11. Reed B.M. Cold acclimation as a method to improve survival of cryopreserved *Rubus* meristems // Cryo-Letters.– 1988.– Vol. 9, N3.– P. 166-171.
12. Reed B.M. The effect of cold hardening and cooling rate on survival of apical meristems of *Vaccinium* species frozen in liquid nitrogen // Cryo-Letters.– 1989.– Vol.10, N5.– P. 315-322.
13. Reed B.M., Chang Y. Medium- and long-term storage of in vitro cultures of temperate fruit and nut crops // Conservation of plant genetic resources *in vitro*. Vol.1: General Aspects / Eds. Razdan M.K., Cocking E.C.– Enfield, USA: Science Publishers Inc., 1997.– P. 67-105.
14. Sakai A. Development of cryopreservation techniques // Proceedings of the JIRCAS/IPGRI Joint International Workshop 'Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application'.– Tsukuba, Japan, 1998.– P. 1-7.
15. Takagi H. Recent development in cryopreservation of shoots apices of tropical species // Proceedings of the JIRCAS/IPGRI Joint International Workshop 'Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application'.– Tsukuba, Japan, 1998.– P. 178-193.
16. Towill L.E. Survival at ultralow temperatures of shoot tips from *Solanum tuberosum* groups *Andigena*, *Plureja*, *Stenotomum*, *Tuberosum* and other tuber bearing *Solanum* species // Cryo-Letters.– 1984.– Vol. 5, N5.– P. 319-326.
17. Zhao Y., Wu Y., Engelmann F., Zhou M. Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) *in vitro* plantlets // Cryo-Letters.– 2001.– Vol. 22, N5.– P.321-328.

Accepted in 22.03.2005

Поступила 22.03.2005