

УДК 612.44.014.086.3:616.127-002:612.649.011.87.014.3

Т.І. Віценя¹, Т.В. Івченко¹, Н.О. Шевченко^{2*}, Т.Ф. Стрибуль³

Вплив розміру експлантів та фітогормонального складу живильного середовища на відновлення меристем часнику після кріоконсервування методом вітрифікації

UDC 612.44.014.086.3:616.127-002:612.649.011.87.014.3

T.I. Vitsenia¹, T.V. Ivchenko¹, N.O. Shevchenko^{2*}, T.F. Stribul³

Effect of Explant's Size and Phytohormonal Composition of Nutritive Medium on Post-Vitrification Recovery of Garlic Meristems

Реферат: Дослідження впливу розмірів експлантів та складу живильного середовища на морфометричні показники деконсервованих меристем часнику дозволить суттєво оптимізувати методи кріоконсервування для створення колекції його сортів у низькотемпературному банку. Апеки піддавали дегідратації розчином, що вітрифікується (1 М сахарози + 2 М гліцерину + 2,5 М етиленгліколю на сольовому середовищі Мурасиге-Скуга) протягом 120 хв, розміщували у поліпропіленові контейнери та занурювали у рідкий азот. Відігрів здійснювали у водяній бані з температурою 40°C, відмивали від кріопротекторів дворазовим перенесенням на живильне середовище з 0,3 М сахарози. Показано, що досліджений розчин є нетоксичним для меристем часнику та дозволяє отримувати високий рівень життєздатності. Після кріоконсервування методом вітрифікації меристем часнику ярого сорту «Мануйлівський» кількість регенерованих рослин сягала (56,3 ± 11,2)%, а озимого сорту «Дюшес» – (44,8 ± 3,7)%. Для культивування кріоконсервованих меристем часнику в якості фітогормону доцільно використовувати кінетин у концентрації 0,5 мг/л. Було показано, що після кріоконсервування методом вітрифікації найбільшу життєздатність мають меристеми часнику розміром 2–3 мм (60–70%). Більші за розміром меристеми (3,5–4 мм) мають високий регенеративний потенціал, але низьку життєздатність (менш ніж 25%). У менших за розміром меристем (1–1,5 мм) знижені показники життєздатності (30–47%) та регенеративний потенціал. У меристем розміром 0,5 мм регенеративний потенціал відсутній.

Ключові слова: меристеми часнику; розчин, що вітрифікується; кріоконсервування; фітогормони.

Реферат: Исследование влияния размеров эксплантов и состава питательной среды на морфометрические показатели деконсервированных меристем чеснока позволит существенно оптимизировать методы кріоконсервирования для создания коллекции его сортов в низкотемпературном банке. Апеки подвергали дегидратации витрифицирующимся раствором (1 М сахарозы + 2 М глицерина + 2,5 М этиленгликоля на солевой среде Мурасиге-Скуга) в течение 120 мин, размещали в полипропиленовые контейнеры и погружали в жидкий азот. Отогрев осуществляли в водяной бане с температурой 40°C, отмывали от кріопротекторов двукратным переносом на питательную среду с 0,3 М сахарозой. Показано, что исследуемый раствор является нетоксичным для меристем чеснока и позволяет получать высокий уровень жизнеспособности. После кріоконсервирования методом витрификации меристем чеснока ярового сорта «Мануйловский» количество регенерированных растений достигало (56,3 ± 11,2)%, а озимого сорта «Дюшес» – (44,8 ± 3,7)%. Для культивирования кріоконсервованных меристем чеснока в качестве фитогормона целесообразно использовать кинетин в концентрации 0,5 мг/л. Было показано, что после кріоконсервирования методом витрификации наибольшую жизнеспособность имеют меристемы чеснока размером 2–3 мм (60–70%). Большие по размеру меристемы (3,5–4 мм) имеют высокий регенеративный потенциал, но низкую жизнеспособность (менее 25%). В меньших по размеру меристемах (1–1,5 мм) снижены показатели жизнеспособности (30–47%) и регенеративный потенциал. В меристемах размером 0,5 мм регенеративный потенциал отсутствует.

Ключевые слова: меристемы чеснока, витрифицирующийся раствор, кріоконсервирование, фитогормоны.

Abstract: Investigation of the effect of explants dimensions and composition of nutritive medium on morphometric parameters of devitrified garlic meristems will enable a significant optimizing of the cryopreservation techniques intended to establish a collection of its cultivars at low temperature bank. Apexes were subjected to dehydration with plant vitrification solution (1M sucrose + 2M glycerol + 2.5 M ethylene glycol based on Murashige-Skoog salt medium) for 120 min, placed into a polypropylene container and immersed into liquid nitrogen. Thawing was performed in a water bath at 40°C, washing of cryoprotectants was carried-out by a two-fold transfer into the medium with 0.3 M sucrose. It has been shown that the solution under study was non-toxic to garlic meristems and allowed the obtaining of a high level of viability. After cryopreservation by means of vitrification of garlic meristems of 'Manuylivsky' spring variety the number of regenerated plants reached (56.3 ± 11.2)%, and 'Duchess' winter variety did (44.8 ± 3.7)%. For the cultivation of the cryopreserved garlic meristems as the phytohormone the kinetin is advisable to be used in concentration of 0.5 mg/l. It has been shown that after cryopreservation by vitrification the garlic meristems of 2–3 mm had the highest viability (60–70%). Larger meristems (3.5–4 mm) had a high regenerative potential but low viability (below 25%). In smaller meristems (1–1.5 mm) the viability rates were reduced (30–47%) as well as a regenerative potential. In the meristems of 0.5 mm a regenerative potential was absent.

Key words: garlic meristems, plant vitrification solution, cryopreservation, phytohormones.

