

Національна академія наук України
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Присталов Антон Ігорович

УДК 581.82:57.043:547.42

ДИСЕРТАЦІЯ

**Вплив складу кріозахисного середовища та методів охолодження на
життєздатність гермплазми винограду.**

03.00.19 – кріобіологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ А.І. Присталов

Науковий керівник: Кулешова Лариса Георгіївна, доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник

Харків – 2021

АНОТАЦІЯ

Присталов А.І. Вплив складу кріозахисного середовища та методів охолодження на життєздатність гермплазми винограду. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2021.

Дисертаційна робота присвячена розробці ефективних методів збереження генофонду винограду у польових, гіпотермічних та низькотемпературних умовах.

Потужний техногенний вплив цивілізації на навколишнє середовище призводить до загрози виснаження біологічних ресурсів та ризику втрати генетичних ресурсів деяких видів рослин. Генетичні ресурси винограду традиційно зберігаються *ex situ*, як цілі рослини у польових колекціях. Для запобігання втрати унікальних генотипів винограду внаслідок дії несприятливих екологічних, кліматичних, техногенних або антропогенних чинників необхідно дублювати *in vivo* колекції у довгострокових банках. Саме тому за вимогами Комісії з генетичних ресурсів для продовольства та сільського господарства при Організації Об'єднаних Націй (ФАО) кожна польова колекція повинна дублюватися низькотемпературною колекцією, у якій генетичний матеріал зберігається за температур рідкого азоту. Складнощі при розробці протоколів довгострокового збереження винограду пов'язані з високою специфічністю певних сортів та необхідністю індивідуального підбору умов і середовищ. При гіпотермічному зберіганні живців винограду є небезпека зараження здорового матеріалу від інфікованих живців вірусами або бактеріями в період замочування прищепних і підщепних частин лоз.

У роботі по створенню 2 ампелографічних колекцій проведена інтродукція 65 південних сортів на дослідній ділянці Біологічної станції ХНУ

ім. В.Н. Каразіна та 75 сортів винограду на території ІПКіК НАН України, наданих Національним інститутом винограда і вина «Магарач» (НІВіВ «Магарач»), Національним науковим центром «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» (ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова») та провідними українськими селекціонерами. Створені ампелографічні колекції містять новітні високо гетерозиготні гібриди, отримані за допомогою методів складної гібридизації, та сорти, які мають різну високопродуктивність, морозостійкість, комплексостійкість до різних хвороб і шкідників, промислову цінність та різні терміни визрівання. Колекції в умовах дослідних ділянок дають можливість одержувати та контролювати власний дослідний матеріал упродовж всього вегетаційного періоду.

Запропоновано і апробовано спосіб насичення рослинних об'єктів трубчасто-капілярної структури методом вакуум-інфільтрації і доведена його висока ефективність. При визначенні оптимальних параметрів тиску, необхідного для насичення живців винограду з відкритими зрізами, показано, що насичення живців живильними середовищами та кріопротекторами методом вакуум-інфільтрації є безпечним і ефективним при використанні тиску близько 70 кПа. Виявлено, що метод вакуум-інфільтрації дозволяє прискорити насичення прищепної частини винограду живильними та кріозахисними середовищами більш ніж в 10 разів, отже дозволяє виключити стадію вимочування живців і знизити можливість перенесення вірусних інфекцій від хворих живців до здорових. Встановлена залежність між зниженням вологості та життєздатністю живців винограду при гіпотермічному зберіганні. Межа зневоднення, при якій життєздатність вірогідно не змінювалась, склала 40 %. Використання методу вакуум-інфільтрації дозволило відновлювати початкову вологість живців та суттєво збільшити термін гіпотермічного зберігання.

Довготривале зберігання генетичних ресурсів винограду можливо в умовах кріобанку. Одним з етапів підготовки гермплазми рослин до заморожування є прекультивування на поживних середовищах з

осмотичними речовинами, як правило, сахарозою. У дисертаційній роботі при дослідженні дії сахарози на життєздатність живців в умовах дегідратації визначено кількісні значення оптимальних концентрацій сахарози (0,1 – 0,7 М) для насичення бруньок винограду методом вакуум-інфільтрації. Виявлено, що зі зростанням концентрації розчинів сахарози після насичення бруньок винограду і часу експозиції, час пробудження бруньок збільшувався до 5 разів у порівнянні з контрольною групою. Можливо вплив сахарози виявляється у подовженні стану спокою досліджуваних зразків. Це допущення було нами враховано у подальших дослідженнях з кріоконсервування.

Ефективних методів кріоконсервування живців або бруньок винограду на даний час не існує. Якісне їх насичення кріозахисними середовищами ускладнене великою кількістю різноманітних каналів та порожнин з повітрям у бруньках винограду. Традиційні способи насичення, які базуються на поступовому дифузійному розподілі рідини по тканинах експланта, мають низьку ефективність, оскільки зі збільшенням розміру рослинних об'єктів потрібно збільшувати час їх інкубації у кріозахисному розчині, а тривалий контакт з концентрованими кріозахисними розчинами може приводити до загибелі поверхневого шару клітин бруньок, в той час як їх внутрішні шари залишаються ненасиченими через значний об'єм та гетерогенність бруньок. У роботі доведено можливість ефективного насичення ізольованих бруньок винограду методом вакуум-інфільтрації без втрати їх життєздатності. Визначено, що для якісного насичення бруньок винограду різними розчинами PVS (plant vitrification solution) з метою подальшого кріоконсервування важливим етапом є попередня дегазація бруньок і кріозахисного середовища при тиску 20 кПа, а на етапі насичення необхідно застосовувати тиск 40 кПа протягом 15–20 хв із поступовим його підвищенням (протягом 2–2,5 хв) до атмосферного.

Розчини PVS мають високу склоутворюючу здатність. Однак відсутність кристалізації на етапі охолодження не виключає її розвитку при

нагріванні вище температури склування. Розвитком кристалізації після розсклування, її температурою і інтенсивністю теплового ефекту характеризують стабільність аморфного стану кріозахисних розчинів. Було досліджено низькотемпературні фазові переходи і склування низки розчинів PVS та проаналізовано стабільність аморфного стану, який ними утворений. Виявлено, що ніяких екзо- або ендотермічних піків на етапі нагріву після швидкого охолодження PVS1, PVS2 і PVS3 не реєструється, що вказує на високу стабільність аморфного стану даних кріозахисних розчинів. Для розчинів PVS4 та PVS_N зареєстровано піки кристалізації і плавлення, однак їх площа достовірно не відрізняється, що вказує про розвиток кристалізації тільки на етапі нагріву. Розчини PVS2 і PVS3 мають високу склоутворюючу здатність навіть у 80 % концентрації, що робить їх перспективними при кріоконсервуванні рослинних об'єктів.

В дисертаційній роботі досліджено фазовий стан при низьких температурах в бруньках винограду, які було насичено кріозахисними середовищами групи PVS різними методами. Найбільш високі показники проникнення кріозахисних речовин усередину бруньок отримано при насиченні PVS2 за умови використання методу вакуум-інфільтрації. Встановлено, що при використанні методу вакуум-інфільтрації (15 хв інкубації) стрибок теплоємності при склуванні в два рази більше у порівнянні з пасивним вимочуванням (60 хв інкубації), що свідчить про значуще більшу кількість склоподібної фази. Температура плавлення при використанні методу вакуум-інфільтрації на 4 градуси нижче, а ентальпія плавлення зв'язаної води вище в 2,9 разів у порівнянні з традиційним методом пасивного насичення. Значуще нижчою при цьому є ентальпія плавлення льоду.

Порівняння впливу методу насичення на життєздатність бруньок винограду при низькотемпературному впливі виявило, що пасивне вимочування не забезпечує збереженості бруньок винограду при кріоконсервуванні, тоді як застосування методу VIV (vacuum infiltration

vittrification) було більш ефективним. Показано, що після кріоконсервування виноградних бруньок під захистом PVS2 збереженість для сортів Руський Конкорд, РР 101/14 та Загадка складала 60–80 % після застосування методу VIV, і 0 % – при насиченні пасивним вимочуванням. Життєздатність деконсервованих бруньок протягом 4 тижнів культивування становила 30 % для сорту Руський Конкорд, 40 % для Загадки, 0 % для РР 101/14. Кореляції між морозостійкістю та кріорезистентністю різних сортів винограду при використанні методу VIV виявлено не було. Великий відсоток життєздатності деконсервованих бруньок сорту Загадка може бути видовою ознакою та обумовлений особливостями деревини, яка має більш пористу структуру на відміну від сортів Руський Конкорд і РР 101/14. Важливим є також розташування бруньок на живцях. Так, морозовитривалий сорт РР 101/14 має маленький розмір бруньок, які утоплені у структуру деревини, тому насичення їх розчином PVS ускладнено. Бруньки на живцях у сорту Загадка більші за розміром, ніж бруньки сорту Руський Конкорд та сильніше відокремлені від деревини. Саме ці показники, імовірно, і впливають на ефективність насичення методом VIV, а отже і на результати кріоконсервування.

Ключові слова: кріоконсервування, бруньки та живці винограду, вакуум-інфільтрація, кріопротектори, низькотемпературні фазові переходи, збереженість бруньок.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Статті у фахових журналах України

1. **Присталов А. І.**, Кулешова Л. Г., Боброва О. М., Зеленьянська Н. М. Ефективність метода вакуум-інфільтрації для насичення різними розчинами рослинних об'єктів трубчасто-капілярної структури. Вісник проблем біології і медицини. 2020. Т. 4. № 158. С. 65-69. (*Google Scholar, Index Copernicus, Crossref*) DOI: 10.29254/2077-4214-2020-4-158-65-69
2. **Присталов А. И.**, Бондарь И. Н., Полулях А. А., Лиховской В. В. Виноградарство Слобожанщины: история, проблемы, перспективы создания и сохранения коллекций. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія : Біологія. 2014. Вип. 20. № 1100. С. 53–60. (*Google Scholar, WorldCat, Crossref, Web of Science*)

Статті в наукових журналах інших країн

3. Vozovyk K., Bobrova O., **Prystalov A.**, Shevchenko N., Kuleshova L. Amorphous state stability of plant vitrification solutions. *Biologija*. 2020. Vol. 66. № 1. P. 47-53.

Статті в збірках матеріалів конференцій

4. **Присталов А. І.**, Кулешова Л. Г. Розробка примусового насичення живців винограду різними середовищами методом вакуум-інфільтрації. International research and practice conference “Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences” : матеріали конференції. 27-28 December 2017, Lublin, 2017. P. 278–282.
5. **Присталов А. И.**, Кулешова Л. Г., Боброва Е. Н. Насыщение изолированных почек винограда витрифицирующимся раствором методом вакуум-инfiltrации. Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології : матеріали V Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених, 7–8 листопад 2018, Вінниця, 2018. С. 159-161.
6. **Присталов А. И.**, Кулешова Л. Г., Боброва Е. Н. Стабильность аморфного состояния витрифицирующихся сред для криоконсервирования растительных объектов. Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології :

матеріали V Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених, 7–8 листопад 2018, Вінниця, 2018. С. 161-163.

Тези конференцій

7. Лысак Ю. С., **Присталов А. И.**, Стрибуль Т. Ф., Ходько А. Т. Низкотемпературное консервирование меристем винограда. Виноградарство и виноделие. 2011. Т. 61. № 2. С. 5–6.
8. **Prystalov A.**, Bobrova O., Govorova Yu., Rozanov L. Perspectives of vacuum infiltration vitrification (VIV)-cryopreservation in dormant grape buds biobanking. Europe biobanking week 2019, biobanking for a healthier world. 8–11 October 2019, Lubeck, German, 2019. P. 26–27.
9. Стрибуль Т. Ф., Шевченко Н. А., **Присталов А. И.**, Лысак Ю. С. Методы получения сверхбыстрых скоростей охлаждения биологических объектов. Криоконсервация, как способ сохранения биологического разнообразия. Биофизика живой клетки: зб. матеріалів доп. учасн. 28–30 октября 2008, Пущино. 2008. С. 126.
10. Стрибуль Т. Ф., Лысак Ю. С., **Присталов А. И.**, Коваленко И. Ф. Исследование динамики насыщения меристем винограда криозащитными средами. Криоконсервация, как способ сохранения биологического разнообразия. Биофизика живой клетки: зб. матеріалів доп. учасн. 28–30 октября 2008, Пущино. 2008. С. 125.
11. Чернобай Н. А., Шевченко Н. О., **Присталов А. И.**, Каднікова Н. Г. Кріоконсервування генетичних ресурсів рослин в Україні. Біологія рослин та біотехнологія : збірник матеріалів доповідей учасників третьої конференції молодих вчених. 16–18 травень 2017, Київ, 2017. С. 19.
12. **Присталов А. И.** Вплив рівня вологості гермиплазми винограду на її життєздатність після різних способів і термінів гіпотермічного зберігання. Проблеми кріобіології та кріомедицини. 2017. Т. 27. № 2. С. 181.
13. **Присталов А. И.**, Кулешова Л. Г. Альтернативные способы обработки виноградников. Галузеві проблеми екологічної безпеки: збірник матеріалів IV Міжнародної науково-практичної конференції студентів, магістрантів та аспірантів, 19 жовтня 2018, Харків, 2018. С. 151.

14. **Приста́лов А. І.**, Боброва О. М., Кулешова Л. Г. Comparative evaluation of the saturation efficiency of isolated grape buds with cryoprotectants. 13 IMBG all- Ukrainian conference of young scientists. 22-25 May 2019, Kyiv, 2019. P. 24–25.
15. Vozovyk K., Bobrova O., Shevchenko N., **Prystalov A.** Stability of amorphous state of plant vitrification solutions. Smart Bio: Abstract book: International Conference. 2-4 May 2019, Kaunas, 2019. P. 212.
16. **Prystalov A.**, Bobrova O., Kuleshova L. Cryopreservation of grape buds. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2020. Vol. 30. № 3. P. 292.

Патенти України на корисну модель

17. Шевченко Н. О., **Приста́лов А. І.**, Стрибуль Т. Ф., винахідники. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб отримання високих швидкостей охолодження біологічних об'єктів: пат. 38896 Україна. № 200810002; заявл. 01.08.2008; опубл. 26.01.2009, Бюл. № 2.
18. Шевченко Н. О., **Приста́лов А. І.**, Стрибуль Т. Ф., винахідники. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб отримання високих швидкостей охолодження біологічних об'єктів: пат. 38895 Україна. № 200810001; заявл. 01.08.2008; опубл. 26.01.2009, Бюл. № 2.
19. Шевченко Н. О., **Приста́лов А. І.**, Стрибуль Т. Ф., винахідники. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Лабораторний пристрій для вакуум-інфільтрації живців плодово-ягідних культур: пат. 85644 Україна. № 201307024; заявл. 04.06.2013; опубл. 25.11.2013, Бюл. № 22.
20. **Приста́лов А. І.**, Кулешова Л. Г., Розанов Л. Ф., винахідники. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Пристрій для вакуум-інфільтрації живців плодово-ягідних культур: пат. 121556 Україна. № 201705937; заявл. 14.06.2017; опубл. 11.12.2017, Бюл. № 23.

21. **Приста́лов А. І.**, Шевченко Н. О., Зеленьянська Н. М., Кулешова Л. Г., винахідники. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб відмивання живців плодово-ягідних культур від кріозахисних середовищ: пат. 136543 Україна. № 201901934; заявл. 26.02.2019; опубл. 27.08.2019, Бюл. №16.

ANNOTATION

Pristalov A.I. Influence of cryoprotective medium composition and cooling methods on grape germplasm viability. – The qualifying scientific paper as a manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Science (Philosophy Doctor) in specialty of 03.00.19 – cryobiology. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2021.

The dissertation is devoted to the development of effective methods of preserving the gene pool of grapes under field, hypothermic and low temperature conditions.

The strong man-made impact of civilization on the environment leads to the threat of depletion of biological resources and the risk of loss of genetic resources of some plant species. The genetic resources of grapes are traditionally preserved ex situ as whole plants in field collections. In order to prevent the loss of unique grape genotypes due to adverse environmental, climatic, man-made or anthropogenic factors, it is necessary to duplicate in vivo collections in long-term banks. That is why, according to the United Nations Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture (FAO), each field collection should be duplicated by a low-temperature collection in which the genetic material is stored at liquid nitrogen temperatures. Difficulties in developing protocols for long-term storage of grapes are associated with the high specificity of certain varieties and the need for individual selection of conditions and environments. Hypothermic storage of grape cuttings involves the risk of infection of healthy material from

infected cuttings with viruses or bacteria during soaking of grafted rootstock and scion parts of vines.

Two ampelographic collections were created by introduction of 65 southern varieties on the research site of the Biological Station of V. N. Karazin Kharkiv National University and 75 grape varieties on the territory of IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine. The grape varieties were provided by National scientific research institute of vineyards and wine Maharach, National Research Centre “V. E. Tairov Institute of vineyards and wine” and leading Ukrainian breeders. The created ampelographic collections contain the latest highly heterozygous hybrids obtained by complex hybridization methods and include varieties with different levels of productivity, frost resistance, complex resistance to various diseases and pests, industrial value and different maturation dates. Collections under conditions of research sites give an opportunity to receive and control their own research material throughout the vegetative period.

The method of saturation of plant objects with tubular-capillary structure by vacuum infiltration was proposed and tested in the work and its high efficiency was proved. Determining the optimal pressure parameters required for saturation of grape cuttings with open sections, it was shown that the saturation of cuttings with nutrient media and cryoprotectants by vacuum infiltration was safe and effective when a pressure of about 70 kPa was used. It was found that the method of vacuum infiltration can accelerate the saturation of the grafted part of the grape with nutrient and cryoprotective media by more than 10 times, eliminating the stage of cuttings soaking and reducing transmission of viral infections from diseased cuttings to healthy ones. The correlation between the decrease in humidity and the viability of grape cuttings during hypothermic storage was demonstrated. The limit of dehydration, at which viability did not reliably change, was 40%. The application of the vacuum infiltration method allowed restoring the initial hydration of the cuttings and significantly extending the duration of hypothermic storage.

Long-term storage of genetic resources of grapes is possible in a cryobank. One of the preparation stages of plant germplasm for freezing is pre-culturing on nutrient media containing osmotics, usually sucrose. In the present dissertation, the effect of sucrose on the viability of cuttings in dehydration conditions was studied. Quantitative values of optimal concentrations of sucrose (0.1–0.7 M) for saturation of dormant grape buds by vacuum infiltration were determined. It was found that with increasing concentration of the sucrose solutions after saturation of grape buds and exposure time, the awakening time of the buds increased up to 5 times compared with the control group. We suggest sucrose to increase the duration of dormancy of the studied species. This assumption was taken under consideration while further cryopreservation experiments.

Currently, there are no effective methods for cryopreservation of grape cuttings or buds. Their effective saturation with cryoprotective media is complicated by a large number of different channels and cavities with air in the buds of grapes. Traditional methods of saturation, based on the gradual diffusion distribution of fluid in the tissues of the explant, have low efficiency. This is due to the need to extend incubation time in cryoprotective solution for larger plant objects. A prolonged contact with concentrated cryoprotective solutions may in turn lead to the death of cells on the surface of buds, while their inner layers remains unsaturated due to the significant volume and heterogeneity of the buds. The research proves the possibility of effective saturation of isolated grape buds by vacuum infiltration without losing their viability. It is established that effective saturation of grape buds with various PVSs (plant vitrification solutions) for further cryopreservation requires a preliminary step, involving degassing of buds and cryoprotective medium at a pressure of 20 kPa. Optimal saturation was achieved under the pressure of 40 kPa for 15–20 min with subsequent gradual increase (within 2–2.5 min) to atmospheric pressure.