¹Інститут овочівництва і баштанництва УААН

²Низькотемпературний банк біологічних об'єктів, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

³Відділ кріопротекторів, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015;
тел.: (+38 057) 373-59-53, факс: (+38 057) 373-30-84,
електронна пошта: shevchenko_nadyusha@ukr.net

Надійшла 23.09.2014

Прийнята до друку 17.10.2014

¹Institute of Vegetables and Melons of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Low Temperature Bank of Biological Objects, and

³Department of Cryoprotectants, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 373 5953, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: shevchenko_nadyusha@ukr.net

Received September, 23, 2014

Accepted October, 17, 2014

Національна колекція часнику (*Allium sativum* L.) налічує понад 110 зразків, які характеризуються високою якістю продукції, пристосованістю до умов вирощування, стійкістю та толерантністю до хвороб і шкідників. Перед національним генетичним банком стоїть завдання не тільки зібрати, зареєструвати та вивчити зразки, але й зберегти все багатство генетичного різноманіття цих унікальних форм, які необхідні як для покращення сучасних сортів, так і для виведення нових [17]. В Україні розробляються способи створення різного типу колекцій. В активних банках (IVAG (*in vitro active gene bank*)) зразки часто використовуються в селекційній практиці, отже потребують середньострокового зберігання за низьких позитивних температур. У низькотемпературних банках (IVBG (*in vitro base gene bank*)) – експланти оздоровлених рослин зберігаються за температури рідкого азоту (-196°C) [3, 4, 10, 16]. Консервування за наднизьких температур дозволяє виключити виснаження запасних речовин, накопичення токсинів, розпад і активацію ферментних комплексів, окислення ліпідів, деградацію функціональних і генетичних систем, а також маловивчені біохімічні або біофізичні процеси, пов'язані зі старінням клітин [10, 16].

У 2002 р. групою E.R.J. Keller було розроблено спосіб кріоконсервування меристем часнику, який передбачає двоетапну дегідратацію розчином, що вітрифікується (*plant vitrification solution 3* (PVS)), до складу якого входять гліцерин та сахароза у співвідношенні (50:50) % [12, 13]. Але при відпрацюванні даного методу кріоконсервування у наших умовах, ми не одержали задовільних результатів життєздатності, більшість меристем утворювали калюс. У наших роботах була доведена перспективність використання розчину, що вітрифікується (PVS N), для кріоконсервування меристем картоплі та винограду, який дозволяє значно спростити процедуру дегідратації та отримати високий процент регенерації [6, 7].

Раніше було показано [14, 16, 19, 20], що співвідношення цитокінінів, ауксинів і гіберелінової кислоти у середовищі культивування не впливає на життєздатність меристем видів *Vitis*, *Citrus*, *Anigozanthos*, *Pyrus* на етапі культивування, але позначається на розвитку деконсервованих апексів у паростки. Істотний вплив на результат кріоконсервування має розмір і стадія розвитку меристем, які виділяються з *in-vitro*-рослин. Зразок повинен мати апікальний купол і кілька примордіальних листків, але при цьому він має бути досить малим за розміром [16, 18]. Наприклад, життєздатність і ріст меристем маниока (*Cassava* L) істотно підвищується, коли для кріоконсервування використовують апекси розміром 1–2 мм. Апекси калоказії (*Calocassia*

Ukrainian National Collection of garlic (*Allium sativum* L.) comprises over 110 samples characterized with a high quality production, adaptation to growing conditions, resistance and tolerance to diseases and pests. The National Genetic Bank is designated not only to collect, register and study the samples, but to preserve the genetic diversity of these unique forms which are necessary for the improvement of contemporary cultivars and for developing the new ones [14]. Ukrainian investigators use the methods to establish different types of collections. Active banks (IVAG (the *in vitro* active genebank)) are intended for the samples often used in breeding practice, thus requiring a medium-term storage at low positive temperatures. In the low-temperature banks (IVBG (the *in vitro* base genebank)) the explants of the recovered plants are kept at the temperature of liquid nitrogen (-196°C) [4, 11, 13, 18]. Preservation at ultra-low temperatures enables to avoid the exhaustion of reserve substances, accumulation of toxins, decay and activation of enzyme complexes, lipid oxidation, degradation of functional genetic systems, as well as poorly studied biochemical or biophysical processes associated with aging of cells [4, 13].

In 2002 the group of E.R.J. Keller developed the cryopreservation method for garlic meristems, which involved a two-stage dehydration with the vitrifying solution (plant vitrification solution 3 (PVS)), which consisted of glycerol and sucrose in the 50:50 ratio [12, 13]. But implication of this cryopreservation method for our tasks did not result in satisfactory outcomes of viability, most meristems formed callus. Our studies showed the perspectives of another vitrifying solution (PVS N) developed for cryopreservation of potato and grape meristems, which enabled to simplify significantly the dehydration procedure and to get a high percentage of regeneration [15, 16].

It was shown previously [10, 13, 19, 20] that the proportions of cytokinins, auxins and gibberellic acid in the culturing medium did not affect the viability of the meristems of *Vitis*, *Citrus*, *Anigozanthos*, *Pyrus* species at the cultivation stage, but affected the development of devitrified apices into shoots. The size and stage of development of the meristems isolated from *in vitro* plants had a significant impact on the cryopreservation outcome. The sample must have an apical dome and some primordial leaves, but nevertheless its size has to be small enough [13, 17]. For example, the viability and growth of *Cassava* meristems are significantly increased if cryopreservation involved apices of 1–2 mm. The apices of calocassia (*Calocassia esculenta*) of 0.5–0.8 mm, containing 1–2 pairs of primordial leaves were effectively dehydrated by the plant vitrification solutions and were better recovered after cryopreservation than the apices of larger sizes.



esculenta) розмірами 0,5–0,8 мм, які містять 1–2 пари примордіальних листків, ефективніше дегідратуються розчинами, що вітрифікуються, та краще відновлюються після кріоконсервування, ніж апекси великих розмірів. Верхівкові меристеми рослин видів *Cymbidium*, *Bromelaceae*, *Oryza*, *Musa* з частково розвиненими листковими примордіями мають кращий регенеративний потенціал при культивуванні взагалі та кріоконсервуванні зокрема, ніж апекси з нерозвиненими або повністю розкритими примордіальними листками [8, 13, 16, 18].

В Україні дослідження з кріоконсервування меристем часнику для створення IVBG колекцій не проводилися. Тому метою даної роботи є оцінка ефективності PVS N, біотехнологічних методик клонального мікророзмноження часнику в культурі *in vitro*, які передбачають визначення розміру експлантів та фітогормонального складу регенеративного середовища для отримання високого показника життєздатності рослин із кріоконсервованих меристем.

Матеріали та методи

Матеріалом для розробки методики зберігання часнику в умовах рідкого азоту були меристеми різних за типом розвитку сортів «Дюшес» (озимий) і «Мануйлівський» (ярий), які виділяли з донця зубків. Стерилізацію матеріалу проводили в ламінарному боксі «БАНП-01 Ламінар-С» (Росія) у такій послідовності: зубок занурювали у розчин 70%-го етилового спирту на 5–10 с, далі обробляли шляхом занурення у 2,6%-й розчин гіпохлориту натрію за експозиції 20 хв та промивали не менше 5 разів стерильною дистильованою водою [1, 2].

З простерилізованих зубків часнику під біокуляром «МБС-9» (СРСР) при 16-кратному збільшенні виділяли меристеми розміром 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 мм та піддавали їх попередньому культивуванню на поверхні твердого живильного середовища Мурасіге-Скуга (МС) [15] із додаванням 4,5% сахарози та по 1 мг/л тіаміну, піридоксину й аскорбінової кислоти у скляних пеніцилінових флаконах об'ємом 10 мл («Алхім», Україна) за температури 22°C у темряві. На кожний окремих варіант досліду висаджували по 30 експлантів. Для приготування розчинів кріопротекторів використовували сольове середовище МС.

Через дві доби після попереднього культивування меристеми з флаконів переносили на фільтрувальний папір у чашки Петрі («FLC Medical», Італія) та дегідратували протягом 120 хв у PVS N (1 М сахарози + 2 М гліцерину + 2,5 М етиленгліколю). Після обробки кріозахисним середовищем меристеми поміщали у поліпропіленові контейнери типу Епендорф («FLC Medical») місткістю 1,8 см³,

Apical meristems of *Cymbidium*, *Bromelaceae*, *Oryza*, *Musa* plants with partially developed leaf primordia had higher regenerative potential during culturing in general and cryopreservation in particular than the apexes with non-developed or fully open primordial leaves [1, 9, 13, 17].

There were no studies on cryopreservation of garlic meristems to establish the IVBG collections in Ukraine so far. Therefore the purpose of this study was to evaluate the effectiveness of PVS N, as well as the biotechnological techniques for clonal micropropagation of garlic in the *in vitro* culture, which foresee the determining of the size of explants and phytohormonal composition of regenerative medium for obtaining a high viability rate of plants of cryopreserved meristems.

Materials and methods

The investigations for developing the storage methods of garlic in liquid nitrogen conditions were performed in the meristems of different developmental types: 'Duchess' (winter) and 'Manuylivskyy' (spring) cultivars, which were isolated from the stems of cloves. The material was sterilized in clean room 'BAVnp Laminar-01-C' (Russia) as follows: a clove was immersed into a solution of 70% ethanol for 5–10 seconds, then was put into 2.6% solution of sodium hypochlorite and incubated for 20 min, and thereafter washed at least 5 times with a sterile distilled water [6, 7].

The meristems of 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5; 4.0 mm were isolated from sterilized garlic cloves using MBS-9 binocular (USSR) at 16-fold magnification, thereafter they were pre-cultivated in 10 ml glass penicillin bottles (Alhim, Ukraine) at 22°C in the dark on the surface of the Murasige-Skoog (MS) solid nutritive medium [12] supplemented with 4.5% sucrose and by 1 mg/l of thiamine, pyridoxine and ascorbic acid. Each single experimental version comprised 30 planted explants. To prepare the solutions of cryoprotectants the MS saline was used.

In two days after the pre-cultivation the meristems were transferred from the bottles onto a filter paper in Petri dishes (FLC Medical, Italy) and then dehydrated for 120 min in PVS N (1 M sucrose + 2 M glycerol + 2.5 M ethylene glycol). After treatment with cryoprotective medium the meristems were placed into 1.8 cm³ Eppendorf-type polypropylene containers (FLC Medical, Italy), which were hermetically sealed and immersed into liquid nitrogen. The change of temperature in the container was recorded with two-channel temperature sensor Owen TRM 200 (Russia), the cooling rate at the step from 22 down to –70°C made (49 ± 12) deg/s. Warming was performed by immersing the container with meristems into a water bath (VB-4, China) at 40°C. The rate of warming from –196 to 22°C was

які герметично закривали та занурювали у рідкий азот. Зміну температури у контейнері реєстрували двоканальним термодатчиком «Овен ТРМ 200» (Росія), швидкість охолодження на етапі від 22 до -70°C складала (49 ± 12) град/с. Відігрів здійснювали шляхом занурення контейнерів із меристемами у водяну баню («ВБ-4», Китай) з температурою 40°C . Швидкість відігріву від -196 до 22°C становила (42 ± 15) град/с. Для визначення впливу етапів підготовки експлантів до кріоконсервування частину меристем не піддавали низькотемпературній обробці. Кріопротектори відмивали шляхом дворазового послідовного перенесення меристем на фільтрувальний папір, насичений 0,3 М розчином сахарози. За контроль у досліді брали незаморожені апікальні меристеми, які не підлягали обробці розчином, що вітрифікується.

Для визначення життєздатності та морфометричних показників рекультивованих меристем після кріоконсервування та обробки розчином, що вітрифікується, використовували живильне середовище МС, яке містить 0,5 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) + 0,1 мг/л індолілоцтової кислоти (ІоцК). Це середовище дозволяє одержати найкращу регенерацію експлантів при розмноженні культури часнику в умовах *in vitro* [2]. Для визначення впливу фітогормонів на ріст меристем після їх зберігання у рідкому азоті було досліджено три варіанта твердих живильних середовищ для рекультивування, які відрізнялися вмістом та концентрацією фітогормонів класу цитокінінів (БАП, кінетин). Вплив розміру меристем на їх відновлення після кріоконсервування досліджували з використанням сольового середовища МС із додаванням 0,5 мг/л кінетину + 0,1 мг/л ІоцК + 100 мг/л проліну L + 100 мг/л гідролізата казеїну. Рослинний матеріал рекультивували у скляних пеніцилінових флаконах за температури $22...26^{\circ}\text{C}$ із 16-годинним фотоперіодом. Інтенсивність освітлення відповідала типу донорського експланту: 2–3 кілолюкс для меристем у перший місяць культивування та 5 кілолюкс протягом наступних місяців культивування адвентивних пагонів.

Збереженість експлантів визначали на 5-у добу культивування за кількістю меристем, які мали зелене забарвлення, життєздатність – за кількістю апексів, що утворили листки та корені на 50- та 90-у доби культивування, та виражали у процентному співвідношенні до загальної кількості дослідних меристем. Також підраховували кількість утворених листків та коренів у регенованих рослин.

Реєстрацію та облік зразків у лабораторних журналах проводили відповідно до дескриптора *Allium spp* [9].

(42 ± 15) deg/s. To examine the influence of cryopreservation preparation steps *per se* on the explants the part of meristems was treated excluding low-temperature exposure. The cryoprotectants were washed-out by two consequent transfers of the meristems on filter papers saturated with 0.3 M sucrose solution. Non-frozen apical meristems not treated with the plant vitrification solution were assumed as the control in the experiments.