PVSs have a high glass-forming ability. However, the absence of crystallization at the cooling stage does not exclude its development during warming above the glass transition temperature. The development of

crystallization after glass transition, crystallization temperature and the intensity of the thermal effect characterize the stability of the amorphous state of cryoprotective solutions. The low-temperature phase transitions and glass transition of various PVSs were investigated and the stability of the amorphous state formed by them was analyzed. No exothermic or endothermic peaks in the heating stage after rapid cooling of PVS1, PVS2 and PVS3 were registered. It indicates the high stability of the amorphous state of the cryoprotective solutions. Crystallization and melting peaks were registered for PVS4 and PVS_N solutions. Since the areas under the peaks did not differ significantly, the development of crystallization is assumed to occur only at the heating stage. PVS2 and PVS3 solutions have a high glass-forming ability even at 80% concentration, which makes them promising in cryopreservation of plant objects.

The phase states of grape buds saturated with different PVSs using different methods were investigated at low temperatures. The highest penetration rates of the cryoprotectant into the buds were obtained when saturated with PVS2 using the vacuum infiltration method.

It was demonstrated that when using the vacuum infiltration method (15 min incubation), the jump in heat capacity during glazing is twice as large as when using passive saturation (soaking) method (60 min incubation), indicating a significantly larger number of vitreous phase. The melting point for the vacuum infiltration method is 4 degrees lower and the enthalpy of melting of bound water is 2.9 times higher than for the traditional passive saturation method. The enthalpy of melting ice was significantly lower for the vacuum infiltration method.

Comparing the effect of the saturation method on viability of grape buds under low temperature exposure, it was found that passive saturation soaking does not ensure the preservation of grape buds under cryopreservation, while the use of the method VIV (vacuum infiltration vitrification) was more effective. Preservation of grape buds (varieties Russkiy Konkord, RR 101/14 and Zagadka) during cryopreservation under the protection of PVS2 was 60–80 % and 0 % for VIV method and passive saturation, correspondingly. Viability of deconserved

buds during 4-week cultivation was 30 % for the variety Russkiy Konkord, 40 % for Zagadka and 0 % for RR 101/14. No correlation was found between frost resistance and cryoresistance of different grape varieties using the VIV method. The higher viability for deconserved Zagadka buds can be species-specific, due to the peculiarities of stem, which has a more porous structure in contrast to the varieties Russkiy Konkord and RR 101/14. The location of the buds on the cuttings is also important. Thus, the frost-resistant variety RR 101/14 has a small size of buds, which are sunk into the wood structure, so their saturation with PVS solution is difficult. Buds on cuttings in the variety Zagadka are larger than the buds of the Russkiy Konkord and are more separated from the wood. Just these features are thought to affect the efficiency of saturation by VIV, and hence the results of cryopreservation.

Keywords: cryopreservation, buds and cuttings of grapes, vacuum infiltration, cryoprotectants, low-temperature phase transitions, preservation of buds.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	18
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	26
1.1 Збереження генофонду рослин.....	26
1.1.1 Генетичні банки рослин.....	26
1.1.2 Біологічні особливості винограду та збереження його генофонду	28
1.2 Гіпотермічне зберігання генетичних ресурсів винограду.....	33
1.3 Кріозберігання генетичних ресурсів рослин.....	35
1.3.1 Методи кріоконсервування рослин.....	35
1.3.2 Кріоконсервування гермплазми винограду.....	40
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	45
2.1. Матеріали досліджень.....	45
2.2 Методи досліджень.....	49
2.2.1 Метод насичення живців винограду різними середовищами із застосуванням вакуумної інфільтрації	49
2.2.2 Оптимізація методу вакуум-інфільтрації живців винограду різними середовищами.....	50
2.2.3 Визначення ефективності методів насичення живців винограду різними середовищами.....	52
2.2.4 Вивчення кінетики насичення живців винограду розчинами різної в'язкості методом вакуумної інфільтрації.....	53
2.2.5 Вивчення життєздатності бруньок у складі живця винограду з різним рівнем фізіологічної вологості.....	54
2.2.6 Вивчення впливу зниження рівня вологості гермплазми винограду на її життєздатність після різних способів і термінів гіпотермічного зберігання.....	55

2.2.7 Вивчення впливу розчинів сахарози різної концентрації на життєздатність і терміни проростання бруньок винограду.....	56
2.2.8 Оцінка життєздатності та термінів пророщування живців винограду в залежності від рівня вологості і насичення розчинами сахарози різної концентрації методом вакуум-інфільтрації.....	56
2.2.9 Метод низькотемпературної диференційної скануючої калориметрії.....	57
2.2.10 Методи насичення ізольованих бруньок винограду вітрифікуючими розчинами PVS.....	57
2.2.11 Метод відмивання живців винограду від кріозахисних середовищ.....	59
2.2.12 Метод попередньої підготовки бруньок винограду перед кріоконсервуванням	60
2.2.13 Метод охолодження та відігрівання бруньок винограду.....	60
2.2.14 Методи контролю температури зразків при здійсненні охолодження–відігрівання.....	61
2.2.15 Статистична обробка експериментальних результатів.....	62
РОЗДІЛ 3. СТВОРЕННЯ АМПЕЛОГРАФІЧНИХ КОЛЕКЦІЙ В УМОВАХ ДОСЛІДНИХ ДІЛЯНОК.....	63
РОЗДІЛ 4. ВИЗНАЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ МЕТОДІВ НАСИЧЕННЯ ЖИВЦІВ ВИНОГРАДУ.....	72
4.1 Створення ефективного способу активного насичення рослинних об'єктів трубчасто-капілярної структури різними середовищами на прикладі живців винограду.....	72
4.2 Вплив різного рівня фізіологічної вологості гермплазми винограду на її життєздатність.....	78
4.3 Вплив різних способів і термінів зберігання живців винограду на зміну рівня їх фізіологічної вологості і життєздатності.....	81
РОЗДІЛ 5. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ САХАРОЗИ НА ГЕРМПЛАЗМУ ВИНОГРАДУ В УМОВАХ ДЕГІДРАТАЦІЇ.....	87

5.1 Вплив розчинів сахарози на життєздатність живців винограду насичених методом вакуум-інфільтрації	87
5.2 Визначення захисної дії сахарози на живці винограду в умовах дегідратації.....	89
РОЗДІЛ 6. КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ІЗОЛЬОВАНИХ СПЛЯЧИХ БРУНЬОК ВИНОГРАДУ	94
6.1 Насичення бруньок винограду методом вакуум-інфільтрації.....	94
6.2 Низькотемпературні фазові переходи і склування у розчинах PVS.....	101
6.3 Порівняльний аналіз ефективності методу VIV та пасивного насичення ізольованих бруньок винограду розчинами PVS методом ДСК.....	108
6.4 Кріоконсервування бруньок винограду.....	114
АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	120
ВИСНОВКИ.....	125
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	127
ДОДАТОК А. СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА. АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ.....	146
ДОДАТОК Б. ДО РОЗДІЛУ 3.....	150
ДОДАТОК В. ПЕРЕЛІК СОРТІВ У АМПЕЛОГРАФІЧНІЙ КОЛЕКЦІЇ ПРИ БІОЛОГІЧНІЙ СТАНЦІЇ ХНУ ІМ В.Н. КАРАЗІНА.....	159
ДОДАТОК Г. ПЕРЕЛІК СОРТІВ У АМПЕЛОГРАФІЧНІЙ КОЛЕКЦІЇ ПРИ ІПК І К НАН УКРАЇНИ	161
ДОДАТОК Д. ДОГОВОРИ О НАУКОВОМ СПІВРОБІТНИЦТВІ. АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ.....	164

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ДСК – диференційна скануюча калориметрія

1,2-ПД – 1,2-пропандіол

ДМСО – диметилсульфоксид

ЕГ – етиленгліколь

МС – живильне середовище Мурасіге – Скуга

PVS – розчини для вітрифікації рослин

VIV – vacuum infiltration vitrification

РР – Ріпарія X Рупестріс

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. У зв'язку з постійним скороченням світових генетичних ресурсів проблема збереження генофонду культурних і дикорослих видів рослин є дуже актуальною [89, 97, 103, 112]. Особливу важливість набувають питання збереження популяцій диких видів рослин, визнаних світовим джерелом стійкого генофонду для селекції плодових культур, а також унікальних плодово-ягідних сортів, виведених в нашій країні та за її межами [126, 137, 156, 160, 180]. Більшість рослин може зберігатися в генетичних банках у вигляді насіння за температур до -20°C , які забезпечують достатньо високу життєздатність зразків протягом десятиліть [154, 180]. Гостро стоїть проблема збереження генофонду культурних рослин, які розмножуються вегетативно, оскільки у них за насіннєвого розмноження не зберігається генотип материнської рослини [35, 150]. Класичний метод збереження і оновлення генофонду цінних сортів винограду здійснюється шляхом створення і підтримки дуплетних колекційних насаджень. Однак створення і підтримання колекцій економічно невигідно через велику вартість посадкового матеріалу і роботи з догляду за дорослими рослинами [57]. Крім того, немає гарантії збереження унікальних генотипів внаслідок дії несприятливих екологічних, кліматичних, техногенних та антропогенних чинників [45, 112]. Тому оптимальне рішення цієї проблеми полягає в організації тривалого зберігання зникаючих видів і зразків в контрольованих умовах низьких і наднизьких температур, а також створення в культурі *in vitro* оздоровлених колекцій рослин [34, 45, 70, 81, 82]. Перспективним сучасним способом збереження плодово-ягідних культур є кріоконсервування частин рослин (пагони, бруньки, меристеми, пилки і насіння) в рідкому азоті або його парах. На сьогоднішній день кріоконсервування є основним способом збереження рослинного генетичного матеріалу [43, 156]. Для винограду існують методи кріоконсервування пилку, ембріональних клітин і меристем [17, 18, 32, 53, 61, 75, 109, 110]. Однак для

регенерації меристем у посадковий матеріал необхідно тривалий час, що включає в себе зростання в стерильних умовах, акліматизацію до умов парника [33]. Крім того, мають місце складнощі з процедурами культивування меристем. Все це вимагає створення спеціальної лабораторної бази, що тягне за собою значні фінансові витрати [20]. Останнім часом особлива увага приділяється кріозбереженню бруньок і живців різних видів цінних рослин, які знаходяться у стані спокою [93, 126, 136]. Даних щодо успішного кріоконсервування прищепних частин винограду (бруньки, живці) на даний момент немає.

Складнощі кріозбереження гермплазми винограду пов'язані з особливостями будови його клітин, що відрізняються великими розмірами, сильною вакуолізацією і, отже, великим вмістом води, а також рівнем критичної дегідратації, зниження нижче якої веде до незворотньої втрати життєздатності [63, 148]. 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 [43, 54, 87]. 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) [87]. Невеликі рослинні експланти досить легко вітрифікуються з використанням підсушування і PVS [82]. Однак зі збільшенням розмірів експлантів спостерігається неоднорідність насичення їх тканин, що вимагає більшого часу експозиції у PVS [54]. Тривалий контакт із концентрованими кріозахисними розчинами може призводити до загибелі поверхневого шару клітин, у той самий час як внутрішні шари тканин експлантів залишаються ненасиченими. Складнощі проникнення кріопротекторів групи PVS у міжклітинний простір і клітини рослинних тканин пов'язані також із високою в'язкістю кріозахисних

розчинів [74]. Неоднорідність морфології, фізіології та клітинної хімії тканин бруньок може поставити під загрозу ефективність кріопротекції та кріоконсервування [84]. Успіх кріозахисту залежить від часу і температури експозиції, шляху дифузії, ступеня проникності та хімічної токсичності кріопротекторів, достатньої дегідратації рослинних тканин [54]. Прискорення насичення рослинних експлантів продемонстровано на прикладі ембріонів та меристем з використанням вакууму [27, 65]. Актуальною задачею є розроблення методу вакуум-інфільтрації для насичення великих та гетерогенних рослинних об'єктів, якими є бруньки та живці винограду.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконана в рамках відомчих НДР лабораторії фітокріобіології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (ІПКіК НАН України) № 2.2.6.106 «Розробка теоретично – обґрунтованих підходів до кріоконсервування рослинних об'єктів різного рівня організації» (№ державної реєстрації 0116U003496). Де автор самостійно виконував окремі розділи як відповідальний виконавець. Отримані результати були включені до звіту відділу.

Мета і завдання дослідження.

Мета роботи – створити ефективні методи насичення живців та ізольованих бруньок винограду кріозахисними і живильними середовищами для підвищення їх збереженості при низькотемпературному або гіпотермічному зберіганні.

Для досягнення поставленої мети передбачалося вирішити наступні **завдання:**

1. Створити ампелографічну колекцію в умовах дослідної ділянки.
2. Визначити оптимальні методи і терміни зберігання живців винограду в гіпотермічних умовах.
3. Розробити ефективні способи насичення і відмивання живців і бруньок винограду живильними та кріозахисними середовищами.

4. Вивчити вплив різних способів дегідратації гермплазми винограду на її життєздатність з різним рівнем фізіологічної вологості.

5. Дослідити низькотемпературні фазові переходи і склування у бруньках винограду та в кріозахисних середовищах групи PVS.

6. Оцінити збереженість бруньок винограду після кріоконсервування з застосуванням розроблених методичних підходів щодо насичення їх кріопротекторами та відмивання.

Об'єкт дослідження – життєздатність ізолюваних та у складі живців бруньок винограду.

Предмет дослідження – реакція ізолюваних та у складі живців бруньок винограду на дію кріозахисних середовищ, гіпотермію та охолодження.

Методи дослідження. В роботі використані сучасні кріобіологічні, біофізичні та біологічні методи: вакуум-інфільтрація, кріоконсервування бруньок винограду, низькотемпературна диференціальна скануюча калориметрія, термічний аналіз, колориметричний тест, культивування живців і бруньок винограду, світлова мікроскопія, конфокальна мікроскопія, статистичний аналіз.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційній роботі вперше на території Слобожанщини створено дві ампелографічні колекції державної власності при ІПКіК НАН України та вперше розроблені нові способи насичення живців та ізолюваних бруньок винограду кріозахисними і живильними середовищами, що є надзвичайно важливим для ефективного польового, низькотемпературного і гіпотермічного зберігання генетичних ресурсів винограду. Вперше розроблено спосіб насичення рослинних об'єктів трубчасто-капілярної структури методом вакуум-інфільтрації і доведена його ефективність. Визначено оптимальні параметри тиску необхідного для насичення живців винограду з відкритими зрізами. Вперше встановлено, що метод вакуум-інфільтрації дозволяє прискорити насичення прищепної частини винограду стимулюючими середовищами більш ніж у 10 разів, отже

дозволяє виключити стадію вимочування живців і знизити можливість перенесення вірусних інфекцій.

Вперше проаналізовано вплив вакуум-інфільтрації для відновлення початкової вологості в живцях винограду в умовах холодильної камери на зміну їх рівня вологості і життєздатності при тривалому гіпотермічному зберіганні. Визначено кількісні значення оптимальних концентрацій сахарози для насичення сплячих бруньок винограду методом вакуум-інфільтрації та досліджено життєздатність бруньок і терміни їх пророщування залежно від ступеня вологості та часу насичення.

Вперше досліджено фазовий стан в інтервалі температур від -196°C до температури повного плавлення у бруньках винограду, які були насичені кріозахисними середовищами групи PVS різними методами. Доведено можливість ефективного насичення ізольованих бруньок винограду методом вакуум-інфільтрації без втрати їх життєздатності та визначено умови якісного насичування бруньок розчинами PVS для подальшого кріоконсервування методом вітрифікації.

Практичне значення отриманих результатів. Результати роботи дозволяють поглибити уявлення про кріорезистентність бруньок винограду у стані спокою та розширюють можливості тривалого збереження життєздатності гермплазми винограду, забезпечення її генетичної стабільності, запобігання ризику ураження різними інфекціями і загибелі в результаті несприятливих чинників у лабораторних та польових умовах. Подальше використання отриманих у роботі даних можливо в області біотехнологій виноградарства та для поповнення асортименту банків рослин, оскільки робота з живцями і бруньками не вимагає стерильності і після деконсервування такий матеріал можна легко використовувати в дослідних умовах за допомогою щеплень і окуліровок. Розроблено спосіб для вакуум-інфільтрації живців плодово-ягідних культур, який полягає в застосуванні зниженого тиску для проходження рідини вздовж живців, що насичуються (патент України №85644). Удосконалення способу для насичення живців

(патент України №121556) дозволяє водночас насичувати живильним або кріозахисним середовищем необхідну кількість живців. Розроблено спосіб відмивання живців від кріозахисних середовищ (патент України №136543) із застосуванням підвищеного тиску, який може бути використано як у лабораторних, так і у польових умовах. На підставі отриманих результатів може бути розроблена науково-обґрунтована стратегія для подальшої оптимізації способів кріоконсервування бруньок винограду. Одержані в роботі дані про фазовий стан розчинів PVS можуть бути використані під час розробки методичних підходів кріоконсервування інших видів рослин.

Результати роботи можуть бути рекомендовані для використання в навчальному процесі в навчальних закладах для підготовки спеціалістів у різних галузях біології, зокрема кріобіології, та сільськогосподарських наук.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійним і оригінальним науковим дослідженням здобувача. Основні результати роботи одержані здобувачем особисто. Автором разом із науковим керівником проведено патентно-інформаційне дослідження наукової проблеми, визначено тему, мету та завдання роботи. Здобувачем отримані експериментальні дані у всіх розділах досліджень, результати яких представлено в роботі. Статистична обробка, аналіз, інтерпретація та узагальнення одержаних результатів, формулювання основних положень і висновків проведено автором самостійно. В опублікованих із співавторами роботах особистий внесок здобувача полягає в плануванні та проведенні експерименту, обговоренні отриманих результатів та підготовці матеріалів до публікації.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи були представлені на XIX міжнародній конференції «Консервация генетических ресурсов» (Росія, Пушино, 2008); на міжнародній науково-практичній конференції «Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences» (Польща, Люблин, 2017); на 41, 44-й конференціях молодих вчених ІПКіК НАН України спільно з кафедрою

UNESCO «Холод в біології і медицині» (Україна, Харків, 2017, 2020); на IV міжнародній науково-практичній конференції студентів, магістрантів та аспірантів «Галузеві проблеми екологічної безпеки» (Україна, Харків, 2018); на V міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології» (Україна, Вінниця, 2018); на 13-й всеукраїнській конференції молодих вчених (Україна, Київ, 2019); на міжнародній конференції «Смарт Біо» (Литва, Каунас, 2019); на міжнародній конференції «Europe biobanking week» (Німеччина, Любек, 2019).

Публікація матеріалів. Основні положення дисертації викладені у 21 науковій роботі, з них 2 статті у фахових виданнях України та 1 у закордонному спеціалізованому науковому виданні, 3 статті у збірниках матеріалів конференцій (загалом 2 наукові статті мають ідентифікатор DOI), 5 патентів України на корисну модель. Опубліковано 10 тез доповідей на міжнародних і вітчизняних конференціях.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 164 сторінках друкованого тексту, з яких 124 сторінки основного змісту. Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», 4-х розділів з результатами власних досліджень, узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел літератури, а також 5-ти додатків. До списку літератури входять 185 джерел. Робота ілюстрована 37 рисунками і 14 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Збереження генофонду рослин

1.1.1 Генетичні банки рослин

На даний час збереження генофонду рослин – одне з найважливіших завдань, якому приділяють велику увагу в усьому світі [89, 97, 103, 112]. Це пов'язано з обмеженістю необхідних для існування людини біологічних ресурсів і загрозою їх виснаження, що викликано потужним техногенним впливом цивілізації на навколишнє середовище, від якого страждають рослини [112]. Багато видів рослин ще недостатньо добре вивчені, проте всі вони є генетичними ресурсами, які людина може використовувати [180]. Тому зникнення будь-якого з них – непоправна втрата. Дуже актуальною проблемою є збереження генофонду, як культурних, так і дикорослих видів рослин, що представляють собою цінний селекційний матеріал [126, 137, 156, 160, 180]. Існуючі традиційні підходи збереження генофонду базуються, по-перше, на створенні різноманітних колекцій, а також банків насіння (зберігання *ex situ*), по-друге, на організації заповідників і заказників (*in situ*) [154, 158]. Генетичні ресурси рослин, які зберігаються в колекціях генбанків, прийнято поділяти на три типи: базові, активні і дублетні. Базові колекції зберігають в умовах, що забезпечують їх тривале зберігання (long-term conservation), але доступ до них гранично обмежений. Активні колекції служать для відновлення, розмноження, розсилання і вивчення зразків. Вони зберігаються в умовах, що забезпечують середньострокове зберігання (medium-term conservation). Дублетні колекції зберігають окремо від базової колекції з метою збільшення надійності зберігання [61, 180]. Стосовно до колекцій вегетативно розмножуваних культурних рослин в базові колекції включаються усі зразки, які зберігаються у польових умовах [158] і зразки, що закладені на зберігання при температурі -196 °C при наявності методів

надійного кріозбереження [34, 45, 70, 81, 82]. Колекції *in vitro* створюються як частина активної і дублетної колекцій [34, 113]. Склад і розмір *in vitro* колекцій визначається структурою генофонду кожної культури, вимог міжнародного обміну, необхідністю оздоровлення, розмноження і дублювання найбільш цінних екземплярів польової колекції [86, 92, 180]. Колекції *in vitro* забезпечують збереження оздоровлених від патогенів зразків рослин, що вегетативно розмножуються у контрольованих умовах середовища [34, 73, 113]. У великих світових генбанках присутні усі три системи збереження генетичного матеріалу культурних рослин, що розмножуються вегетативно (польові, *in vitro* і кріоколекції), оскільки кожна з перерахованих вище систем збереження має свої переваги і недоліки [16, 21, 57, 180].

Генофонд плодових культур помірного клімату представлений переважно польовими колекціями і зосереджений в генбанках і науково-дослідних центрах [57, 73, 105]. Згідно з Першою доповіддю про стан світових генетичних ресурсів рослин для виробництва продовольства і ведення сільського господарства, на той час в польових генбанках підтримувалося близько 527000 зразків [24]. При достатньому фінансуванні збереження генетичних ресурсів у польових колекціях можна легко здійснити, що дозволяє проводити спостереження і отримувати детальну оцінку їх стану [44, 48]. Однак збереження польових колекцій має великі недоліки, які обмежують його ефективність і загрожують збереженню генетичних ресурсів рослин [20, 21]. Польові колекції більшою мірою схильні до пошкодження стихійними лихами, нападу шкідників і дії патогенів, і, крім того, мають місце дуже високі витрати на робочу силу і потребу в технічному персоналі. Крім того, розподіл і обмін з польовими генбанками ускладнений через вегетативну природу матеріалу і великий ризик передачі хвороб з країни в країну [90, 106]. Найбільш трудомісткими і дорогими в обслуговуванні є кріоколекції і колекції *in vitro*. Вони нечисленні

у порівнянні з польовими колекціями і підтримуються не в усіх підрозділах, які займаються збереженням генофонду культур [9, 21, 180].

Генетичні ресурси є основою біобізнесу, який розвивається прискореними темпами і набуває глобальних масштабів. В даний час кріобанки гермплазми економічно важливих рослин створені у Великобританії, Канаді, Франції, Німеччині, Італії, Нідерландах, Японії, Китаї, Норвегії та ін. [21, 77, 180]. Для глибокого заморожування видів, які мають вегетативне розмноження, до яких відносяться плодові та ягідні культури, найчастіше використовуються апікальні меристеми, виділені з асептичних рослин [43, 54, 127]. Бруньки та живці плодово-ягідних культур, яким наразі приділяється особлива увага, рідше використовують для низькотемпературного зберігання у зв'язку з тим, що недостатньо розроблені способи їхнього депонування. Для кріозбереження використовують бруньки та живці, які знаходяться у стані спокою [124, 125, 126]. Шляхом щеплення деконсервованій матеріал дозволяє за дуже короткий час реанімувати генотип [88, 126].

1.1.2 Біологічні особливості винограду та збереження його генофонду

Культитивування винограду має археологічний літопис, який налічує понад 7,5 тисяч років [58]. Виноград відносять до роду *Vitis*, сімейства *Vitaceae*. Рід *Vitis* представлений 78 видами та поділяється на два підріди: *Euvitis* і *Muscadinia*. У підрід *Euvitis* входить 75 видів, які з урахуванням їх походження та поширення, а також за сукупністю ботанічних і морфолого-анатомічних ознак та властивостей поділяються на 3 групи: європейсько-азійську, північно – американську та східно – азійську [41]. Рід *Vitis* має велике агрономічне значення. Він складається з понад 60 межплоїдних видів, які існують майже виключно в Північній півкулі. Серед них *Vitis vinifera* - єдиний вид, який широко використовується у світовій виноробній промисловості. Сорти зазвичай класифікуються відповідно за їх кінцевою

продукцією: виноматеріали, столовий виноград та ізюм [96]. Виноград (*Vitis vinifera* L.) є багаторічною алогамною полікарпічною полігетерозіготною рослиною, яка відноситься до субтропічних культур та має вегетативне розмноження [40]. Виноград як багаторічна рослина щорічно проходить малий річний цикл розвитку, що складається з періоду спокою і періоду вегетації [52, 120, 135]. Період спокою починається після листопаду і закінчується навесні з кліматичним потеплінням, тому на його розвиток істотно впливають кліматичні умови регіону [60, 132, 143, 176, 179]. У період зимового спокою фізіологічні процеси в клітинах загасають і протікають дуже повільно [118, 152]. Бруньки у стані спокою не проростають навіть за сприятливих температурних умов. Цей стан називається фізіологічним спокоєм. З другої половини січня рослина переходить у стан вимушеного спокою. У цьому стані, при сприятливих температурних умовах, можливо швидке пробудження життєдіяльності [128, 142]. Цей період використовується для зимових щеплень і прискореного вирощування кореневласних і щеплених саджанців винограду [133, 140]. Для зимового вирощування виноградних саджанців застосовують живці визрівшої однорічної лози. Для розмноження з маточних кущів відбираються живці з найбільш типовими сортовими ознаками. Найбільш придатні для живцювання пагони на лозі попереднього року з центральних бруньок [52, 121, 129]. Чубуки, або живці – це частини визрівшого пагона. Живці можуть бути будь-якого розміру, навіть одноглазкові. Раціональними, зручними для вкорінення можна вважати 2- і 3-глазкові живці. Найбільш життєздатними є живці, заготовлені восени після завершення вегетації [63, 172]. Для живців відбирають визрівші пагони з діаметром 7–10 мм. Більш тонкі черешки вкорінюються гірше. Але деякі сорти у нормі мають тонкі лози. У таких сортів і живці більш тонкі [141, 171].

Генетичні ресурси винограду традиційно зберігаються *ex situ* як цілі рослини у польових колекціях. Кількість різних сортів, що зберігаються в

генетичних колекціях по всьому світу, оцінюється ~ 10000 зразків. На даний час на основі генетичного аналізу ДНК було ідентифіковано понад 5000 сортів. Майже кожна країна виноградарства має власну колекцію гермплазми винограду, завдяки карантинним обмеженням і необхідності підтримувати матеріал у польових умовах у вигляді живих рослин [49, 96]. Найбільша ампелографічна колекція знаходиться у Франції в місті Вассале, яка налічує 3200 сортів, що представлені у вигляді 7200 клонів. Польові ампелографічні генбанки представлені переважно активними та базовими колекціями [42, 117]. Дійсно важливо підтримувати польову колекцію з метою оцінки, визначення характеристик, ідентифікації та поширення. Польові колекції можуть бути краще для генотипів, які при статевому розмноженні дають розщеплення генів, оскільки їх легше ідентифікувати, ніж *in vitro*. Вважається, що польовий генбанк є найкращим методом збереження в умовах *ex situ* для видів, що розмножуються вегетативно, в тому числі і винограду [21].

За останні 40 років площа насаджень винограду в Україні (без урахування даних тимчасово окупованого АР Крим) скоротилася у 5 разів і зараз складає 48,7 тис. га, зокрема в сільськогосподарських підприємствах – 35,7 тис. га. Урожайність винограду в Україні, незважаючи на окремі сприятливі періоди, в цілому залишається низькою. Валові збори винограду також мають тенденцію до зниження. За останні 40 років обсяг виробництва винограду в Україні скоротився в два рази. Основними причинами дестабілізації виноградарства і виноробства в країні є: закладання виноградників без урахування екологічних чинників; нераціональний сортовий склад насаджень; низька якість посадкового матеріалу винограду; низький рівень агротехнічного стану виноградників; загальна криза економіки України [122].

Маточники підщепних лоз в Україні представлені 9 сортами, а саме: Ріпарія * Рупестріс 101-14 (325 га), Берландієрі * Ріпарія Кобера 5 ББ (160 га), Берландієрі * Ріпарія СО4 (28 га), Берландієрі * Ріпарія Кречунел 2 (0,8

га), Берландієрі * Ріпарія Телекі 5Ц (1,7 га), Феркал (2,1 га), Ріхтер 110 (3,3 га), Паулза 1103 (1,2 га), Ріпарія Глуар (5,8 га). Сорт підщепу 101-14, який займає 61 % від площі маточників, є найбільш поширеним в Одеській області (253,8 га або 85,2 %). У Херсонській області цей сорт займає 63,2 %, АР Крим – 22 %, в Закарпатті – 22,9 %. Друге місце за площею займає сорт Кобера 5ББ – 160,7 га, що становить 30,1 %. З них основна частина (71,5 %) знаходиться в АР Крим, 24,3 % – в Одеській області, 4,4 % – в Білозерському районі Херсонської області та 1 % – в Закарпатській області. Сорт СО4-займає 5,2 % площ маточників, з яких 42,7 % зосереджено в Херсонській області, 39,4 % – в АР Крим і 17,9 % – в Одеській області. Решта 6 підщепних сортів вирощуються на невеликих площах в АР Крим і Закарпатті.

Основний асортимент маточників прищепної лози складається з 17 столових і 30 технічних сортів. Із столових сортів найбільш оброблювані це: Аркадія – 16,6 %, Молдова – 16,2 %, Мускат янтарний – 9,4 %, Ранній Магарач – 7,9 %, Королева виноградарів – 7,2 %. Серед технічних сортів найбільш поширеними є: Мерло – 12 %, Каберне Совіньон – 10,6 %, Сухолиманський білий – 6,9 %, Рислінг – 6,8 %, Біанка – 6,6 %, Шардоне – 6,6 %, Мускат Одеський – 6,3 % [137].

Для поліпшення асортименту і якості посадкового матеріалу необхідно закладати апробовані маточники, які забезпечать виробництво саджанців районованих і нових перспективних сортів винограду в кожній конкретній зоні.

В Україні, на даний час, основними напрямками розвитку сучасного виноградарства є збереження, оновлення і вдосконалення асортименту для підвищення його продуктивності, якості та комплексної стійкості до несприятливих умов середовища (низькі температури, посуха), хвороб (мілдь, сіра гниль, оїдіум) і шкідників (перш за все, філоксера) [161]. Отримання принципово нових сортів, стійких до вищевказаних чинників, впровадження їх у виробництво дозволяє відмовитися від прищепленої і укритої культури винограду, а також виключає з прийомів догляду за

рослинами обробку пестицидами, що різко скорочує витрати на вирощування і сприяє екологічній безпеці. Поряд з цим нові сорти повинні відрізнятися високою продуктивністю і якістю, а також володіти відповідним рівнем біопластичності. Саме тому перед впровадженням у виробництво ці сорти досліджують в умовах дослідних виноградників. Важлива роль у виноградарстві належить виробництву садивного матеріалу, розробці та вдосконаленню технологій вирощування щеплених і кореневласних саджанців, а також прискореним способам вирощування районованих саджанців цінних, інтродукованих та нових перспективних сортів винограду, в першу чергу, ультраранніх і ранніх груп, цінних для якісного північного виноградарства та виноробства України [137, 161].

Останнім часом зусилля дослідників також спрямовані на розробку ефективних протоколів довгострокового збереження винограду *in vitro*, як більш безпечної і більш рентабельної альтернативи колекціям у польових умовах [84, 98]. Необхідною умовою для розробки таких підходів є розробка ефективних протоколів регенерації винограду *in vitro*. Однак такі протоколи зазвичай мають високу специфічність і повинні бути скориговані з урахуванням певних сортів [1, 59]. Деякі автори вказують, що оптимальний склад культурального середовища для винограду залежить від видів і сортів. Тому результати, що отримані з одним генотипом на даному середовищі, можуть відрізнятися від результатів, що отримані з іншими генотипами [11]. Іншими можливими обмеженнями цих методів є численні маніпуляції, які можуть викликати соматональні варіації [2]. Крім того, процедура відновлення повноцінних рослин з меристем досить тривала і вимагає матеріально-технічної бази та кваліфікованого персоналу [39, 54, 86].

1.2 Гіпотермічне зберігання генетичних ресурсів винограду

Одним з найважливіших завдань у виноградарстві є створення ефективних способів зберігання живців винограду в контрольованих умовах [134, 146, 151]. Відомі різні способи зберігання виноградної лози: в земляних

траншеях, льохах, тирсі, піску, під плівкою, в холодильних камерах. Однак у кожного з цих способів є свої недоліки, що веде до втрати життєздатного матеріалу через можливі температурні стрибки, зміну вологості, збільшення інтенсивності дихання, яке може призводити до втрат вуглеводного компонента і, як наслідок, зниження енергії проростання аж до загибелі бруньок [146, 151]. При зберіганні живців запіскованими у підвальних приміщеннях потрібні додаткові затрати праці, що пов'язано з необхідністю швидкого вилучення і відмивання їх від піску перед подальшими маніпуляціями; пильно слідкувати за якістю прищепних ножів і секаторів, швидке затуплення яких призводить до зниження якості щеплень і зрізів [150].

Для успішного зберігання виноградної лози необхідно контролювати температуру, підтримувати необхідний рівень вологості камери і збережених об'єктів, ефективно знезаражувати лозу перед закладкою на зберігання і мати можливість моніторити її стан на предмет можливих цвілевих і грибкових заражень [157]. Експериментально встановлено, що найбільш якісним способом збереження виноградної лози є гіпотермічне зберігання в умовах холодильника при $+4-0^{\circ}\text{C}$. Недоліком даної технології зберігання є швидке зневоднення живців [143, 150]. Традиційно, нарізку живців проводять взимку і зберігають їх до посадки, що призводить до різкого зниження вологості живців і надалі, як наслідок, зниженню виходу життєздатних саджанців [150]. У зрізаних пагонів внаслідок капілярної провідності судин неминуча втрата вологи. Це веде до небезпечного підсихання тканини живця спочатку з поверхні зрізів, а потім всього пагону. За даними літератури відзначається, що навіть незначна втрата води клітинами викликає посилення дихання та більш високі втрати пластичних речовин [157]. Навіть у стані глибокого спокою клітини винограду мають досить високий рівень вологості. Це пов'язано з високими водоутримуючими силами клітин, а також з високим рівнем критичної вологості, що варіює від сорту до сорту. Встановлено, що втрата живцями однієї третини своєї води призводить до зниження

приживлюваності до 50 %. Таким чином, життєздатність лози значною мірою визначається станом водного режиму в ній [143, 148].

Одним із прийомів збереження фізіологічної вологості живців є їх парафінування [119, 149]. До парафіну пред'являються певні вимоги, особливо для зберігання живців і обробки щеплень. Як показали дослідження, додавання воску до парафіну в різних кількостях дозволяє змінити температуру краплепадіння, перетворити крупнокристалічну структуру парафіну на дрібнокристалічну, поліпшити еластичність, водозатримуючу здатність, адгезію і довговічність плівки [150]. Автори використовували суміші: парафін 92 %, поліізобутилен 5 %, каніфоль 3 %; парафін 80 %, віск неокиснений 10 %, віск окиснений 10 %; парафін 96 %, віск неокиснений 2 %, віск окиснений 2 %; парафін 70 %, віск неокиснений 15 %, віск окиснений 15 %. Якість розроблених сумішей визначали за станом водного режиму тканин чубуків і щеп винограду, збереженістю вічок, вмістом вуглеводів та вологи у чубуках, приживлюваністю щеп у шкільці, виходом стандартних саджанців із шкільки. Встановлено, що для зберігання чубуків винограду в осінньо-зимовий період найбільш ефективною була суміш, яка складалась із 80 % парафіну, 10 % окисненого воску та 10 % неокисненого воску [150]. Однак, при тривалому зберіганні живців під плівкою може утворюватися конденсат на її поверхні, що може ініціювати поширення грибкових захворювань. Оброблення живців парафіном не тільки може бути засобом, що оберігає укорочені живці від швидкої втрати вологи, а й засобом боротьби з поширенням хвороб в період зберігання [2, 31].

Виходячи з вищевикладеного, при зберіганні та заготівлі матеріалу необхідно підтримувати і, якщо потрібно, швидко підвищувати необхідний рівень вологості в досліджуваних об'єктах, що в практиці виноградарства реалізується методом вимочування, який дозволяє стимулювати живці та підняти вологість до потрібного рівня [159]. Оскільки пасивне насичення відбувається повільно, цей процес може тривати кілька діб в залежності від початкової вологості і анатомічних характеристик живців [148]. При

тривалому вимочуванні живців зростає ймовірність впливу токсичності розчинів, збільшується ризик гіпоксії бруньок, вимивання вуглеводного компонента і, як наслідок, відбувається зменшення активності їх проростання аж до загибелі [74, 155].

Крім того ряд авторів вважають, що в період замочування прищепних і підщепних лоз може відбуватися вимивання вірусів і бактерій з хворих живців і проникнення їх в тканини раніше здорового матеріалу [69, 123].

Таким чином, розробка способів збереження фізіологічної вологості живців, захист копуляційних зрізів від проникнення в них інфекції є одним з важливих засобів в отриманні оздоровлених саджанців.