After re-cultivation of meristems performed to determine their viability and morphometric parameters following cryopreservation and/or treatment with plant vitrification solution they were placed to the nutritive MS medium with 0.5 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP) + 0.1 mg/l indoleacetic acid (IAA). This medium enables the obtaining of higher regeneration of the explants during reproduction of garlic culture *in vitro* [6]. To determine the effect of phytohormones on growth of meristems after the storage in liquid nitrogen three options of solid nutritive media for re-culturing were investigated, which differed by the content and concentration of phytohormones of cytokinins type (BAP, kinetin). The effect of meristems dimensions on their recovery after cryopreservation was investigated using MS saline supplemented with 0.5 mg/l kinetin + 0.1 mg/l IAA + 100 mg/l proline L + 100 mg/l casein hydrolyzate. The plant material was recultivated in glass penicillin bottles at $22...26^{\circ}\text{C}$ with 16-hr-long photoperiod. The light intensity corresponded to the donor explant type: 2–3 klx for meristems during the first month of cultivation and 5 klx during the following months of the cultivation of adventive shoots.

Survival rate of the explants was determined to the 5th day of cultivation by counting the number of meristems, which were green coloured, the viability was assessed by the number of apexes, formed the leaves and roots to the 50th and 90th days of cultivation and expressed as the percentage ratio to a total number of the studied meristems. The number of leaves and roots formed in regenerated plants was also counted.

The samples were registered and recorded in the laboratory journals according to the *Allium spp* descriptor [3].

Results and discussion

Use of vitrification solutions is considered as one of the possible ways for successful low temperature preservation of biological objects with keeping a high level of viability. High concentrations of penetrating cryoprotectants (glycerol, 1,2-propane diol, ethylene glycol, *etc.*) affect the hardening processes during the temperature lowering, and result usually in achieving a vitrified state. Cryobiological applications are now often involving high concentrations of cryoprotectants

Результати та обговорення

Застосування розчинів, що вітрифікуються, вважається одним із можливих шляхів успішного низькотемпературного консервування біологічних об'єктів зі збереженням високого рівня життєздатності. Великі концентрації проникаючих кріопротекторів (гліцерин, 1,2-пропандіол, етиленгліколь та ін.) впливають на процеси затвердіння при зниженні температури, наслідком чого, зазвичай, є досягнення склоподібного стану. У кріобіології все частіше використовуються великі концентрації кріопротекторів для кріоконсервування методом вітрифікації як клітинних суспензій, так і органів. Проте досі повністю не розкриті механізми реакції біологічних об'єктів на дію високих концентрацій кріопротекторів, які характеризуються різними фізико-хімічними властивостями, перш за все, різною проникаючою здатністю та токсичністю. З метою зменшення вірогідності пошкодження клітин при насиченні розчинами, що вітрифікуються, використовують як одно-, так і багатокомпонентні середовища [11].

Оскільки більшість кріопротекторів є ксенобіотиками, то вони можуть мати цитотоксичний ефект на біологічні системи, а також проявляти різні осмотичні ефекти. Тому нами було визначено вплив досліджуваного розчину, що вітрифікується, на відновлення апікальних меристем часнику після дегідратації (без етапу вітрифікація-відігрів).

Збереженість меристем часнику обох сортів після дегідратації у PVS N через 5 діб культивування була на рівні 80–90%. При подальшому культивуванні у частини меристем, які мали зелене забарвлення, живими виявилися лише примордіальні листки, а апікальний купол був пошкоджений і за подальшого культивування з нього не розвивався пагін. Отже, такі меристеми були нежиттєздатними. Таким чином, встановлено, що за даних умов дегідратації досліджуваний нами розчин не має вираженої токсичної дії, отже може застосовуватися для кріоконсервування меристем часнику методом вітрифікації.

Інтенсивне утворення пагонів із меристем, які зберігали за умов рідкого азоту, розпочиналося через 7–10 діб, незаморожених (після етапу дегідратації) – на 3-у добу культивування. Пагони розвивалися за типом прямого органогенезу, характерного для меристем, які кріоконсервують методом вітрифікації [10].

Як свідчать результати, представлені в табл. 1, дегідратація в PVS N зменшує життєздатність меристем озимого сорту до 71% та не змінює її у ярого (93%), кріоконсервування значущо знижує цей показник до 45% для сорту «Дюшес» та 56% для сорту «Мануйлівський». За швидкістю розвитку

for cryopreservation by means of vitrification both of cell suspensions and organs. However, the mechanisms of biological objects response to the effect of high concentrations of cryoprotectants characterized by various physico-chemical properties, in particular, different penetration ability and toxicity, have not been fully elucidated yet. To reduce probability of damaging the cells during incubation in vitrification solutions one use single- and multi-component media [5].

Since most cryoprotectants are xenobiotics, they can render cytotoxic influence on biological systems, and demonstrate various osmotic effects. Therefore, we have investigated the influence of plant vitrification solution on the recovery of garlic apical meristems after dehydration (without vitrification-warming stage).

Survival of meristems of both garlic varieties after dehydration in PVS N following 5 days of cultivation was of 80–90%. During further cultivation some meristems which were green coloured before had only primordial leaves alive, their apical dome was damaged and following cultivation did not result in development of the sprout. In other words, these meristems were non-viable. Thus, it was found that under these conditions of dehydration, the investigated by us solution had no pronounced toxic effect, therefore it can be used for cryopreservation of garlic meristems by vitrification.

An intensive formation of shoots from the meristems, stored in liquid nitrogen, started 7–10 days later, and in non-frozen ones (subjected only to dehydration stage) did to the 3rd day of cultivation. The shoots were developed by a direct organogenesis characteristic for the meristems, cryopreserved by vitrification method [4].

According to the results presented in Table 1 the dehydration in PVS N reduced the viability of meristems of winter cultivar down to 71% and did not change it in spring one (93%), the cryopreservation significantly reduced this index down to 45% for the cultivar 'Duchess' and to 56% for the 'Manuylivskyy' one. In terms of development rate of a shoot the meristems, recovered after cryopreservation and dehydration in cryoprotective solution, were far beyond the controls. In particular, to the 90th day of cultivation the shoot length of 'Duchess' winter variety was 135 mm in the control, 93 mm for dehydrated meristems and 81 mm in cryopreserved ones. There was significantly decreased the root length down to 45 mm in both dehydrated and cryopreserved meristems vs. 67 mm in the control, the number of leaves was unchanged.

Dehydration of the meristems of spring varieties in PVS N resulted in shortening of shoot length from 129 to 60 mm in the dehydrated apexes and 49 mm in cryopreserved ones, length of the root did not change significantly. Unlike winter varieties there was observed

пагона меристеми, які були відновлені після кріоконсервування та дегідратації кріозахисним розчином, значно відстають від контрольних. Так, на 90-у добу культивування довжина пагона озимого сорту «Дюшес» складала 135 мм в контрольних, у дегідратованих меристем – 93 мм, а у кріоконсервованих – 81 мм. Також значно зменшувалася довжина кореня до 45 мм як у дегідратованих, так і у кріоконсервованих меристем проти 67 мм у контрольних, кількість листків не змінювалася.

Дегідратація у PVS N меристем ярого сорту призвела до зменшення довжини пагона з 129 до 60 мм у дегідратованих апексів та 49 мм – у кріоконсервованих, довжина кореня вірогідно не змінювалася. На відміну від озимого сорту спостерігали значуще зменшення кількості листя у паростків, відновлених як із дегідратованих, так і з кріоконсервованих меристем.

Отримані результати свідчать про те, що на ріст та розвиток апікальних меристем негативно впливають не тільки наднизькі температури, а й обробка розчином кріопротекторів (рисунок).

Для органогенезу експлантів дуже важливо підібрати відповідний баланс фітогормонів. Індукція меристем до росту й утворення пагонів досягається додаванням до середовища цитокінінів (кінетину чи БАП у концентрації 10^{-5} – 10^{-7} М) або цитокінінів разом із ауксинами. Для утворення коренів до складу середовища вводять нафтилоцтову, ІОцК або індолілмасляну кислоти [5]. Відомо, що цитокініни при незбалансованому складі пригнічують ріст листків та можуть викликати морфологічні зміни [5].

Результати рекультивування кріоконсервованих меристем у трьох варіантах живильних середовищ (табл. 2) показали, що для оптимізації росту найкращим для обох сортів було живильне середовище з підвищеним вмістом кінетину та за відсутності аденіну.

Попередні дослідження показали, що для регенерації пагонів із апікальних меристем найкращим виявилось живильне середовище з додаванням

Таблиця 1. Вплив дегідратації в розчині, що вітрифікується (PVS N), та кріоконсервування на ріст апікальних меристем часнику через 90 днів культивування

Table 1. Effect of dehydration in plant vitrification solution (PVS N) and cryopreservation on growth of garlic apical meristems in 90 days of culturing

Експериментальна група Experimental group	Життєздатність, % Viability, %	Довжина пагону, мм Shoot length, mm	Довжина кореня, мм Root length, mm	Кількість листків, шт. Number of leaves, pieces
Озимий сорт «Дюшес» 'Duchess' winter cultivar				
Абсолютний контроль Absolute control	94,1 ± 6,6	135,3 ± 15,4	66,6 ± 10,5	3,7 ± 0,3
Меристеми, дегідратовані PVS N PVS N dehydrated meristems	71,4 ± 7,1 *	93,0 ± 10,3 *	45,0 ± 6,2 *	3,0 ± 0,5
Кріоконсервовані меристеми Cryopreserved meristems	44,8 ± 3,7 *	80,7 ± 12,3 *	45,0 ± 4,4 *	3,6 ± 0,1
Ярий сорт «Мануйлівський» 'Manuylivskyy' spring cultivar				
Абсолютний контроль Absolute control	94,1 ± 6,6	129,0 ± 10,9	25,0 ± 4,9	4,6 ± 0,5
Меристеми, дегідратовані PVS N PVS N dehydrated meristems	93,3 ± 11,9	60,3 ± 8,1 *	24,0 ± 5,2	3,3 ± 0,7 *
Кріоконсервовані меристеми Cryopreserved meristems	56,3 ± 11,2 *	49,2 ± 5,3 *	21,2 ± 4,3	3,0 ± 0,6 *

Примітка: * – статистично значуща різниця по відношенню до абсолютного контролю, $p \leq 0,05$.

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

a significant decrease in the number of leaves in the shoots recovered both from dehydrated and cryopreserved meristems.

The findings indicate that the growth and development of the apical meristems are negatively affected not only by ultra-low temperature, but also by the treatment with the solution of cryoprotectants (Figure).

Organogenesis of explants is very dependent on the appropriate balance of phytohormones. Induction of the meristems to growth and formation of shoots is achieved by adding to the medium of cytokinins (either kinetin or BAP in concentration of 10^{-5} – 10^{-7} М) or cytokinins together with auxins. Formation of roots is promoted by supplementing of naphthyl acetic acid, IAA or indoleacetic acid to the composition of media [2]. Unbalanced cytokinins composition is known to inhibit the growth of leaves and can cause morphological changes [2].

The results of re-culturing of cryopreserved meristems in three variants of nutritive media (Table 2) have shown that optimization of growth for both varie-

0,5 мг/л БАП та 0,1 мг/л ІОцК [2], тому ми використовували його для рекультивування меристем. Але при відновленні кріоконсервованих меристем цей фітогормон у застосованій концентрації мав меншу ефективність, ніж кінетин у тій самій концентрації. Після внесення у живильне середовище 0,5 мг/л кінетину значуще збільшувалися швидкість росту та кількість листків у меристем часнику сорту «Дюшес», відновлених після дегідратації в PVS N та кріоконсервування, також спостерігалася тенденція до підвищення цих показників для сорту «Мануйлівський». Можливо це пов'язано з дуже високою активністю БАП, тому що меристеми після обробки кріозахисним розчином та кріоконсервування потребують деякого часу на відновлення своїх функцій, оскільки, на відміну від контрольних, дегідратованих та заморожених меристем відстають у своєму розвитку на 7–10 діб.

У роботі Н.І. Ваєк і співавт. [8] встановлено, що при дегідратації в PVS 3 життєздатність кріоконсервованих меристем залежить від їх розміру, але швидкість розвитку паростків не досліджувалася. У експерименті ми визначали життєздатність та довжину пагонів паростків регенованих із різних за розмірами кріоконсервованих меристем часнику озимого сорту «Дюшес» при застосуванні PVS N.

Найбільша частина регенованих рослин після кріоконсервування отримана при використанні апікальних меристем розміром 2–3 мм, життєздатність складала 60–67%. З таких експлантів при подальшому культивуванні були сформовані рослини-регенеранти часнику довжиною 16,8–29,0 мм. З апікальних меристем розміром 4 мм одержали пробірковий матеріал, який мав найбільшу силу росту (40 мм), але досить невисокий показник життєздатності – до 20%. У випадку, коли кріоконсервували меристеми розміром 0,5 мм, регенеративний потенціал був повністю відсутній (табл. 3).