1.3 Кріозберігання генетичних ресурсів рослин

1.3.1 Методи кріоконсервування рослин

Кріозбереження – це метод заморожування і зберігання рослинного матеріалу при наднизьких температурах (-196°C), що є основою єдиної можливості необмежено довгого зберігання генофонду рослин [51, 182]. Метод дозволяє зберегти без змін клітини і протопласти різних видів рослин, меристеми, зіготи́чні і соматичні зародки, пилок та насіння. До основних наукових проблем кріобанкінгу відносяться розробка методів заморожування і відновлення життєздатних зразків після кріозбереження, створення критеріїв для матеріалів, призначених до кріозбереження, і реінтродукції збережених видів [175]. Найпростішим способом є тривале зберігання генетичної колекції рослин у вигляді насіння, так як вміст води в насінні відносно малий і при закладці їх на низькотемпературне і кріогенне зберігання не має потреби у дорогому устаткуванні і спеціальній підготовці: зневоднення, обробка кріопротекторами та ін. [154]. При цьому найдешевшим і надійним є зберігання насіння в шахтах у вічній мерзлоті, яка забезпечує перевагу в строках зберігання у порівнянні з температурою $+4^{\circ}\text{C}$, обмежуючи діяльність мікроорганізмів і старіння насіння. Успіх кріогенного зберігання насіння визначається, в першу чергу, вологістю

насіння, швидкістю його охолодження і відігрівання і особливостями морфо-анатомічної будови [153]. Для кріозбереження найчастіше використовують апікальні меристеми, ізольовані з рослин, що культивуються в умовах *in vitro* [56]. Застосування апікальних меристем забезпечує регенерацію цілих рослинних організмів, які є в генетичному відношенні точними копіями вихідних рослин. Крім того, культуру ізольованих апікальних меристем застосовують для оздоровлення від вірусів [10]. Проведено оцінку генетичної стабільності ряду рослин, що були регенеровані із кріозбережених меристем, на фенотипічному, цитологічному і молекулярному рівні. Ніяких генетичних змін у рослин, що були регенеровані із кріоконсервованих меристем, не було виявлено, що може бути використано для тривалого зберігання [38]. Виживання апікальних меристем після кріоконсервування залежить від застосовуваних методик, а також видових і сортових відмінностей. На даний час не існує єдиної методики кріоконсервації. Для кожного виду і навіть типу клітин необхідні свої режими охолодження-відігріву, а також певне кріозахисне середовище [82].

Для кріоконсервування рослинних експлантів з успіхом використовується метод повільного програмного заморожування, при якому рослинні тканини, які були оброблені кріопротекторами, охолоджують зі швидкістю від 0,1 до 1 °C / хв до -40 °C за допомогою програмного заморожувача, а потім занурюють у рідкий азот [10]. Цим методом охолоджують як меристемальні тканини, так і клітинні культури. Ембріогенні тканини дикої вишні (*Prunus avium* L.) були успішно кріоконсервовані за допомогою процедури одноступеневого охолодження [30].

При застосуванні методу інкапсуляції-дегідратації, меристеми укладають у альгінатний гель, потім проводять їх часткове зневоднення у високомолярному розчині сахарози, а потім – у потоці стерильного повітря до певного вмісту вологи (приблизно 20 %) [15]. Інкапсульовані меристеми укладають у кріопробірки і занурюють у рідкий азот.

Важливим етапом кріозбереження є попередня обробка рослинних тканин. Для підвищення ефективності кріозберігання і підготовки клітин рослин до впливу наднизької температури в якості першої стадії попередньої обробки використовують холодову акліматизацію. Для попередньої акліматизації гермплазми *in vitro* використовують постійну низьку позитивну температуру, або температуру, що змінюється протягом доби [13, 51, 80].

Наступним етапом підготовки меристем до охолодження є культивування на поживних середовищах з осмотичними речовинами, як правило, сахарозою. Можливо, на цьому етапі відбувається накопичення цукрів, які збільшують стабілізацію мембран в умовах сильної дегідратації [13]. Доведено, що культивування клітин на середовищі з високим осмотичним потенціалом покращує їх виживання [14]. Також для обробки рослинних тканин використовують диметилсульфоксид (ДМСО), який збільшує діаметр пор у клітині і покращує дифузію необхідних речовин. Він застосовується як для попереднього культивування, так і під час кріозбереження [82].

Останнім часом часто застосовується кріоконсервування на основі методу вітрифікації [43]. При цьому способі рослинний матеріал обробляють висококонцентрованими розчинами кріопротекторів і зразки відразу занурюють у рідкий азот. В результаті вітрифікації вода в клітинах твердне в аморфному стані, тим самим запобігає утворенню внутрішньоклітинних кристалів льоду і пошкодженню клітинних мембран. Метод вітрифікації був успішно застосований до 5 сортів яблуні і 8 сортів груші [66]. Методом одноетапної вітрифікації були кріозбережені меристеми білої тополі [50]. Методи вітрифікації і інкапсуляції-дегідратації отримали для цілого ряду культур найбільше поширення, як найбільш доступні. Також застосовуються гібридні методи, що включають етапи вітрифікації і інкапсуляції-дегідратації [82].

Важливою умовою для успішного кріоконсервування бруньок та живців у стані спокою є їх рівень адаптації к холоду, який вони можуть

досягти, і ступінь акліматизації у час збору. Живці, які були зібрані у стані спокою, можуть витримувати низькі температури, якщо їх повільно охолоджувати до занурення у рідкий азот [88].

Види яблунь з високою морозовитривалістю показали високий відсоток проростання бруньок після кріоконсервування, а менш витривалі види мали менший відсоток проростання [99]. Увесь матеріал був отриманий з однієї місцевості, а отже, був схильним до схожих умов холодової адаптації. Тому бруньки, які були зібрані у більш холодному стані, при мінусових температурах, показують краще виживання після кріоконсервування, що підтверджує уявлення про важливість рівня холодової адаптації. Крім того, давно відомо, що акліматизація в умовах *in vitro* покращує відсоток виживання меристем після кріоконсервування [13]. *In situ* рівень холодової адаптації рослин може значно змінюватися з року в рік залежно від культурних та екологічних умов, таких як температура, світло, живлення та епідеміологічний фон у даній місцевості [72].

Ще одним фактором, важливим для підвищення рівня життєздатності бруньок для деяких видів рослин, є рівень зневоднення, що був отриманий до охолодження. Автори роботи [25] показали, що у яблуні високий рівень життєздатності може бути досягнутий з пагонів, в яких вміст вологи знижували з 45 % при зборі, до 25–30 % перед охолодженням. Бруньки, виділені з цих пагонів, також містили 25–30 % вологи.

Бруньки груші мали найкращу життєздатність після кріоконсервування, коли вміст вологи було зменшено приблизно до 41 % [82].

Швидкості охолодження приблизно від 0,25 °C/хв до 0,5 °C/хв застосовують для меристем, отриманих з бруньок у стані спокою, під захистом кріопротекторів. Для об'єктів більшого розміру, наприклад, сегментів живців яблуні довжиною 35 мм, застосовуються повільніші швидкості охолодження – 1 °C/год. При контрольованій швидкості охолодження температура переносу зразків безпосередньо у рідкий азот

зазвичай знаходиться в діапазоні від -30 до -40 °C [26]. Якщо кріопротектори не використовуються, температура переносу залежить від рівня акліматизації та видових особливостей.

Використання повільних швидкостей охолодження може виключати необхідність дегідратації зразків. Пагони яблуні із нативним рівнем вологості, що були охолоджені зі швидкістю близько 5 °C/доба, показали такі ж відсотки виживання, як при охолодженні зразків, які були спочатку зневоднені до 30 % вологості, зі швидкістю 1 °C/год. [100]. Також було повідомлення про збереження живців хурми за допомогою процедури охолодження з контрольованою швидкістю та відновлення рослин в умовах *in vitro* [55].

Меристеми, які виділяють з бруньок у стані спокою, також можна зберегати з використанням методів вітрифікації. Відомі роботи з кріоконсервування бруньок різноманітних видів у стані спокою, проте відсоток життєздатності не завжди був високим [36].

Для кріоконсервування бруньок у стані спокою використовують методи, що описані для кріоконсервування меристем, включаючи регульовану швидкість охолодження, вітрифікацію та інкапсуляцію-дегідратацію. Основна відмінність полягає в тому, що для цих прийомів використовуються бруньки вже у стані спокою на відміну від активно зростаючої меристеми.

Метод, який використовується для кріоконсервування, повинен залежати від рівня морозовитривалості отриманого матеріалу. Наприклад, багато видів є досить морозостійкими, і бруньки використовуються безпосередньо для кріоконсервування за допомогою охолодження з регульованою швидкістю [115]. Для збереження меристем, які були отримані з бруньок нехолодовитривалих видів у стані спокою, може бути використано метод вітрифікації. Бруньки у стані спокою та меристеми, які відносяться до дуже холодовитривалих видів, але отримані в менш холоднокліматичному стані, також можуть бути кріоконсервовані методами вітрифікації [10, 82].

1.3.2 Кріоконсервування гермплазми винограду

Піонерські дослідження по низькотемпературному зберіганню генетичних ресурсів винограду були з успіхом продемонстровані на пилку [28, 29]. Надалі з'явилися роботи з кріоконсервування меристем та соматичних ембріогенних суспензій клітин [18, 23, 32, 75, 76, 145].

З 1990-х років були описані нові кріогенні процедури зі збереження гермплазми винограду, включаючи інкапсуляцію-дегідратацію, вітрифікацію, інкапсуляцію-вітрифікацію та краплинну вітрифікацію, які є одними з найбільш використовуваних методів для рослин на основі вітрифікації [19, 82]. Нещодавно описано кріотерапію для ефективного викорінення вірусів виноградної лози [71, 72].

Пилок декількох сортів винограду вперше успішно кріоконсервували методом двоступеневого процесу охолодження [28]. Пилок, який був попередньо охолоджений до -20°C , занурювали у рідкий азот, відігрівали та пророщували на середовищі, яке містило 20 % (w/v) сахарози. Показники проростання становили від 54,7 до 77,3 % у п'яти сортів *V. vinifera*. Подальші дослідження показали, що пилок впродовж 5 років низькотемпературного зберігання залишав високий рівень життєздатності і з успіхом був використаний для запилення [29].

Автори перших досліджень з кріоконсервування меристем винограду також використовували двоступеневий процес охолодження. У своїх дослідженнях вивчали вплив кріоконсервування на меристеми виду *V. Labrusca*, які були отримані з виноградних лоз у різні сезони. Меристеми, 1-2 мм за розміром, обробляли кріозахисним розчином, що містив 10 % (вага/об'єм) ДМСО і 60 г/л глюкози, протягом 2 годин при кімнатній температурі. Потім зразки охолоджували до -20 , -30 і -40°C , зі швидкістю $0,5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, з подальшим зануренням у рідкий азот на збереження. Меристеми, які були отримані у вересні та були попередньо охолоджені до -30°C , не виживали. Відновлення росту бруньок спостерігалось лише у зразків

попередньо охолоджених до -20°C . Але зростання пагонів було дуже повільним і у кінцевому підсумку їх не вдалося відновити. Життєздатність кріоконсервованих меристем, отриманих у листопаді і попередньо охолоджених до -20 , -30 і -40°C , складала більш 70 % [23].

Використання експлантів, взятих безпосередньо у польових умовах, дозволило б уникнути процедури *in vitro* для створення маточних культур для подальшої регенерації рослин [99]. До цієї пори були зроблені доповіді про кріоконсервацію винограду з використанням меристем або бруньок у стані спокою, які були взяті безпосередньо *in situ*: один – з використанням двоступеневого процесу охолодження [22], а інший – за допомогою протоколу краплинної-вітрифікації [37].

У дослідженні [22] бруньки, які були отримані *in situ*, зневоднювали до 18 та 25 % води до занурення у рідкий азот. Після кріоконсервування невелика життєздатність була отримана для бруньок з вологістю 25 %, проте зразки, які були зневоднені до 18 % вологості, після кріоконсервування не виживали.

Повідомляється також про двоетапний метод інкапсуляції-дегідратації для кріоконсервації меристем сорту Шардоне. У цьому випадку життєздатність меристем склала 24 % [76]. Включення 5 % ДМСО у середовище для попереднього культивування поліпшило показники життєздатності [75].

Аналогічний двостадійний протокол інкапсуляції-дегідратації також був протестований при кріоконсервації меристем декількох сортів *V. vinifera*, але зростання не спостерігалось, хоча вони і мали 35–50 % збереженості [61].

Для кріоконсервації меристем гібрида LN33 і сорту Суперіор використовували протокол інкапсуляції-дегідратації. Після швидкого відігрівання у водяній бані при 40°C протягом 3 хв меристеми культивували для відновлення на посткультуральному середовищі, з додаванням 1 мг/л 6-бензиладенину і 0,1 мг/л 1-нафталиноцетової кислоти. За допомогою цих

чинників було отримано 60 і 40 % життєздатних меристем для гібрида LN33 і сорту Суперіор відповідно [110].

Було запропоновано протокол вітрифікації з кріоконсервування меристем винограду, які отримували з 4–5 міс. рослин *in vitro*, попередньо культивували у 0,3 М розчині сахарози протягом 3 діб і потім експонували у розчині сахарози з гліцерином протягом 20 хв при 25 °С з подальшою витримкою у 50 % PVS2 при 0 °С протягом 30 хв, а потім у 100 % PVS2 при 0 °С протягом 50 хв [87]. Зневоднені меристеми занурювали безпосередньо у рідкий азот. Цей протокол кріоконсервування був застосований до близько десяти видів та гібридів винограду, з відсотком життєздатності більш ніж 60 % [53].

Було описано протокол кріоконсервування меристем, отриманих з підщепного сорту Кобер 5ББ, методом інкапсуляції–вітрифікації [8]. Після кріоконсервування, меристеми, які були інкапсульовані у 3 % альгілату натрію, з наступним впливом PVS2 протягом 90 хв при 0 °С, відігрівали у водяній бані при 40 °С і культивували для оцінки життєздатності. Хоча кріоконсервовані меристеми здатні були регенерувати у пагони, темпи відростання залишалися низькими [8].

Були запропоновані подальші дослідження щодо підвищення толерантності меристем до дегідратації та подальшого заморожування у рідкому азоті для досягнення високих показників відростання пагонів [7, 8].

Було також продемонстровано, що метод краплинної вітрифікації [70] найширше застосовується до різноманітних генотипів і вважається найбільш перспективним рішенням для подолання видового або геноспецифічного обмеження, яке часто перешкоджає створенню кріобанків [70, 82, 111].

З метою кріоконсервування меристем винограду методом краплинної вітрифікації дослідники спочатку дезінфікували меристеми поверхнево, а потім культивували протягом 3 днів у темряві при 25 °С, щоб визначити їх санітарний стан *in vitro*. Меристеми попередньо обробляли розчином сахарози з гліцерином при 22 °С протягом 20 хв, після чого витримували у 50

% PVS2 при 0 °C протягом 10–15 хв, а потім у 100 % PVS2 протягом 10–20 хв. Після дегідратації з PVS2, меристеми переносили з невеликим об'ємом розчину на смужки з алюмінієвої фольги і занурювали безпосередньо у рідкий азот. Охолоджені меристеми відігрівали шляхом перенесення у розчин, що містив 1,2 М сахарози, протягом 20 хв при кімнатній температурі і ставили на пророщування. Життєздатність деконсервованих зразків при використанні даного методу становила близько 50 % [37]. На сьогоднішній день метод краплинної вітрифікації було застосовано до ряду сортів та гібридів виноградної лози [12, 53].

Насіння винограду відноситься до ортодоксальної групи, і для його збереження використовуються традиційні стратегії, що робить процес кріоконсервування відносно легким [37]. У цьому дослідженні насіння збирали зі зрілих ягід і зберігали при температурі 4 °C протягом 10–12 тижнів до стану спокою. Після цього насіння зневоднювали у ламінарному потоці повітря протягом 6 год, перед прямим зануренням у рідкий азот. Охолоджене насіння відігрівали при 40 °C на водяній бані протягом 1 хв, висівали у змішаний субстрат (торф'яний мох:пісок = 1:1) і витримували у фітотроні (22 °C $\pm$ 1 °C) для проростання. Далі насіння пророщували до стадії сіянців після 4 тижнів культури, з отриманням проростання 50–70 %.

Перші дослідження з кріоконсервування соматичних ембріогенних тканин винограду були проведені методом двоступеневого охолодження [17, 18]. Пізніше було продемонстровано метод інкапсуляції-дегідратації для кріоконсервації суспензії соматичного ембріогенного калюсу та метод вітрифікації для кріоконсервації соматичних ембріонів. При спробі застосувати протокол інкапсуляції-дегідратації до кріоконсервації соматичних ембріонів важливих генотипів винограду спостерігалися низькі показники виживання, тому цей метод було модифіковано у протокол інкапсуляції-вітрифікації, який був успішно застосований до 6 сортів винограду з коефіцієнтом відновлення від 42 до 82 % [109].

Встановлено, що кріоконсервовані клітини регенерували у ембріони набагато раніше і виробляли набагато більше ембріонів на різних стадіях розвитку, ніж контрольні клітини [6, 32, 62].

Після кріоконсервування соматичні ембріони проліферують і можуть утворювати вторинні ембріони. Ці вторинні ембріони з успіхом розвиваються далі, і в кінцевому підсумку перетворюються на цілі рослини, які морфологічно і структурно ідентичні маточним рослинам [62].

Таким чином, зберігання генетичних ресурсів винограду можливе як у польових колекціях *in vivo*, так і *in vitro* у гіпотермічних умовах або в умовах низькотемпературних банків. Складнощі при гіпотермічному зберіганні пов'язані з високою специфічністю певних сортів, необхідністю індивідуального підбору умов та середовищ, ризиком інфікування здорових живців винограду від хворих при одночасному вимочуванні. Необхідність відновлення вологості живців після тривалого зберігання, потреба у швидкому насиченні живильними або захисними середовищами обумовлюють актуальність розробки нових методів насичення об'єктів трубчасто-капілярної будови, зокрема з використанням вакууму.

Ефективних методів кріоконсервування бруньок винограду на даний момент не розроблено, що пов'язано зі складною будовою та значним розміром об'єкта, складнощами насичення бруньок концентрованими кріозахисними розчинами. Розробка протоколів кріоконсервування неможлива без застосування сучасних підходів, одним з яких може стати вакуум-інфільтрація бруньок винограду розчинами PVS з наступною вітрифікацією.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали досліджень

Аналіз ґрунту на місці передбачуваного винограднику поблизу с. Гайдари Зміївського району виявив переважно піщану структуру у поверхневому шарі, а на глибині 80 см виявили дрібнозем з вмістом глини до 10 %. Глибина культивування землі складала 35-40 см (рис. 2.1.1). З урахуванням ґрунтових особливостей при висадці виноградного саджанця використовували наступні розміри посадкових ям: $0.7 * 0.7 * 1$ м.

Аналіз ґрунту на дослідній ділянці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України показав високий вміст глини і в поверхневому шарі і на глибині 80 см (рис. 2.1.2). З метою отримання високих показників зростання і швидкого вступу в фазу плодоношення при висадці виноградного саджанця використовувався стандартний розмір посадкових ям: $0.8 * 0.8 * 0.8$ м. Непридатний для обробки ґрунт з посадкових ям вивозився за межі ділянки, а яма заповнювалася підготовленою ґрунтосумішшю.



Рис. 2.1.1. Культивування землі під ампелографічну колекцію поблизу с. Гайдари.



Рис. 2.1.2. Підготовка посадкових ям для створення ампелографічної колекції на дослідній ділянці при ІПКіК НАН України.

Експериментальні дослідження проводили з використанням лози та бруньок винограду сортів Шевченко, Руський Конкорд, Ріпарія Рупестріс 101/14 (PP101/14) та Загадка, які мають різне призначення, морозостійкість, стійкість до хвороб та відмінності у будові (табл. 2.1.1).