На наш погляд, більші за розміром меристеми мають більш гідратовані тканини, проникнення кріопротекторів в центр апексу та вихід води з нього

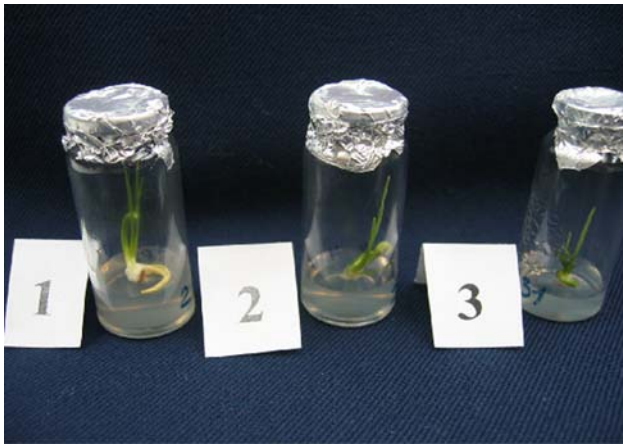
Таблиця 2. Вплив живильного середовища на ріст апікальних меристем часнику, відновлених після кріоконсервування (через 90 діб культивування)

Table 2. Effect of nutritive medium on growth of garlic apical meristems recovered after cryopreservation (in 90 days of culturing)

Середовище Medium	Довжина пагону, мм Shoot length, mm	Довжина кореня, мм Root length, mm	Кількість листків, шт. Number of leaves, pcs
Озимий сорт «Дюшес» 'Duchess' winter cultivar			
МС + 0,5 мг/л БАП + 0,1 мг/л ІОцК + аденіну 50 мг/л + 100 мг/л проліну L + 100 мг/л гідролізата казеїну MS + 0.5mg/l BAP + 0.1mg/l IAA + 50 mg/l adenine + 100 mg/l proline L + casein hydrolysate 100 mg/l	67,0 ± 7,5	38,0 ± 4,3	2,5 ± 0,2
МС + 0,1 мг/л кінетину + 0,1 мг/л ІОцК + 50 мг/л аденіну + 100 мг/л проліну L + 100 мг/л гідролізата казеїну MS + 0.1mg/l kinetin + 0.1mg/l IAA + 50 mg/l adenine + 100 mg/l proline L + casein hydrolysate 100 mg/l	78,5 ± 10,1	31,7 ± 5,4	4,0 ± 0,2
МС + 0,5 мг/л кінетину + 0,1 мг/л ІОцК + 100 мг/л проліну L + 100 мг/л гідролізата казеїну MS + 0.5mg/l kinetin + 0.1mg/l IAA + 100 mg/l proline L + 100 mg/l casein hydrolysate	80,7 ± 12,3	45,0 ± 4,4	3,6 ± 0,1
Ярий сорт «Мануйлівський» 'Manuylivskyy' spring cultivar			
МС + 0,5 мг/л БАП + 0,1 мг/л ІОцК + аденіну 50 мг/л + 100 мг/л проліну L + 100 мг/л гідролізата казеїну MS + 0.5mg/l BAP + 0.1mg/l IAA + 50 mg/l adenine + 100 mg/l proline L + casein hydrolysate 100 mg/l	40,5 ± 0,8	11,3 ± 0,7	3,0 ± 0,4
МС + 0,1 мг/л кінетину + 0,1 мг/л ІОцК + 50 мг/л аденіну + 100 мг/л проліну L + 100 мг/л гідролізата казеїну MS + 0.1mg/l kinetin + 0.1mg/l IAA + 50 mg/l adenine + 100 mg/l proline L + casein hydrolysate 100 mg/l	33,0 ± 3,7	13,2 ± 4,3	2,6 ± 0,3
МС + 0,5 мг/л кінетину + 0,1 мг/л ІОцК + 100 мг/л проліну L + 100 мг/л гідролізата казеїну MS + 0.5mg/l kinetin + 0.1mg/l IAA + 100 mg/l proline L + 100 mg/l casein hydrolysate	49,2 ± 5,3	21,2 ± 4,3	3,0 ± 0,6

ties was achieved mostly in nutrient media with an increased content of kinetin and no adenine.

Previous studies have demonstrated that the best regeneration of shoots from apical meristems was found in the nutrient medium with added 0.5 mg/l BAP and 0.1 mg/l IAA [6], so we tried to use it for recultivation of the meristems. But the outcomes of recovering of cryopreserved meristems showed that this phytohormone in the applied concentration was less effective than kinetin in the same concentration. After introduction of 0.5 mg/l kinetin into the culture medium the growth rate and the number of leaves were significantly increased in the meristems of 'Duchess' garlic varieties, recovered after dehydration in PVS N and cryopreservation, as well there was found a tendency to increase these parameters for 'Manuylivskyy'



Апікальні меристеми часнику після культивування на живильному середовищі протягом 60 діб: **1** – контроль; **2** – дегідратовані PVS N; **3** – криоконсервовані з PVS N.

Garlic apical meristems after culturing with nutritive medium for 60 days: **1** – absolute control; **2** – dehydrated in PVS N ; **3** – cryopreserved in PVS N.

під час обробки розчином, що вітрифікується, є повільнішими, ніж у менших за розміром меристем, тому вони погано насичувалися цим розчином і гинули при заморожуванні у рідкому азоті. Використання меристем розмірами менше 2 мм за нашими даними є найменш ефективним: через невеликі розміри матеріал зазнавав сильної цитотоксичності від криопротектора, через що спостерігалися знижені показники розвитку, а тканини мали склоподібний вигляд і відзначалися рядом морфологічних аномалій, таких як нерозвинені корені, листя.

Отже, для створення колекції сортів часнику у низькотемпературному банку необхідно виділяти

cultivar. This is likely due to the very high activity of BAP because the meristems after treatment with cryoprotective solution and cryopreservation require some time to recover their functions, the need of which is confirmed by 7–10 day-long delay in development observed in dehydrated or devitrified meristems if compared with control ones.

H.J. Baek *et al.* [1] reported that the viability of cryopreserved meristems after dehydration in PVS 3 depended on their size, but the development rate of sprouts has not been investigated by the authors. In our experiment we examined the viability and length of shoots of the sprouts regenerated from different by sizes cryopreserved meristems of ‘Duchess’ garlic winter varieties using PVS N.

The largest amount of regenerated plants following cryopreservation was obtained in case of using apical meristems of 2–3 mm, the viability was 60–67%. These explants formed the garlic regenerated plants of 16.8–29.0 mm length during further culturing. Apical meristems of 4 mm gave *in vitro* the samples with the highest growth force (40 mm), but quite low viability, up to 20%. In case if the cryopreserved meristems were of 0.5 mm, the regenerative potential was completely absent (Table 3).