Лозу збирали в осінньо-зимовий період з дослідних ампелографічних колекцій [161] і закладали на зберігання в умовах гіпотермії при 4 °С. Нативна вологість лози була у межах 52–59 %, що відповідало фізіологічним критеріям.

Вплив гіпотермічного зберігання, визначення впливу сахарози, встановлення ефективності метода вакуум-інфільтрації досліджували на однорічних живцях винограду сорту Шевченко.

Таблиця 2.1.1

Головні ознаки сортів винограду використаних у експерименті

Ознаки	Сорти винограду			
	Шевченко	Руський Конкорд	Загадка	РР 101/14
Призначення	універсальний	винний	столовий	підщепний
Морозостійкість, °С	-25	-30	-25	-35
Відокремленість бруньки від лози, бали	3	3	5	1
Щільність лози, бали	3	3	1	5
Стійкість до хвороб, бали	3	4	3	5
Розмір бруньки, бали	3	3	5	1

Примітки: у балах від 1 до 5 зі збільшенням ступеня проявлення ознаки.

Визначення впливу кріозахисних середовищ та способів насичення на збереженість бруньок проводили на бруньках винограду сорту Руський Конкорд.

Дослідження впливу кріоконсервування бруньок у стані спокою на їх збереженість і життєздатність проводили на трьох сортах винограду: підщепний сорт Ріпарія Рупестріс 101/14 (РР101/14), універсальний сорт Руський Конкорд та столовий сорт Загадка.

Бруньки у стані спокою із невеликою ділянкою деревини 20-25 мм (рис. 2.1.3) виділяли з однорічної лози, зібраної в осінньо-зимовий період.

Для виготовлення різних рослинних вітрифікуючих розчинів (plant vitrification solution, PVS) використовували 1,2-пропандіол (1,2-ПД), етиленгліколь (ЕГ), гліцерин, ДМСО та сахарозу. Усі речовини були кваліфікації «х.ч.» або «ч.д.а.» («Sigma – Aldrich», США та «Реахим», Росія). Склад досліджених розчинів PVS наведено у таблиці 2.1.2. Розчини виготовляли на живильному середовищі Мурасіге–Скуга (МС) [64, 167].



Рис. 2.1.3. Виділення бруньок з невеликою ділянкою деревини.

Таблиця 2.1.2

Склад досліджених кріоконсервуючих розчинів PVS [82, 107]

Розчин	Склад
PVS1	22 % гліцерину+13 % 1,2-ПД+13 % ЕГ+6 % ДМСО + 0,4 М сахарози
PVS2	30 % гліцерину+15 % ЕГ+15 % ДМСО+0,4 М сахарози
PVS3	44 % гліцерину+44 % сахарози
PVS4	35 % гліцерину+20 % ЕГ+0,6 М сахарози
PVSN	15 % гліцерину + 15 % ЕГ+34 % сахарози

2.2 Методи досліджень

2.2.1 Метод насичення живців винограду різними середовищами із застосуванням вакуумної інфільтрації

Відпрацювання методу здійснювали на розробленій в ІПКіК НАНУ лабораторній вакуум-інфільтраційній установці (рис. 2.2.1.1). Продуктивність даного методу складає не більше 60 одновузлових живців на годину [183].

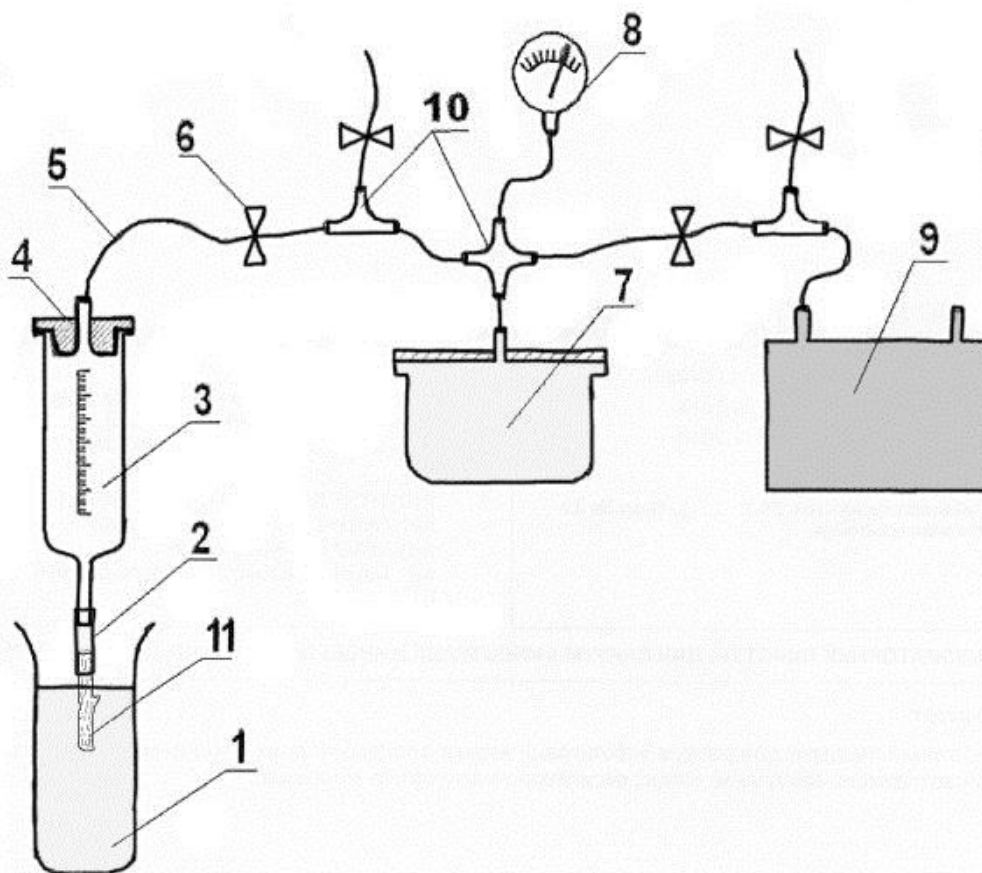


Рис. 2.2.1.1. Схема лабораторної вакуум-інфільтраційної установки: 1 – ємність з розчином, 2 – силиконовий шланг, 3 – градуйований резервуар, 4 – кришка, 5 – шланг, 6 – затискачі, 7 – ексикатор, 8 – манометр-вакууметр, 9 – вакуумний насос, 10 – розділювач потоку, 11 – живець.

Методика вакуум-інфільтрації полягає в наступному. Апікальні частини живця (11) фіксували в силиконовому шлангу (2), який був з'єднаний

з градуйованим резервуаром (3) для оцінки обсягу проінфільтрованої рідини. Підготовлену конструкцію опускали вниз по направляючій і поміщали в ємність з розчином (1) з таким розрахунком, щоб під час подачі тиску вся поверхня живця була занурена у рідину, що виключало б її зіткнення з повітрям. Потім включали вакуумний насос (9) і досягали в ресивері, в якості якого виступав ексікатор (7), необхідний вакуум, який реєстрували вакуумметром (8). Потім відкривали загальну магістраль і ініціювали процес інфільтрації. Рідина з контейнера починала підійматися по трубчасто-капілярній структурі живця, після чого потрапляла у градуйований інфільтраційний резервуар, що свідчило про завершення процесу насичення. По завершенню процесу інфільтрації кран подачі вакууму (6) перекривали, вакуум скидали, конструкцію витримували деякий час і потім плавно піднімали вгору, після чого живець витягали, а інфільтрат або утилізували, або фільтрували для подальшого використання. Слід зазначити, що перед вакуум-інфільтрацією необхідно ретельно фільтрувати розчин, так як сторонні домішки можуть закупорювали капіляри і знижувати ефективність насичення, а отже і активність проростання.

Застосований у роботі понижений тиск складав 70 кПа [166]. Підбор тиску здійснювали експериментально, з огляду на дані про силу тиску пасоки на прикладі виноградної лози в період сокоруху, яка може перевищувати 200 кПа і не має травмуючого ефекту на бруньки [147]. Кількісною оцінкою завершення насичення служив час від моменту включення крана подачі вакууму до появи інфільтрату в градуйованому резервуарі.

2.2.2 Оптимізація методу вакуум-інфільтрації живців винограду різними середовищами

Для одночасного насичування необхідної кількості живців в експерименті було створено вакуум-інфільтраційну установку підвищеної ефективності (рис. 2.2.2.1). Поставлене завдання було вирішене тим, що в пристрої для насичення живців плодово-ягідних культур (рис. 2.2.1.1)

додатково встановлені інфільтраційна ємність з кранами, яка закріплена на штативі з можливістю вертикального переміщення, і розділювачі потоку, які мають патрубки для розміщення живців. Встановлення інфільтраційної ємності з кранами і розділювачів потоку забезпечує можливість одночасного насичення великої кількості живців. При необхідності кількість живців можна варіювати шляхом змінювання кількості розділювачів потоку і/або кількості патрубків. Продуктивність даного пристрою становить не менш 300 живців за годину [168].

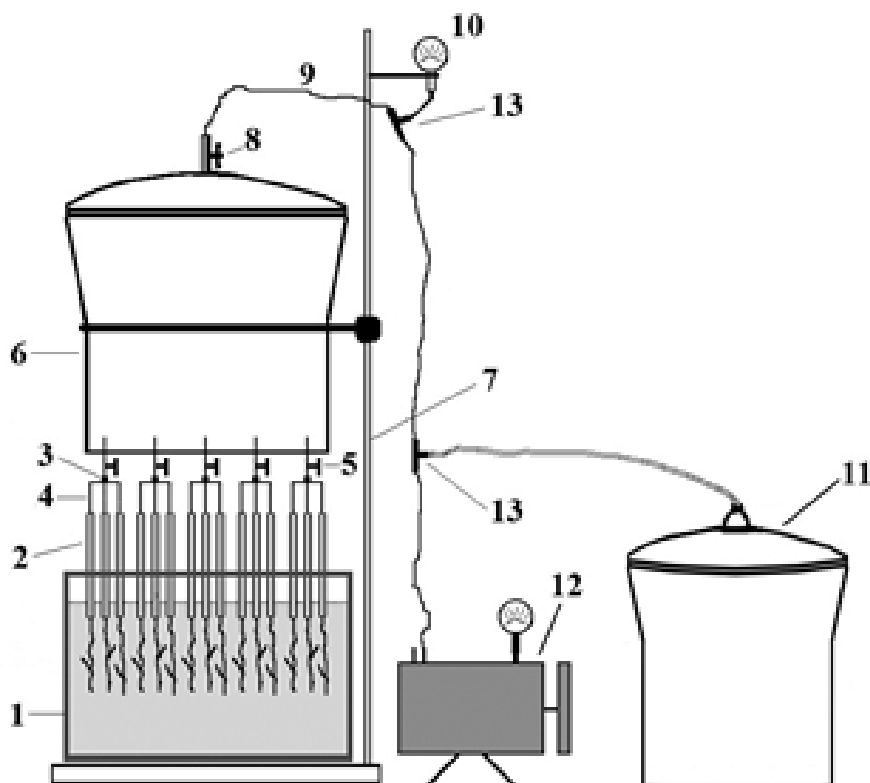


Рис. 2.2.2.1. Схема вакуум-інфільтраційної установки підвищеної ефективності: 1 – ємність з розчином, 2 – еластичні перехідники, 3 – розділювачі потоку, 4 – патрубки, 5 – крани, 6 – інфільтраційна ємність, 7 – штатив, 8 – затискачі, 9 – вакуумний шланг, 10 – вакуумметр, 11 – ексікатор, 12 – вакуумний насос, 13 – перехідники.

Робота пристрою та методика насичення здійснюється таким чином: апікальні кінці живців з'єднують через еластичні перехідники (2) з патрубками (4) розділювачів (3) потоку, які під'єднані до кранів (5) інфільтраційної ємності (6). Інфільтраційну ємність з живцями зміщують до низу по штативу (7). Базальні кінці живців поміщують у ємність (1) з робочою рідиною і включають вакуумний насос (11). При цьому в ексікаторі (9) та інфільтраційній ємності (6) формується зріджена атмосфера, величину зниженого тиску визначають за допомогою вакуумметра (10). Після досягнення необхідного тиску відкривають крани (5) інфільтраційної ємності (6) і за рахунок витиснення повітря з живців відбувається процес проходження робочої рідини по волокнам живців, яка попадає в інфільтраційну ємність (6). По закінченню процесу насичення живців перекривають затискач (7), крани (5) інфільтраційної ємності (6), скидають надлишковий тиск та інфільтраційну ємність (6) зміщують угору по штативу (7). Живці виймають з еластичних перехідників (2) розділювачів (3) потоку і витримують деякий час для додаткового розподілу рідини по живцю.

2.2.3 Визначення ефективності методів насичення живців винограду різними середовищами

Ефективність методів насичення живців винограду оцінювали візуально за інтенсивністю забарвлення зрізів водним розчином еозину (1 г/л). Методика оцінки полягала в наступному: після вакуум-інфільтрації або вимочування у розчині еозину живці підсушували на фільтрувальному папері, після чого копуліровочним ножом робили поздовжній зріз живця через бруньку. В якості контролю використовували дані інтенсивності проникнення розчину еозину при використанні живців, насичених за методом вимочування.

Імовірність можливого пошкодження живців винограду після вакуум-інфільтрації оцінювали за життєздатністю і часом розвитку бруньок на

живцях, які порівнювали з групою контролю. В обох випадках в якості середовища для насичення використовували живильне середовище МС.

Пророщування живців проводили у фітотроні з освітленням 5500 люкс за температури 18–20°C в пластикових контейнерах з використанням вермикуліту в якості ґрунту.

2.2.4 Вивчення кінетики насичення живців винограду розчинами різної в'язкості методом вакуумної інфільтрації

Для вивчення кінетики насичення живців винограду розчинами різної в'язкості використовували гліцерин і сахарозу (х.ч. «Merck», Німеччина) в концентраціях 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %. Розчини готували на живильному середовищі Мурасіге–Скуга. У якості контролю підраховували час насичення живців живильним середовищем МС. В експериментах створювали знижений тиск 70 кПа. У якості кількісної оцінки завершення насичення був час від моменту включення крана подачі вакууму до появи інфільтрату.

В експерименті використовували живці з відкритими зрізами. Довжина одновузлових живців коливалася в межах 55–70 мм, двовузлових 90–120 мм, тривузлових 140–170 мм. Діаметр становив 6 або 9 мм. Кількість живців в експерименті становила 10 шт.

2.2.5 Вивчення життєздатності бруньок у складі живця винограду з різним рівнем фізіологічної вологості

Експеримент передбачав використання 6 груп живців з різним рівнем вологості у 3-кратній повторності:

I варіант: 52 % нативна вологість,

II варіант: 48 %,

III варіант: 44 %,

IV варіант: 40 %,

V варіант: 36 %,

VI варіант: 33 %.

Одразу після заготівлі лози живці поділяли на одновузлові сегменти, визначали рівень вологості і ставили контроль на пророщування. Після чого живці зневоднювали в умовах холодильної камери з відкритими зрізами при 2 °С. Контроль життєздатності живців проводився після кожного етапу висушування.

Ступінь вологості визначали шляхом зважування зразків та розрахунку за такими формулами:

$$\eta_0 = ((m_0 - m_k) / m_0) \times 100 \%, \quad (1)$$

$$\eta_i = (m_i / m_0) \times \eta_0, \quad (2),$$

де η_0 – початкова вологість нативного зразка (%), m_0 – початкова маса нативного зразка (г), m_k – кінцева маса зразка після зневоднення до постійної маси (г), η_i – вологість зразка на одному з етапів у процесі висушування (%), m_i – маса зразка на одному з етапів у процесі висушування (г) [130].

Життєздатність бруньок визначали за їх набуханням та подальшим розпусканням. Відсоток життєздатності зразка оцінювали як відношення кількості живців з розкритими бруньками до загальної їх кількості у зразку. Також оцінювали час дегідратації живців в умовах холодильної камери.

2.2.6 Вивчення впливу зниження рівня вологості гермплазми винограду на її життєздатність після різних способів і термінів гіпотермічного зберігання

В експерименті розглядали 4 варіанти зберігання живців винограду в умовах гіпотермії:

I варіант: живці з відкритими зрізами, загорнуті в поліетиленову стрейч плівку (контроль).

II варіант: живці з парафінованими зрізами, загорнуті в поліетиленову стрейч плівку.

III варіант: живці парафіновані повністю, загорнуті в поліетиленову стрейч плівку.

IV варіант: живці з парафінованими зрізами, загорнуті в поліетиленову стрейч плівку. При зниженні рівня вологості до 47–48 % у живцях у процесі зберігання відновлювали вихідний рівень вологості методом вакуум-інфільтрації. Для активного насичення використовували рідке живильне середовище МС. Після чого знову парафінували зрізи, загортали в поліетиленову стрейч плівку і закладали на зберігання у холодильну камеру.

Для парафінування застосовували суміш, яка складалась із 80 % парафіну, 10 % окисненого воску та 10 % неокисненого воску [150].

У всіх варіантах перед закладкою на зберігання живці винограду обробляли ледь рожевим розчином перманганату калію. За схемою експерименту зберігали живці при постійній температурі 2 °С в умовах холодильника. Перед закладанням живців, у процесі зберігання і після нього контролювали:

1. Збереженість бруньок і визрівання лози перед закладкою на зберігання.
2. Вологість перед укладанням на зберігання (%).
3. Вміст води через кожні 30 днів зберігання протягом 9 місяців в усіх варіантах експерименту (%).
4. Життєздатність бруньок на кожному етапі зберігання в усіх варіантах експерименту (%).

2.2.7 Вивчення впливу розчинів сахарози різної концентрації на життєздатність і терміни проростання бруньок винограду

Одразу після заготівлі лози її витримували при 2°С для підвищення холодової адаптації впродовж 10 діб. Після чого живці поділяли на

однорозеткові сегменти, визначали рівень вологості і визначали збереженість вічок, використовуючи гостре лезо.

Життєздатність живців винограду після обробки розчинами сахарози в концентраціях 0,25 М, 0,5 М, 0,75 М, 1,0 М, 1,25 М, 1.5 М методом вакуум-інфільтрації з часом експозиції 1, 2, 3 доби оцінювали візуально за термінами набухання бруньок та подальшого їхнього розвитку в умовах фітотрона з освітленням 5500 люкс при температурі 18–20 °С з використанням перліту і вермикуліту в пропорції 1:1 в якості ґрунтосуміші.

2.2.8 Оцінка життєздатності та термінів пророщування живців винограду в залежності від рівня вологості і насичення розчинами сахарози різної концентрації методом вакуум-інфільтрації

Перед пророщуванням живці насичували середовищем МС методом вакуум-інфільтрації. Життєздатність живців винограду з рівнем вологості 50–52, 39–42, 30–33 % після насичення розчинами сахарози концентраціями 0,1 М, 0,3 М, 0,5 М, 0,7 М методом вакуум-інфільтрації оцінювали візуально за часом набухання бруньок і термінів подальшого їх розвитку в умовах фітотрона з освітленням 5500 люкс при температурі 18–20 °С з використанням перліту і вермикуліту в пропорції 1:1 в якості ґрунтосуміші.

Відсоток життєздатності зразка оцінювали як відношення кількості живців з розкритими бруньками до загальної їх кількості в експерименті.

Також оцінювали терміни пророщування бруньок на живцях з рівнем вологості 50–52%.

Розчини готували на живильному середовищі МС без сахарози.