We believe, that larger meristems have more hydrated tissues, the penetration of cryoprotectants into the centre of the apex and water release from it during treatment with plant vitrification solution are slower than in smaller meristems, and due to this they are poorly saturated with this solution and die during freezing in liquid nitrogen. As shown in our experiments the usage of meristems of less than 2 mm was the least effective: because of the small sizes the samples suffered from a severe cytotoxicity of cryoprotectant, evidently resulting in reduced developmental indices, the tissues appeared like glassy and had such morphological abnormalities as immature roots and leaves.

Thus, the future establishing of the garlic varieties collections at a low-temperature bank should be targeted to the use of only the 2–3 mm meristems, the

Таблиця 3. Вплив розміру апікальних меристем із зубків озимого часнику сорту «Дюшес» на життєздатність і силу росту після криоконсервування (через 50 діб культивування)

Table 3. Effect of apical mersitem size of ‘Duchess’ garlic clove winter cultivar on viability and growth force after cryopreservation (in 50 culturing days)

Розмір апікальних меристем, мм Size of apical meristems, mm	Частка життєздатних меристем, % Viable meristems, %	Довжина пагону, мм Shoot length, mm
0,5	–	–
1,0	31,6 ± 4,7	7,7 ± 1,9
1,5	44,4 ± 3,2	12,4 ± 3,5
2,0	59,2 ± 2,1	18,5 ± 2,0
2,5	67,0 ± 7,5	29,0 ± 4,2
3,0	66,7 ± 4,7	16,8 ± 2,7
3,5	25,0 ± 2,7	12,0 ± 3,8
4,0	20,0 ± 1,5	40,0 ± 5,4
HIP The least significant difference	6,3	9,1

лише меристеми розміром 2–3 мм, а у середовище культивування для деконсервованих апексів додати 0,5 мг/л кінетину, що дозволить одержати високий процент життєздатності з задовільним регенеративним потенціалом.

Висновки

Таким чином, у цьому експериментальному дослідженні показано, що розчин, який вітрифікується (1 М сахарози + 2 М гліцерину + 2,5 М етиленгліколю), за даних умов дегідратації є нетоксичним для меристем часнику та дозволяє отримувати високий рівень життєздатності. Так, після кріоконсервування методом вітрифікації меристем часнику ярого сорту «Мануйлівський» кількість регенерованих рослин сягала (56,3 ± 11,2)%, а озимого сорту «Дюшес» – (44,8 ± 3,7)%. Для культивування кріоконсервованих меристем часнику в якості фітогормону доцільно використовувати кінетин у концентрації 0,5 мг/л, це дозволяє одержати кращі морфометричні показники регенерованих рослин (довжина пагонів і кореня). Було показано, що після кріоконсервування методом вітрифікації найбільшу життєздатність мають меристеми часнику розміром 2–3 мм (60–70%). Більші за розміром меристеми (3,5–4 мм) мають високий регенеративний потенціал, але низьку життєздатність (менш ніж 25%). У менших за розміром меристем (1–1,5 мм) знижені показники життєздатності (30–47%) та регенеративний потенціал. У меристем розміром 0,5 мм за даних умов дослідження регенеративний потенціал відсутній.

Література

1. Івченко Т.В., Віценя Т.І., Шабетя О.М. Клонування рослин *Alliaceae* L., які розмножуються вегетативним способом, в культурі *in vitro* // Овочівництво і баштанництво. – 2007. – Вип. 53. – С. 103–109.
2. Івченко Т.В., Віценя Т.І. Удосконалення технології клонального мікророзмноження часнику в культурі *in vitro* // Насінництво: теорія і практика прогнозування продуктивності сортів і гібридів за якістю насіння та садивного матеріалу: наукові праці Південного філіалу Національного університету біоресурсів і природокористування України «Кримський агротехнічний університет». Сільськогосподарські науки. – Сімферополь, 2009. – Вип. 127. – С. 191–194.
3. Молканова О.И., Коротков О.И., Ветчинкина Е.М. и др. Генетические банки растений: проблемы формирования, сохранения и использования // Вестник Удмуртского университета. Биология. Наука о земле. – 2010. – Вып. 3. – С. 77–79.
4. Трускинов Э.В. Коллекции *in vitro* на современном этапе интродукции, использования и хранения мирового генофонда вегетативно размножаемых культур сельскохозайственных растений в XXI веке: труды II Вавиловской международной конференции. – СПб, 2007. – С. 207–209.

culture medium for devitrified apices should contain 0.5 mg/l kinetin, that would result finally in obtaining a high viability and a satisfactory regenerative potential.

Conclusions

Collectively, this experimental study has been shown that a plant vitrification solution (1M sucrose + 2 M glycerol + 2.5 M ethylene glycol), is non-toxic to garlic meristems under used dehydration conditions and enables the obtaining of a high viability. In particular, cryopreservation by means of vitrification of garlic meristems of 'Manuylivskyy' spring varieties the number of regenerated plants reached (56.3 ± 11.2)%, and for the 'Duchess' winter varieties it was (44.8 ± 3.7)%. It is expedient to use phytohormone kinetin of 0.5 mg/l concentration for culturing of cryopreserved garlic meristems, because this allows the obtaining of better morphometric parameters (length of shoots and roots) in regenerated plants. It has been shown that after cryopreservation by means of vitrification the highest viability was inherent to garlic meristems of 2–3 mm (60–70%). Larger meristems (3.5–4 mm) have a high regenerative potential but low vitality (less than 25%). In smaller meristems (1–1.5 mm) the viability rates and regenerative potential were reduced (30–47%). In meristems of 0.5 mm under these experimental conditions the regenerative potential is absent.

References

1. Baek H.J., Kim H.H., Cho E.G. et al. Importance of explant size and origin and of preconditioning treatments for cryopreservation of garlic shoot apices by vitrification. *CryoLetters* 2003; 24 (6): 381–388.
2. Churikova O.A. Investigation of regularities of shoot apical meristem functioning and features of morphogenetic processes in cultures of plants of different taxonomic groups. *Bulletin of Moscow University. Ser. Biology* 2005; (3): 52–64.
3. Descriptors for *Allium* spp. IPGPI ECP/GR, AVRDC; 2001: 1–42.
4. Engelmann F., Takagi H. Importance of cryopreservation for conservation of plant genetic resources. In: Engelmann F., Takagi H., editors. *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. Rome: JIRCAS, Tsukuba & IPGRI, 2000: 8–20.
5. Fahy G.M. Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology* 2010; 60 (3): 45–53.
6. Ivchenko T.V., Vitsenia T.I. Improving of garlic clonal micropropagation technology *in vitro*. Coll. sci. papers of the Southern Branch of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine 'Crimean Agrotechnical University'. *Agriculture Series 'Seed Breeding: Theory and practice of forecasting productivity of varieties and hybrids on quality of seeds and planting material'* 2009; (127): 191–194.
7. Ivchenko T.V., Vitsenia T.I., Shabetia O.M. Cloning of vegetatively reproducing *Alliaceae* L. plants in culture *in vitro*. *Ovochivnytstvo i Bashtannytstvo* 2007; (53): 103–109.
8. Keller E.R.J. Cryopreservation of *Allium sativum* L. (Garlic). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 2002; (50): 37–47.
9. Kim H.H., Cho E.G., Baek H.J. et al. Cryopreservation of garlic shoot tips by vitrification: effects of vitrification, rewarming,



5. Чурикова О.А. Изучение закономерностей функционирования верхушечной меристемы побега и особенностей морфогенетических процессов в культурах растений разных таксономических групп // Вестник Московского университета. Сер. Биология. – 2005. – №3. – С. 52–64.
6. Шевченко Н.А. Сохранность меристем винограда и картофеля при использовании режимов быстрого замораживания // Проблемы криобиологии. – 2004, №4. – С. 30–33.
7. Шевченко Н.А., Стрибуль Т.Ф., Розанов Л.Ф. Оптимизация метода витрификации меристем картофеля // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, №4. – С. 657–664.
8. Baek H.J., Kim H.H., Cho E.G. et al. Importance of explant size and origin and of preconditioning treatments for cryopreservation of garlic shoot apices by vitrification // *CryoLetters*. – 2003. – Vol. 24, №6. – P. 381–388.
9. Descriptors for *Allium* spp. IPGPI ECP/GR, AVRDC. 2001. – P. 1–42.
10. Engelmann F., Takagi H. Importance of cryopreservation for conservation of plant genetic resources. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application // JIRCAS, Tsukuba & IPGRI. – Rome, 2000. – P. 8–20.
11. Fahy G.M. Cryoprotectant toxicity neutralization // *Cryobiology*. – 2010. – Vol. 60, №3. – P. 45–53.
12. Keller E.R.J. Cryopreservation of *Allium sativum* L (Garlic) // *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. – 2002. – Vol. 50. – P. 37–47.
13. Kim H.H., Cho E.G., Baek H.J. et al. Cryopreservation of garlic shoot tips by vitrification: effects of vitrification, rewarming, unloading and regrowth conditions // *CryoLetters*. – 2004. – Vol. 25, №1. – P. 59–70.
14. Kovalchuk I., Zhumagulova Z., Turdiev T., Reed B.M. Growth medium alterations improve in vitro cold storage of pear germplasm // *CryoLetters*. – 2014. – Vol. 35, №3. – P. 197–203.
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid grown and bioassay with tobacco tissue culture // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
16. Sakai A. Development of cryopreservation techniques // Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. JIRCAS, Tsukuba & IPGRI. – Rome, 2000. – P. 1–7.
17. Shabetia V.V., Shabetia O.M., Vitsenia T.I., Tymchuk V.M. Allium collection of the gene pool of Ukraine // *Vegetable Crops Research Bulletin*. – 2006. – Vol. 64. – P. 195–200.
18. Takagi H. Recent development in cryopreservation of shoots apices of tropical species // Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application / Eds. F. Engelmann, H. Takagi. – Rome: JIRCAS, Tsukuba & IPGRI, 2000. – P. 178–193.
19. Turner S.R., Touchell D.H., Senaratna T. et al. Effects of plant growth regulators on survival and recovery growth following cryopreservation // *CryoLetters*. – 2001. – Vol. 22, №3. – P. 163–174.
20. Wang Q., Li P., Batuman O. et al. Effect of benzyladenine on recovery of cryopreserved shoot tips of grapevine and citrus cultured in vitro // *CryoLetters*. – 2003. – Vol. 24, №5. – P. 293–302.
- unloading and regrowth conditions. *CryoLetters* 2004; 25 (1): P. 59–70.
10. Kovalchuk I., Zhumagulova Z., Turdiev T., Reed B.M. Growth medium alterations improve in vitro cold storage of pear germplasm. *CryoLetters* 2014; 35 (3): 197–203.
11. Molkanova O.I., Korotkov O.I., Vetchinkina E.M. et al. Genetic banks of plants: problems of formation, preservation and use. *Bulletin of Udmurt University. Biology. Earth Science* 2010; (3): 77–79.
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid grown and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 1962; (15): 473–497.
13. Sakai A. Development of cryopreservation techniques. In: Engelmann F., Takagi H., editors. *Cryopreservation of tropical plant germ-plasm. Current research progress and application*. Rome: JIRCAS, Tsukuba & IPGRI 2000; p. 1–7.
14. Shabetia V.V., Shabetia O.M., Vitsenia T.I., Tymchuk V.M. Allium collection of the gene pool of Ukraine. *Vegetable Crops Research Bulletin* 2006; 64: 195–200.
15. Shevchenko N.A. Integrity of grape and potato meristems using rapid freezing regimens. *Problems of Cryobiology* 2004; (4): 30–33.
16. Stribul T.F., Shevchenko N.A., Rozanov L.F. Optimizing method for potato meristem vitrification. *Problems of Cryobiology* 2005; 15 (4): 657–664.
17. Takagi H. Recent development in cryopreservation of shoots apices of tropical species. In: Engelmann F., Takagi H., editors. *Cryopreservation of tropical plant germ-plasm. Current research progress and application*. Rome, JIRCAS, Tsukuba & IPGRI 2000; p. 178–193.
18. Truskinov E.V. In vitro collections at current stage of introduction, use and storage of world gene pool of vegetatively propagating agricultural crops: *Proceedings of the 2nd International Vavilov's Conference 'Genetic resources of cultivated plants in the XXI Century'*. St. Petersburg 2007; p. 207–209.
19. Turner S.R., Touchell D.H., Senaratna T. et al. Effects of plant growth regulators on survival and recovery growth following cryopreservation. *CryoLetters* 2001; 22 (3): 163–174.
20. Wang Q., Li P., Batuman O. et al. Effect of benzyladenine on recovery of cryopreserved shoot tips of grapevine and citrus cultured in vitro. *CryoLetters* 2003; 24 (5): 293–302.