2.2.9 Метод низькотемпературної диференційної скануючої калориметрії

Фазові переходи і склування в області температур від –196 °С до температури повного плавлення досліджували методом низькотемпературної диференційної скануючої калориметрії (ДСК) з використанням калориметру,

який було розроблено і виготовлено в ІПКіК НАН України [138]. Кріозахисні розчини (маса = 1 г) або бруньки (маса $\approx$ 1 г) (без рідини) поміщали у калориметричну комірку. При дослідженні фазових переходів у бруньках для кращого контакту бруньок зі стінками комірки застосовували порошок бронзи [178, 184, 185]. Зразки охолоджували зануренням у рідкий азот. Середня швидкість охолодження при цьому складала 200 град/хв. Термограми реєстрували на етапі нагріву охолоджених зразків зі швидкістю 0,5 град/хв.

2.2.10 Методи насичення ізольованих бруньок винограду вітрифікуючими розчинами PVS

У роботі порівнювали ефективність класичного пасивного насичення бруньок (вимочування у кріозахисному розчині за нормального атмосферного тиску протягом 60 хв) і методу вакуум-інфільтрації.

Схему пристрою для насичення бруньок винограду методом вакуум-інфільтрації наведено на рис. 2.2.10. Робота пристрою та методика насичення здійснюється таким чином: виділені сплячі бруньки винограду (1) поміщають у вакуумну камеру (2), яка через патрубок з'єднана з ємністю (3) із робочою рідиною, а крізь горловину з'єднана з вакуумним шлангом (4). Після цього відкривають затискач (5) і включають вакуумний насос (6). Таким чином в ексикаторі (7), в вакуумній камері (2) та ємності (3) формується зріджена атмосфера, величину тиску якої визначають за допомогою вакуумметра (8). Після досягнення тиску в 20 кПа перекривають затискач (5) і за рахунок зрідженої атмосфери впродовж 5 хвилин відбувається дегазація бруньок та робочої рідини. По закінченню процесу дегазації робочу рідину із ємності (3) переливають у вакуумну камеру (2) з бруньками та експонують 5-30 хв при 20-80 кПа. Після цього повільно скидають надлишковий тиск за допомогою крану (9) для стравлювання надлишкового тиску, який під'єднаний до вакуумної магістралі за допомогою розділювача потоку (10).

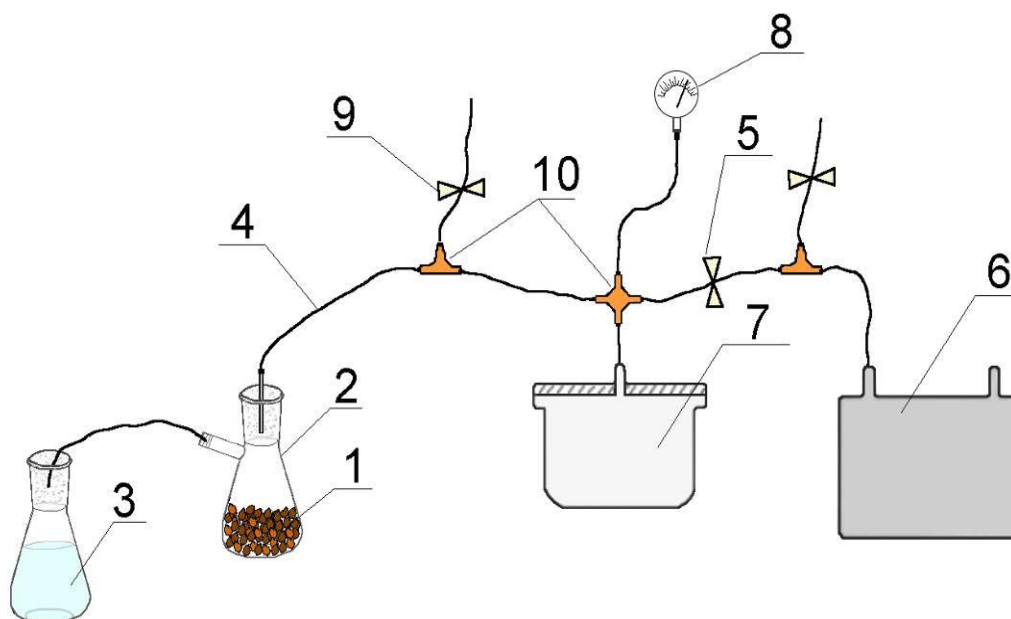


Рис. 2.2.10. Пристрій для насичення бруньок винограду методом вакуум-інфільтрації: 1 – бруньки винограду, 2 – вакуумна камера, 3 – ємність з робочою рідиною, 4 – вакуумний шланг, 5 – затискач подачі вакууму, 6 – вакуумний насос, 7 – ексикатор, 8 – вакуометр, 9 – кран для стравлювання надлишкового тиску, 10 – розділювачі потоку.

Процес насичення починається з додавання робочої рідини до вакуумної камери з бруньками, які повинні бути повністю занурені у рідину. Це досягається завдяки встановленню обмежувача спливання бруньок. Процес закінчувався лише після повільного скидання надлишкового тиску, під час якого рідина активно спрямовується у більш глибокі шари бруньок. Повільне скидання надлишкового тиску зменшує вірогідність травмуючого ефекту на бруньки. Кількісною оцінкою якісного насичення є відсутність плаваючих на поверхні бруньок після скидання надлишкового тиску. При наявності плаваючих бруньок їх вибраковуюють із подальших експериментів. Вірогідність такого ефекту може бути пов'язана з різною анатомо-

морфологічною структурою бруньок та пагонів винограду, яка формується упродовж всього вегетаційного періоду.

Для оцінки глибини проникнення речовин із розчину і рівномірності їх розподілення у різних шарах бруньок винограду проводили насичення бруньок розчинами барвників (0,8 г/л еозину; 0,5 г/л флуоресцеїн натрію). Флуоресцентні зображення бруньок отримували на флуоресцентному конфокальному мікроскопі «LSM-510 Meta» («Carl Zeiss», Німеччина). Довжина хвилі збудження 488 нм. Фільтр емісії для флуоресцеїну натрію 505–526 нм, для хлорофілу 650–700 нм.

Ефективність насичення бруньок розчинами PVS оцінювали методом ДСК за зміною температур фазових переходів, зниженням ентальпії кристалізації води і збільшенням стрибка теплоємності після склування [114].

2.2.11 Метод відмивання живців винограду від кріозахисних середовищ

Відмивання живців винограду, попередньо насичених кріозахисними середовищами, здійснювали з використанням пристрою для інфільтрації живців плодово-ягідних культур [169]. В якості рідини для відмивання використовували живильне середовище МС [64], яке попередньо фільтрували для видалення сторонніх домішок, які можуть забивати капіляри і знижувати ефективність відмивання.

На живцях відновлювали зрізи і фіксували у пристрої, після чого створювали тиск 900 мм.рт.ст. та поступово його нарощували за допомогою насоса високого тиску. За рахунок поступового збільшення тиску в пристрої процес проходження живильного середовища по судинах живців ставав більш повільним, що знижувало рівень осмотичного шоку клітин живців.

Під дією високого тиску живильне середовище МС потрапляло через базальні кінцівки живців, проходило по судинах живців та виходило через

апикальні кінцівки. Після завершення процесу відмивання тиск скидали, живці виймали та ставили на пророщування.

Енергію проростання визначали за часом пророщування живців, а життєздатність – за кількістю пробуджених живців.

2.2.12 Метод попередньої підготовки бруньок винограду перед кріоконсервуванням

Для кріоконсервування, з метою покращення стану бруньок перед зневодненням, проводили попередню обробку живців: лозу поділяли на одновузлові сегменти і методом вакуум-інфільтрації насичували розчином 0,5 М сахарози (70 кПа). Після чого живці зневоднювали в умовах холодильної камери до 37–42 % вологості. Бруньки винограду з невеликою ділянкою деревини (20–25 мм) виділяли зі зневоднених одновузлових сегментів лози за допомогою прищеплювального секатора. У експерименті порівнювали ефективність пасивного насичення кріозахисним розчином PVS2 (вимочування у кріозахисному розчині за нормального атмосферного тиску протягом 60 хв) і методом VIV (протягом 15 хвилин).

2.2.13 Метод охолодження та відігрівання бруньок винограду

Охолодження бруньок здійснювали у металевих контейнерах (10 мл) по 10 штук шляхом прямого занурення у рідкий азот (швидкість охолодження 150–200 °C за хв) з подальшою витримкою 2 години. Відігрівання здійснювали за експоненційного режиму при постійному контролі температури при початковій температурі водяної бані 40 °C. При досягненні у зразках температури 0 °C, температура у водяній бані знижувалася до 19–21 °C. Відмивання ізольованих бруньок винограду від кріопротекторів проводили у 0,5 М водному розчині сахарози з використанням технології вакуум-інфільтрації без дегазації протягом 3 хвилин при 40–45 кПа, з подальшим плавним підняттям тиску до атмосферного. Пророщування

проводили у нестерильних умовах на фільтрувальному папері з використанням плаваючих майданчиків з пінополістиролу при 18–20 °С в умовах фітотрона.

Збереженість меристемних частин бруньок після кріоконсервування оцінювали на 2 добу методом забарвлення 1 % розчином трифеніл-тетразолію хлориду [174]. Життєздатність виноградних бруньок оцінювали візуально за часом їх набухання. У якості контролю використовували життєздатність ізольованих бруньок з нативною вологістю без насичення.

2.2.14 Методи контролю температури зразків при здійсненні охолодження-відігрівання

З метою контролю температури використовували двоканальний АЦП «Mastech» (рис. 2.2.14.1).



Рис. 2.2.14.1. Прилад АЦП Mastech для здійснення моніторингу температури.

Термопари вживлювали у бруньки на глибину від 2 мм до 5 мм та фіксувались стяжками (рис. 2.2.14.2).



Рис. 2.2.14.2. Вживляння термопар у структуру живця.

Для покращення теплового переносу від досліджуваних зразків до датчиків застосовували термопасту з додаванням іонів срібла. Шар термопасти до 1 мм наносили на спай термопари та вживлювали у бруньку. Далі додавали зразок з під'єднаними термопарами до експериментальних зразків, здійснювали охолодження-відігрівання та водночас проводили моніторинг. Це давало змогу оцінювати температурні зміни у середині та на поверхні досліджуваних зразків.

2.2.15 Статистична обробка експериментальних результатів

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакету програми «Statistica 10.0». Дані наведено як середнє значення $\pm$ стандартне відхилення. Для перевірки статистичної значимості відмінностей використовували U-критерій Манна-Уїтні.

За матеріалами розділу 2 опубліковано роботи [168, 169, 178, 183-185].

РОЗДІЛ 3

СТВОРЕННЯ АМПЕЛОГРАФІЧНИХ КОЛЕКЦІЙ В УМОВАХ ДОСЛІДНИХ ДІЛЯНОК

Історія виноградарства та виноробства в Україні обчислюється століттями. З давніх-давен виноград вирощували вздовж узбережжя Чорного моря і річок Дніпро, Дністер, Буг, а також у Закарпатті. Перші згадки про культуру винограду на території сучасної України відносяться до періоду раніше X століття до нашої ери, коли місцеві племена гірського Криму використовували дикоростучий виноград. Тільки до VII-VI століть до нашої ери у грецькі колонії на узбережжі Криму стали завозити сорти винограду із Середземномор'я, про що свідчать археологічні розкопки [105, 116].

З більш північних районів, де обробляється виноград, відомо скіфське поселення Ольвія на березі Бузького лиману (нині Миколаївська область) [173]. На монетах древнього міста Тіра (тепер Білгород-Дністровський Одеської області) зображено виноградне гроно. Це свідчить про те, що жителі міста були знайомі з виноградом вже в VII-VI ст. до нашої ери [139].

Довгий час вважалося, що на півночі і північному сході України, зокрема на Слобожанщині, вирощування винограду мало можливо через більш суворі кліматичні умови. Однак виноградарство в цих регіонах має давню і багату історію.

Зачинателями розвитку виноградарства в північних районах України були монастирі, в тому числі Києво-Печерська Лавра. Перші відомості про вирощування винограду при монастирях Києва відносять до періоду Київської Русі (літопис Никона, 1151 р.).

Монастирське виноградарство у подальшому зіграло важливу роль у поширенні його на Слобожанщині, лозами якої в 1665 р. на землях міста Чугуєва були закладені виноградники для царського двору. Вони проіснували понад 120 років і знайшли своє відображення в старому міському гербі. Крім герба міста Чугуєва, на території Харківської губернії

виноград зображений ще в геральдиці міста Ізюм (Додаток Б). Відомо, що вже у 1760 році землевласник І. І. Данилевський з Балаклійського уїзду Харківської губернії вирощував понад 25000 кущів винограду [144].

У 1914 році працями нашого земляка Олександра Олексійовича Іваницького у Зміївському уїзді Харківської губернії було створено дослідні виноградники [161].

Але після такої давньої і багатой історії свого існування на території Слобожанщини, з приходом радянської влади, виноградарство, як галузь виробництва, було втрачено на довгі роки і вважалося неперспективним. Можливо, на той час для цього і були об'єктивні причини, оскільки сортимент сортів ще 100 років тому був на порядок нижче і не був ще так представлений морозовитривалими гібридами з поєднанням смакових та поживних властивостей південних сортів та підвищеною стійкістю до хвороб, але у всесвіті було і є багато прикладів, де культивування винограду здійснюється у кліматичних умовах та широтах, подібних до умов Слобожанщини, і деякі з таких регіонів завжди мали агропромислове значення [16, 90].

Таким чином, до недавнього часу на території Слобожанщини були відсутні державні ампелографічні колекції і весь генофонд винограду виявився розосередженим у приватних колекціях. Тому є необхідність у створенні генетичних ампелографічних банків, які могли б увібрати генофонд найцінніших сортів винограду, адаптованих до умов Харківщини, що дало б неоціненний поштовх розвитку виноробства та виноградарства у нашому регіоні.

Одним із завдань даної роботи було створення і збереження колекцій цінних сортів винограду для північно-східного виноградарства України у польових умовах дослідного поля і, у подальшому, у низькотемпературному сховищі (НТБ) ІПКіК НАН України. Обсяг біологічного матеріалу, який в даний час зберігається в НТБ, становить тисячі одиниць зберігання [182]. Розробка сучасних технологій кріоконсервування, що відповідають світовим

стандартам, а також дотримання вимог по підготовці матеріалу, його перевірці, маркуванню і збереженню відповідно до положень Європейської асоціації тканинних банків, дозволили НТБ ІПКіК НАНУ в 2002 році отримати статус Національного надбання України.

Для створення ампелографічних колекцій в умовах дослідних ділянок була проведена робота по налагодженню особистих контактів з науковими підрозділами НІВіВ «Магарач», що дало можливість укласти договір про наукове співробітництво (Додаток Д).

У 2014 вдалося отримати найцінніші сорти винограду з НІВіВ «Магарач» – однієї з найстаріших ампелографічних колекцій світу, яка становила Національне надбання України [160]. У якості місцевості під закладання майбутньої колекції було обрано дослідну ділянку, яка не культивувалася, на території біологічної станції біологічного факультету ХНУ ім. В. Н. Каразіна у Зміївському районі поблизу с. Гайдари (Додаток Б). На теперішній час ця місцевість входить до складу Національного парку «Гомільшанські ліси». З університетом було підписано договір про наукове співробітництво і створення на їх території ампелографічної колекції (Додаток Д).

Це місце було вибрано не випадково. Саме тут, понад 100 років тому, О. О. Іваніцьким були закладені виноградники, які мали на той час величезне сільськогосподарське значення (Додаток Б).

Значну частину свого життя О. О. Іваніцький присвятив виноградарству, за що неодноразово був відзначений багатьма значними нагородами. Його досвід зі створення нових і перспективних гібридів винограду для Північного регіону України був дуже високо оцінений провідними фахівцями у цій галузі. Це підтверджується документами, наданими з особистого архіву О. О. Іваніцьким (Додаток Б).

Саме на місці існування цих виноградників й досі в'ються виноградні лози по деревах підрослого підліску. Той факт, що за майже 100 років кліматичні, антропогенні та інші чинники його не згубили, вказує на

морозовитривалість та стійкість до хвороб форм, які вирощувалися у той час, що надає важливе експериментальне підґрунтя для подальших дослідженнях, зокрема інтродукції та ідентифікації сортів того часу.

Протягом декількох років була проведена робота по інтродукції південних сортів Харківської області з метою створення державної ампелографічної колекції Слобожанщини (рис. 3.1).



Рис. 3.1. Інтродукція південних сортів отриманих з колекції «Магарач».

Була здійснена необхідна підготовка земельної площі і закладка колекції безнасінних, столових, винних і універсальних сортів винограду різного терміну визрівання, наданих переважно НІВіВ «Магарач». В даний час в цій колекції налічується понад 65 унікальних і зникаючих сортів (представлені більш ніж 80 зразками), які мають передове значення для селекції і виноградарства Слобожанщини (Додаток В).

Дизайн виноградника першої закладки був запланований двома рядами по 50 м, орієнтованих з півдня на північ, ширина міжрядь склала 2,5 м з кроком куща 2 м (рис. 3.2).



Рис. 3.2. Перша закладка винограднику поблизу с. Гайдари (Біологічна станція ХНУ ім. В. Н. Каразіна).

Дизайн колекції другої закладки був запланований 5 рядами по 25 м, орієнтованих з півдня на північ, ширина міжрядь склала 2,5 м з кроком куща 2 м. Такі розміри продиктовані можливістю використовувати механізовану агротехніку (Додаток Б). У якості шпалер використовували тимчасові дерев'яні опори та металевий дріт у ПВХ оболонці діаметром 2,5 –3 мм (рис. 3.3).

Була створена технологічна карта закладки та вирощування ампелографічної колекції з урахуванням водного стану та кліматичних і ґрунтових особливостей даної місцевості. З північної, західної та східної сторін виноградник захищений лісовим масивом (рис. 3.4).



Рис. 3.3. Друга закладка винограднику поблизу с. Гайдари (Біологічна станція ХНУ ім. В. Н. Каразіна).



Рис. 3.4. Територія винограднику у Зміївському районі поблизу с. Гайдари.

З метою розширення колекції сортами нової селекції ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» і перспективними гібридами від передових українських селекціонерів було прийнято рішення про створення ще однієї ампелографічної колекції на території ІПКіК НАН України.

На дослідній ділянці ІПКіК НАНУ була проведена перша закладка винограднику (рис. 3.5) сертифікованими саджанцями безнасінних, столових, винних і універсальних сортів винограду різного терміну визрівання, наданими ННЦ «ІВіВ ім. В. С. Таїрова» та провідними українськими селекціонерами. До неї увійшло 48 сортів (Додаток Г).

Дизайн винограднику першої закладки був запланований п'ятьма рядами по 40 м, орієнтованих з півдня на північ, ширина міжрядь склала 3 м з кроком куща 3 м (рис. 3.6). Такі розміри продиктовані можливістю використовувати механізовану агротехніку. Була створена технологічна карта закладки та вирощування ампелографічної колекції з урахуванням кліматичних і ґрунтових особливостей даної місцевості. З північної, західної та південної сторін виноградник захищений лісовим масивом (рис. 3.5).

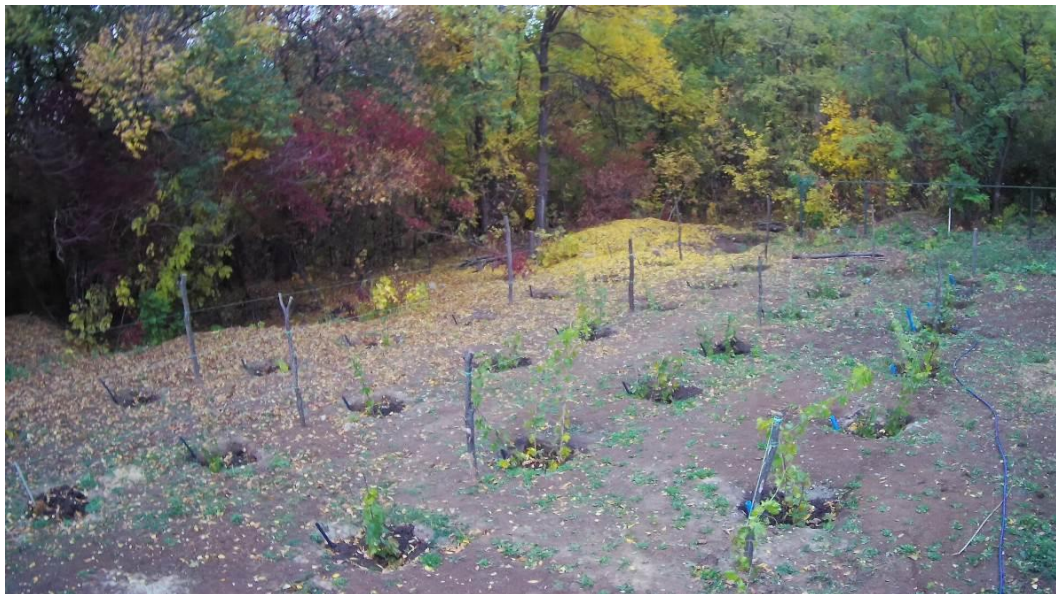


Рис. 3.5. Зкладка винограднику на дослідній ділянці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

З метою розширення колекції укритими і неукритими сортами винограду на дослідній ділянці ІПКіК НАНУ була проведена друга закладка винограднику саджанцями безнасінних, столових, винних і універсальних сортів винограду різного терміну визрівання. До неї увійшло 27 сортів (Додаток Г).



Рис. 3.6. Виноградник на дослідній ділянці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Дизайн винограднику другої закладки був створений з урахуванням кліматичних і ґрунтових особливостей даної місцевості та запланований чотирма рядами по 15 м, орієнтованих з півдня на північ, ширина міжрядь склала 3 м з кроком куща 3 м. Такі розміри продиктовані можливістю використовувати механізовану агротехніку.

Також були встановлені металеві шпалерні стовпи довжиною 2,3 м, які обладнали шпалерним дротом діаметром 2,5–3 мм. Була оброблена окрема ділянка для створення повесні виноградної шкільки.

На даний час на території ІПКіК НАН України наявно 75 сортів винограду, зокрема саджанців сортів нової генетики.

З метою оптимізації, підтримання та швидкого регулювання водного стану рослин на виноградниках було застосовано інноваційний метод поливу із застосуванням дренажних труб [52, 132, 135, 144]. Цей метод дає велику кількість переваг, одні з яких – зменшення водних витрат, завдяки створенню постійної зони водного дефіциту у поверхневому шарі землі, що обумовлює неможливість створення рослиною домінуючої поверхневої кореневої системи, яка є шкідливою для сортів, що культивуються у зоні північного

виноградарства. Використані прийоми, в цілому, зменшують витрати та час на підтримання ампелографічних колекцій у польових умовах.

Таким чином, проведена робота по інтродукції 65 південних сортів на дослідній ділянці Біологічної станції ХНУ ім. В. Н. Каразіна та 75 сортів винограду на території ІПКіК НАН України, зокрема саджанців сортів нової генетики, різного терміну визрівання, наданими НІВіВ «Магарач», ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» та провідними українськими селекціонерами. Сорти винограду, які вирощуються на науково-дослідних ділянках, мають різні генетично детерміновані ознаки (високопродуктивність, морозостійкість, комплексостійкість до різних хвороб та шкідників), різну промислову цінність (винні та столові). Також колекції містять новітні високо гетерозиготні гібриди, отримані за допомогою методів складної гібридизації. Все це дало можливість одержувати та контролювати власний дослідний матеріал упродовж всього вегетаційного періоду.

Проведена робота може забезпечити унікальним дослідним матеріалом як приватних селекціонерів, так і профільні інститути та селекційні установи України, оскільки дозволяє зберігати нові сорти та сорти, які можуть бути втраченими. Успішне вирішення підтримки колекції у життєздатному стані потребує нових технологій, з залученням сучасних способів обробки ґрунту, виноградної лози та зберігання урожаю [164].

Проведені роботи по створенню польових ампелографічних колекцій є передумовою відродження статусу Слобожанщини, як виноградарського та виноробного регіону, і створення низькотемпературної колекції, яка може стати базою довготривалого зберігання генетичного різноманіття винограду.

Роки роботи з різними сортами винограду на території нашого Інституту доводять доцільність відродження виноградарства на теренах Харківської області та виведення її на провідні позиції.

За матеріалами розділу 3 опубліковано роботи [161, 164].

РОЗДІЛ 4

ВИЗНАЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ МЕТОДІВ НАСИЧЕННЯ ЖИВЦІВ ВІНОГРАДУ

4.1 Створення ефективного способу активного насичення рослинних об'єктів трубчасто-капілярної структури різними середовищами на прикладі живців винограду

Живці або інші вегетативні частини рослин бажано збирати з поля у стані максимального спокою, але цей стан не завжди легко розпізнати або легко перевірити. Різні лінії або види мають різну кінетику аклімації, а ступінь морозостійкості може змінюватися з року в рік через коливання температури, тому, як правило, це відбувається у осінньо-зимовий період. Після збору пагони поточного сезону можуть бути додатково акліматизовані дуже поступовим впливом низьких температур. Рослини помірного клімату можуть зберігатися при температурі 4 °C або нижче, тоді як для тропічних культур потрібна температура 15–25 °C. Умовами освітлення можуть бути темрява або 12–16 годинний фотоперіод зі змінною інтенсивністю світла [82]. Холодова акліматизація значно покращує тривалість зберігання деяких рослин помірного клімату.

Для гіпотермічного зберігання вегетативних частин рослин може бути використано різний тип контейнерів, але при цьому важливими є збереження вологості, запобігання забрудненню і зараженню. Для поліпшення тривалості зберігання часто буває необхідна попередня обробка. Виявлено, що знаходження на живильному середовищі впродовж двох тижнів покращує тривалість зберігання рослин [19]. Поступове зневоднення перед зберіганням може бути ефективним для деяких видів, адаптованих до регіонів з сезонними відмінностями вологості повітря.

У дисертаційній роботі для насичення рослинних об'єктів трубчасто-капілярної структури живильними та кріозахисними середовищами

розроблено і запатентовано спосіб із застосуванням вакуум-інфільтрації [168, 183]. Встановлено, що насичення живців за відкритими зрізами спостерігається вже при зниженому тиску 70 кПа.

На рис. 4.1.1 наведені фотографії одновузлового живця винограду після вакуум-інфільтрації розчином еозину.



Рис. 4.1.1. Насичення одновузлового живця винограду після вакуум-інфільтрації розчином еозину.

Візуальна оцінка забарвленості досліджених живців винограду після вакуум-інфільтрації розчином еозину показала нерівномірність насичення по товщині зразка, що може бути пов'язано з закупоркою капілярів, неякісними зрізами, а також різною анатомічною будовою живців. У зв'язку з цим для дифузійного розподілу розчину перпендикулярно осі живця після вакуум-інфільтрації може знадобитися більш тривала експозиція. У контролі насичення живців методом вимочування у розчині еозину з різними термінами експозиції проходило досить повільно (рис. 4.1.2).

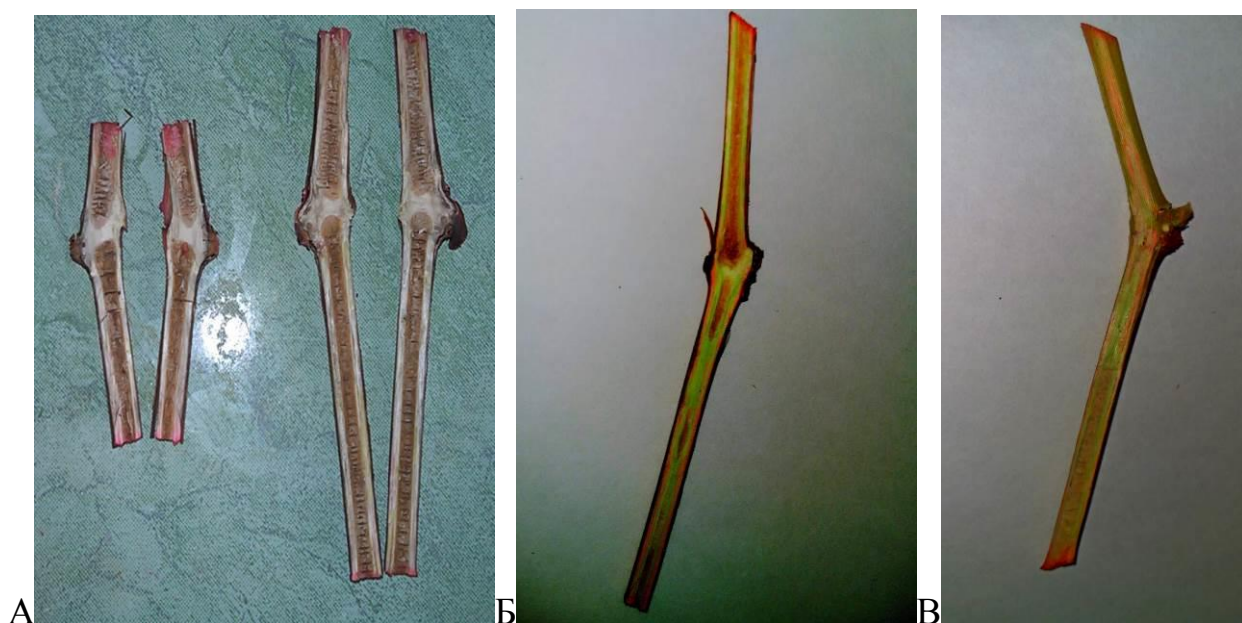


Рис. 4.1.2. Насичення живців винограду в розчині еозину методом вимочування: А – 3 год, Б – 6 год, В – 12 год.

У табл. 4.1.1 представлені дані про час проходження розчину еозину через живці винограду, які відрізняються індивідуальними параметрами, в умовах постійного тиску 70 кПа. Як видно з табл. 4.1.1 час проходження розчину через одновузлові живці винограду був досить коротким, що обумовлено анатомічною особливістю винограду, лоза якого має пористу структуру (рис. 4.1.3). У тривузлових живцях винограду час насичення розчином збільшувалася у 20 разів порівняно з одновузловими живцями та у 7 разів порівняно з двовузловими.

Також експериментально встановлено, що при збільшенні діаметра живців час насичення зменшується, що обумовлено збільшенням площі трубчасто-капілярної системи таких живців. Це твердження не стосується жируючих погонів, які мають нерозвинутий камбіальний шар. Живці з таких пагонів вибраковувались та не використовувались у експерименті.

При дослідженні часу активного насичення методом вакуум-інфільтрації живців винограду розчинами сахарози і гліцерину встановлено що, як і слід було очікувати, він закономірно збільшується при збільшенні концентрації розчинів і кількості бруньок на живцях (табл. 4.1.2).

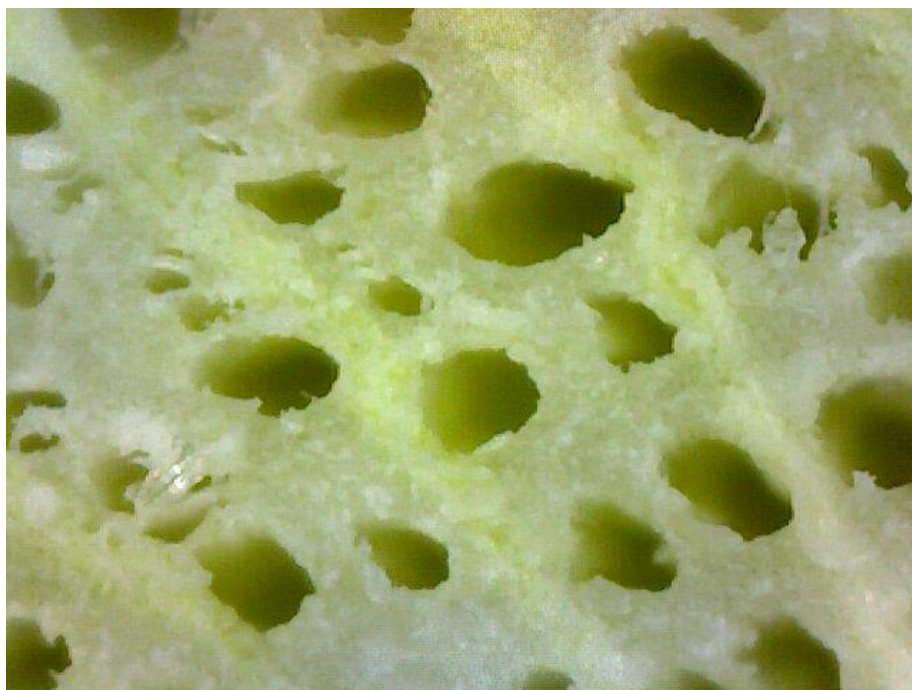


Рис. 4.1.3. Пориста структура лози винограду.

Таблиця 4.1.1

Час вакуум-інфільтрації живців винограду з різними характеристиками

Культура	Час насичення одновузлового живця, с	Час насичення двовузлового живця, с	Час насичення тривузлового живця, с
Виноград, ø 6 мм	10±2	25±5*	125±25*
Виноград, ø 9 мм	7±1	17,5±2,5*	100±20*

Примітки: * – відмінності достовірні порівняно з одновузловими живцями ($p=0,05$), $n=10$.

Час насичення одновузлових живців становив менше однієї хвилини для всіх досліджуваних концентрацій гліцерину і сахарози, а зі збільшенням бруньок на живцях розкид за часом значно збільшувався. Найвірогідніше це може бути пов'язано з відсутністю прямих провідних каналів у структурі

живця. Тому виходячи з кінетики насичення в експерименті доцільніше працювати з одновічковими живцями.

Таблиця 4.1.2

Час насичення живців винограду розчинами сахарози і гліцерину різної концентрації методом вакуум-інфільтрації

Кількість бруньок	Розчин	Концентрація, %				
		10	20	30	40	50
		Час насичення, с				
1	Сахароза	10±2	14±3	21±5	26±5	40±6
2		25±6*	35±8*	50±10*	80±15*	105±20*
3		110±15*	120±15*	140±20*	180±25*	360±50*
1	Гліцерин	8±2	10±3	13±5	20±5	25±5
2		20±5*	25±7*	35±7*	50±10*	80±20*
3		95±8*	105±15*	120±15*	150±30*	270±60*

Примітки: * - відмінності достовірні порівняно з одновузловими живцями ($p=0,05$), $n=10$.

Оцінка можливого пошкодження живців винограду методом вакуум-інфільтрації показала, що життєздатність бруньок за тестом культивування не змінювалася порівняно з контролем (рис 4.1.4, 4.1.5). Більш того, бруньки на таких живцях розвивалися на 2–4 дні раніше контрольних. Це цілком узгоджується з тим, що метод вакуум-інфільтрації дозволяє ефективно наситити живці у короткі терміни, інактивувати продукти окиснення, які були акумульовані у лозі за час зимівлі, минаючи стадію вимочування, яка, залежно від вологості зразків, складала до декількох діб [166,167].



Рис. 4.1.4. Культивування живців після процедури вакуум-інфільтрації та пасивного вимочування у живильному середовищі МС.



Рис. 4.1.5. Розвиток кореневої системи при культивуванні живців після процедури вакуум-інфільтрації.

Високий рівень життєздатності живців та ступені насичення водними середовищами, які було отримано у даному дослідженні при використанні методу вакуум-інфільтрації за допомогою розробленого пристрою, має

просте пояснення. Запропонований метод віддзеркалює та імітує природний процес з тією різницею, що у наведеному методі використовується знижений тиск для підняття рідини, а не збільшений, який створює рослина у період активного сокоруху. Знижений тиск діє лише на провідні тканини живця, які пристосовані до таких перепадів, у зв'язку з чим виражена шкідлива дія на бруньку відсутня.

4.2 Вплив різного рівня фізіологічної вологості гермплазми винограду на її життєздатність

Метою наступних досліджень було визначення впливу зміни рівня фізіологічної вологості живців на їхню життєздатність та встановлення мінімально допустимої межі зневоднення живців винограду.

Відпрацювання методики дегідратації починали з встановлення якості живців за станом зрізів, аналізу збереженості вічок у лозі (рис. 4.2.1, 4.2.2) і визначення вихідної вологості (рис. 4.2.3).

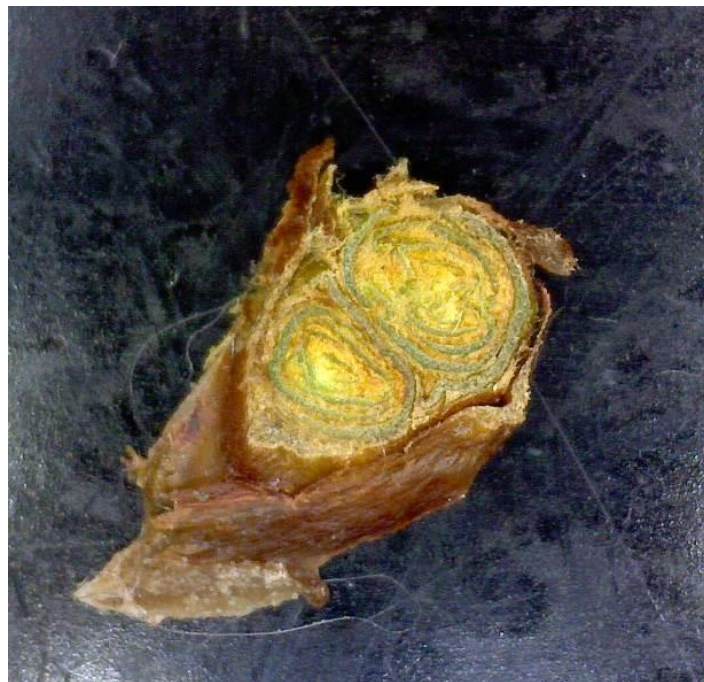


Рис. 4.2.1. Зріз бруньки у поперечному вигляді.



Рис. 4.2.2. Зріз бруньки у поздовжньому вигляді.

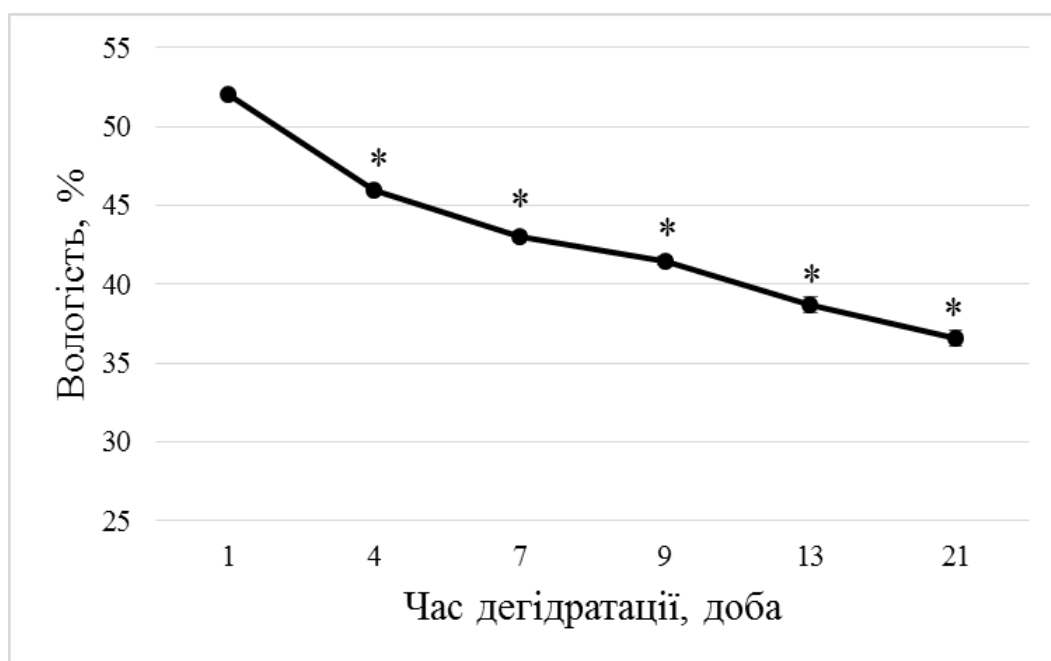


Рис. 4.2.3. Зміна вологості живців винограду з відкритими зрізами при зберіганні в умовах холодильної камери при 2°C.

Примітка: * – статистично значимі відмінності у порівнянні з контролем ($p < 0,05$), $n=10$.

Як видно з рис. 4.2.3, фізіологічна вологість (контроль) живців сорту Шевченко перед експериментом складала 52 %. Це узгоджується із

загальноприйнятою думкою, що найбільш оптимальна вологість життєздатних зразків знаходиться у межах 50–52 %. Аналіз швидкості зневоднення живців винограду при зберіганні в умовах холодильної камери за температури $+2...+4^{\circ}\text{C}$ показав, що швидкість зневоднення досить висока у перші 4 доби і становила приблизно 1,5 % на добу. У проміжку 4–9 діб швидкість дегідратації має лінійний характер і становила близько 1 % на добу. З 9-ї до 21-ї доби швидкість зневоднення продовжувала знижуватись, що, ймовірно, пояснюється проявом водоутримуючих сил клітин і досягненням мінімальної межі дегідратації, нижче якої бруньки втрачали життєздатність.

Для винограду характерним є наявність критичного рівня зневоднення, який призводить для невідомої втрати життєздатності. Було виявлено, що при зниженні вологості до 48 % життєздатність живців винограду не знижувалася, а при досягненні вологості 44 % життєздатність падала приблизно на 10 % (рис. 4.2.4). За подальшої дегідратації до 37 % і 33 % життєздатність живців падала на 20 % і 40 % відповідно.

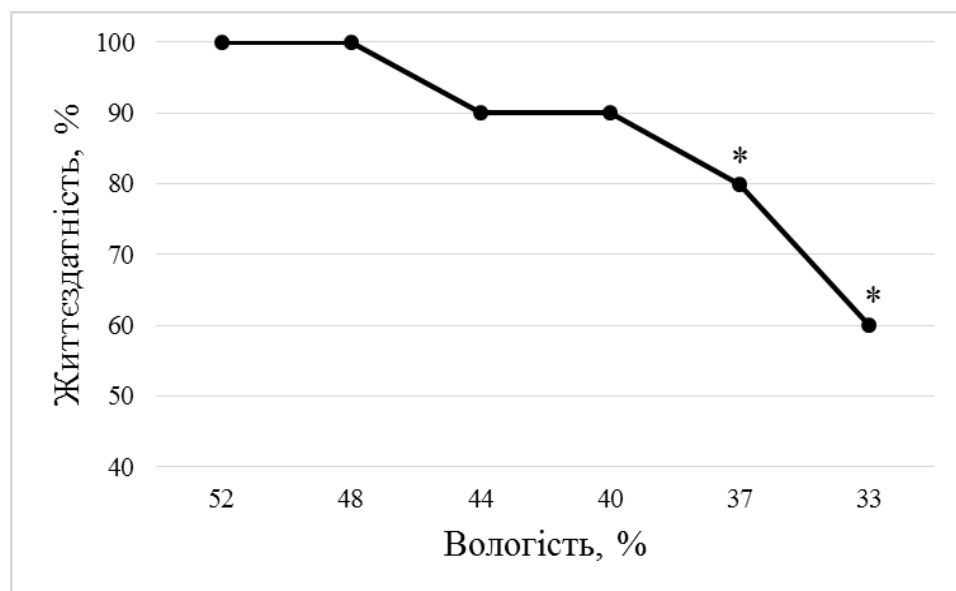


Рис. 4.2.4. Вплив дегідратації живців винограду з відкритими зрізами в умовах холодильної камери за температури 2°C на їхню життєздатність.

Примітка: * – статистично значимі відмінності у порівнянні з контролем ($p < 0,05$), $n=10$.

Таким чином, підтримка рівня вологості живців у межах 40–52 % не приводить до істотного зниження життєздатності і сприяє оптимальному обводненню живців винограду сорт Шевченко у процесі гіпотермічного зберігання.

4.3 Вплив різних способів і термінів зберігання живців винограду на зміну рівня їх фізіологічної вологості і життєздатності

Традиційно, нарізку живців проводять взимку і зберігають їх до посадки або для потреб у експерименті, що призводить до різкого зниження вологості живців і надалі виходу життєздатних саджанців. У зрізаних пагонів внаслідок капілярної провідності судин неминучі втрати вологи. Це веде до небезпечного підсихання тканини живця спочатку з поверхні зрізів, а потім всього пагону [134]. За даними літератури відзначається, що навіть незначна втрата води клітинами викликає посилення дихання і більш високі втрати вуглеводів. Таким чином, життєздатність лози значною мірою визначається станом водного режиму в ній [150]. Тому дуже важливим є вивчення впливу різних способів обробки живців винограду на рівень їхньої життєздатності і фізіологічної вологості в період гіпотермічного зберігання.

Нами протягом 9 місяців було проаналізовано 4 варіанти різних способів гіпотермічного зберігання живців винограду сорт Шевченко та їх вплив на ступінь дегідратації і рівень життєздатності (рис 4.3.1, табл. 4.3.1, рис. 4.3.2) [170].

Як видно з таблиці 4.3.1, у контрольному варіанті випаровування відбувалося швидше і до кінця травня наближалось до вологості 35 %, що збігалось з мінімально допустимим рівнем зневоднення і відповідало 50 % життєздатності матеріалу (рис. 4.3.2). У II варіанті при парафінуванні зрізів живців швидкість зневоднення була значно нижчою ніж у контролі і мінімальний рівень дегідратації досягався у липні.

У III варіанті, при повній парафінізації живців, їхня вологість була вищою, ніж у інших варіантах, протягом усіх 9 місяців дослідження гіпотермічного зберігання (табл. 4.3.1). У IV варіанті, при зниженні у процесі зберігання вологості живців до 47 % використовували метод вакуум-інфільтрації з використанням живильного середовища МС, що збільшувало вологість живців до контрольних значень.



Рис. 4.3.1. Способи підготовки живців до зберігання в умовах гіпотермії. Цифри 1, 2, 3, 4 – варіанти досліду (1 – живці з відкритими зрізами, загорнуті в поліетиленову плівку; 2 – живці з парафінованими зрізами, загорнуті в поліетиленову плівку; 3 – живці парафіновані повністю, загорнуті в поліетиленову плівку; 4 – живці з парафінованими зрізами, загорнуті в поліетиленову плівку. При зниженні рівня вологості до 47–48 % у живцях у процесі зберігання відновлювали вихідний рівень вологості методом вакуум-інфільтрації).

Парафінування живців IV варіанту досліду не відрізнялось від II варіанту. Проте у процесі зберігання при зниженні вологості живців до 48–47 % використовували метод вакуум-інфільтрації, який збільшував

вологість живців до нативного стану. Слід зазначити, що динаміка дегідратації після кожного насичення була різною. Швидкість зневоднення збільшувалася на кожному етапі зберігання після застосування методу вакуум-інфільтрації, що може свідчити про поступове виснаження запасних речовин живців у процесі зберігання, а одже і з втратою вологоутримуючих сил клітин.

Таблиця 4.3.1

Вплив різних способів та термінів зберігання на рівень вологості живців винограду

Варіанти підготовки живців	Строки зберігання, міс.									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
I (контроль)	52	50	48,5 [#]	47 [#]	45 [#]	42 [#]	40 [#]	35 [#]	31 [#]	26 [#]
II	52	51	50	49 [#]	48,5 [#]	46,5 [#]	45 [#]	41 [#]	37 [#]	32 [#]
III	52	51,8	51,3	50,9	50,5	49 [#]	48 [#]	46 [#]	42 [#]	40 [#]
IV	52	51	50	49,5	47,5 [#] - 52(BI)	50,5	50	48 [#] - 52(BI)	50	47 [#] - 52(BI)

Примітки: I – живці з відкритими зрізами, загорнуті в поліетиленову плівку; II – живці з парафінованими зрізами, загорнуті в поліетиленову плівку; III – живці парафіновані повністю, загорнуті в поліетиленову плівку; IV – живці з парафінованими зрізами, загорнуті в поліетиленову плівку. При зниженні рівня вологості до 47–48 % у живцях у процесі зберігання відновлювали вихідний рівень вологості методом вакуум-інфільтрації. BI – використання методу вакуум-інфільтрації.

– статистично значимі відмінності у порівнянні з вихідною вологістю ($p < 0,05$), $n=10$.

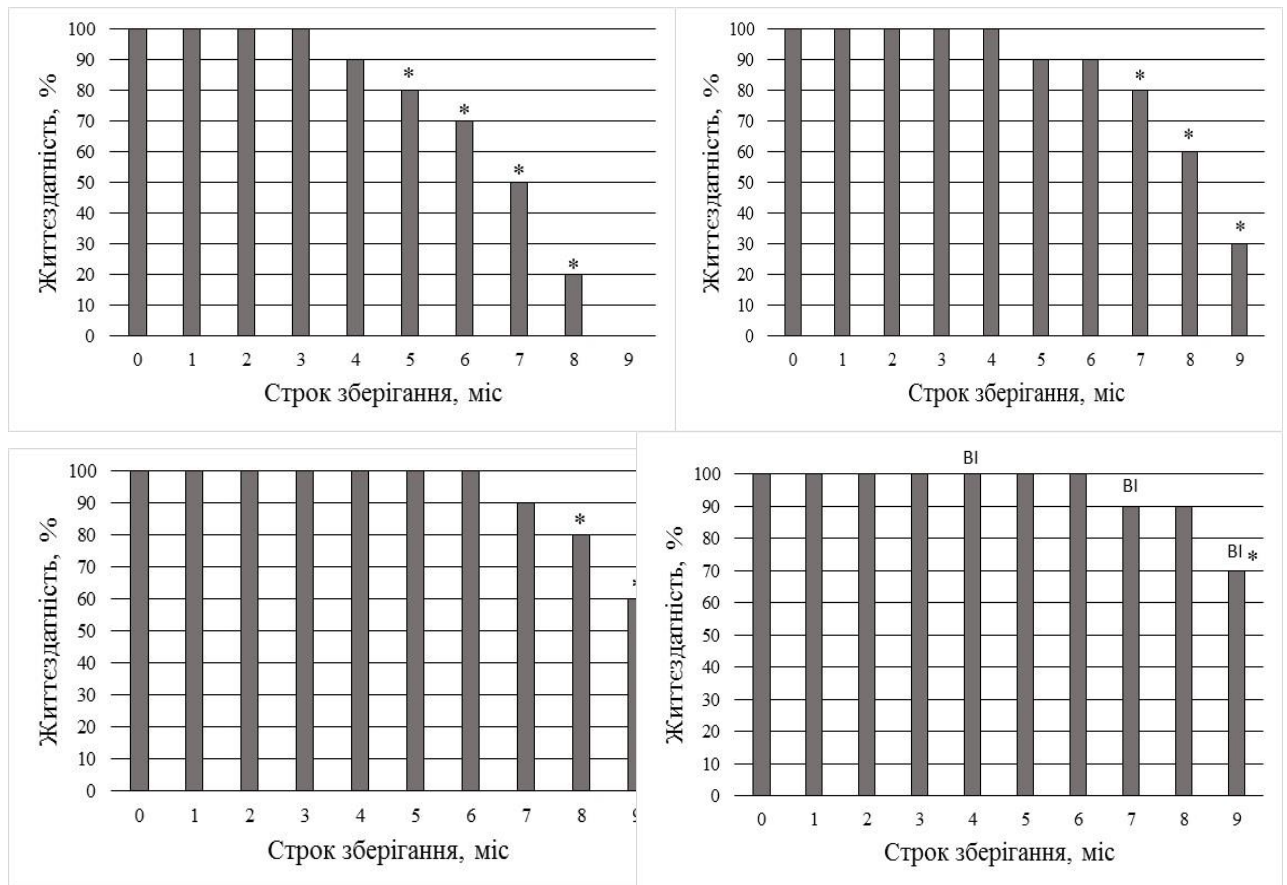


Рис. 4.3.2. Вплив строку зберігання на життєздатність живців винограду при різних варіантах підготовки живців.

Примітки: I – живці з відкритими зрізами, загорнуті в поліетиленову плівку; II – живці з парафінованими зрізами, загорнуті в поліетиленову плівку; III – живці парафіновані повністю, загорнуті в поліетиленову плівку; IV – живці з парафінованими зрізами, загорнуті в поліетиленову плівку. При зниженні рівня вологості до 47–48 % у живцях у процесі зберігання відновлювали вихідний рівень вологості методом вакуум-інфільтрації (BI).

* – статистично значимі відмінності порівняно до контролю ($p < 0,05$), $n=10$.

Найбільш перспективний спосіб зберігання експериментального матеріалу був показаний при використанні живців з парафінованими зрізами із застосуванням методу вакуум-інфільтрації. При зниженні вологості досліджуваних зразків до 47-48 % у процесі зберігання методом вакуум-

інфільтрації відновлювали рівень вологості до нативної позначки. Але навіть у даному варіанті досліджу життєздатність живців при тривалому зберіганні не відновлювалася повністю і до кінця зберігання становила 70 %. Можливо життєздатність живців винограду у IV варіанті можна було б підвищити використовуючи середовища, які відновлюють не тільки рівень вологості та мінеральних речовин, але і інактивують продукти окиснення з привнесенням пластичних речовин вуглеводного ряду.

При використанні підходів при гіпотермічному зберіганні, які дають достатні рівні збереженої вологості і високу життєздатність, можливе подальше використання живців винограду, для пророщування, окулірування або подальшого низькотемпературного консервування. Оскільки не завжди вдається одразу обробити зразки, їх утримання може тимчасово відбуватися в умовах гіпотермії. Це, зазвичай, дозволяє зберігати холодостійкість і життєздатність бруньок протягом декількох місяців. Відоме успішне кріоконсервування пагонів яблуні після 8 місяців зберігання у стані гіпотермії, але життєздатність пагонів черешні знижувалася після 4–6 місяців гіпотермічного зберігання.

Таким чином, у роботі досліджено вплив дегідратації живців винограду з відкритими зрізами в умовах холодильної камери за температури 2 °C на їхню життєздатність. Це дозволило встановити межу зневоднення живців винограду сорт Шевченко, яка склала приблизно 40 % вологості, при якій життєздатність вірогідно не змінювалась.

Запропоновано і апробовано спосіб насичення рослинних об'єктів трубчасто-капілярної структури методом вакуум-інфільтрації і доведена його висока ефективність. Визначено оптимальні параметри тиску необхідного для насичення живців винограду з відкритими зрізами, який становить близько 70 кПа.

Встановлено, що час насичення одновузлових живців становив менше однієї хвилини для всіх досліджуваних концентрацій гліцерину і сахарози, а зі збільшенням бруньок на живцях розкид за часом значно збільшувався.

Найвірогідніше це може бути пов'язано з відсутністю прямих провідних каналів у структурі живця.

Визначено вплив різних способів і термінів зберігання на зміну рівня вологості і життєздатності живців винограду, запропоновані ефективні способи гіпотермічного зберігання живців винограду. Зберігання живців шляхом відновлення початкової вологості методом вакуум-інфільтрації виявилось найбільш ефективним як для тривалого зберігання в умовах гіпотермії, так і для тимчасового утримання перед експериментом.

Результати проведених в роботі досліджень дозволяють рекомендувати метод вакуум-інфільтрації: для прискореного насичення прищепної частини стимулюючими середовищами; для скорочення більш ніж в 10 разів часу насичення і видалення середовища за рахунок витіснення іншим середовищем з об'єктів, які мають трубчасто-капілярну структуру, в різних біотехнологічних процесах; для відновлення початкової вологості живців у процесі зберігання, що дозволяє виключити стадію вимочування живців, а отже і знизити можливість перенесення вірусних інфекцій від інфікованих живців до здорових.

За матеріалами розділу 4 опубліковано роботи [166-169, 183].

РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ САХАРОЗИ НА ГЕРМПЛАЗМУ ВИНОГРАДУ В УМОВАХ ДЕГІДРАТАЦІЇ

Існуючі підходи до розробки методів кріоконсервування живців плодово-ягідних культур традиційно обмежуються комбінуванням факторів, таких як: холодова адаптація, терміни і ступінь дегідратації, варіювання швидкостей охолодження-відігрівання і майже не розглядають насичення кріопротекторами.

Метою даного розділу роботи стало визначення оптимальних концентрацій сахарози, а також вивчення різних методичних підходів до попередньої обробки живців винограду розчинами сахарози різних концентрацій.

5.1 Вплив розчинів сахарози на життєздатність живців винограду насичених методом вакуум-інфільтрації

Розчини сахарози є одним з найчастіших середовищ прекультивування перед кріоконсервуванням рослинних експлантів. У роботі було досліджено вплив концентрації сахарози на рівень життєздатності живців винограду при насиченні методом вакуум-інфільтрації. Експеримент включав 3 групи живців винограду сорт Шевченко з фізіологічним рівнем вологості 50–52 %, які насичували розчинами сахарози 0,25 М, 0,5 М, 0,75 М, 1,0 М, 1,25 М, 1,5 М. Як контроль використовували живці винограду, які насичували живильним середовищем МС методом вакуум-інфільтрації.

Як видно з рис. 5.1.1, життєздатність зразків насичених розчинами сахарози до 1 М методом вакуум-інфільтрації з наступною експозицією протягом 1 доби в розчині тієї ж концентрації становила 100%. У зразках,

насичених розчинами сахарози більшої концентрації, життєздатність знижувалася, що може бути пов'язано з проявом токсичного ефекту.

Високий рівень життєздатних бруньок відзначався після 2-добової експозиції насичених розчинами 0,75 М сахарози. Більш високі концентрації приводили до зниження енергії проростання і відсотка життєздатних експлантів. Після 3-добової експозиції оптимальні концентрації сахарози становили 0,25 М і 0,5 М, у той час як більш високі концентрації зменшували кількість життєздатних живців (рис. 5.1.1).

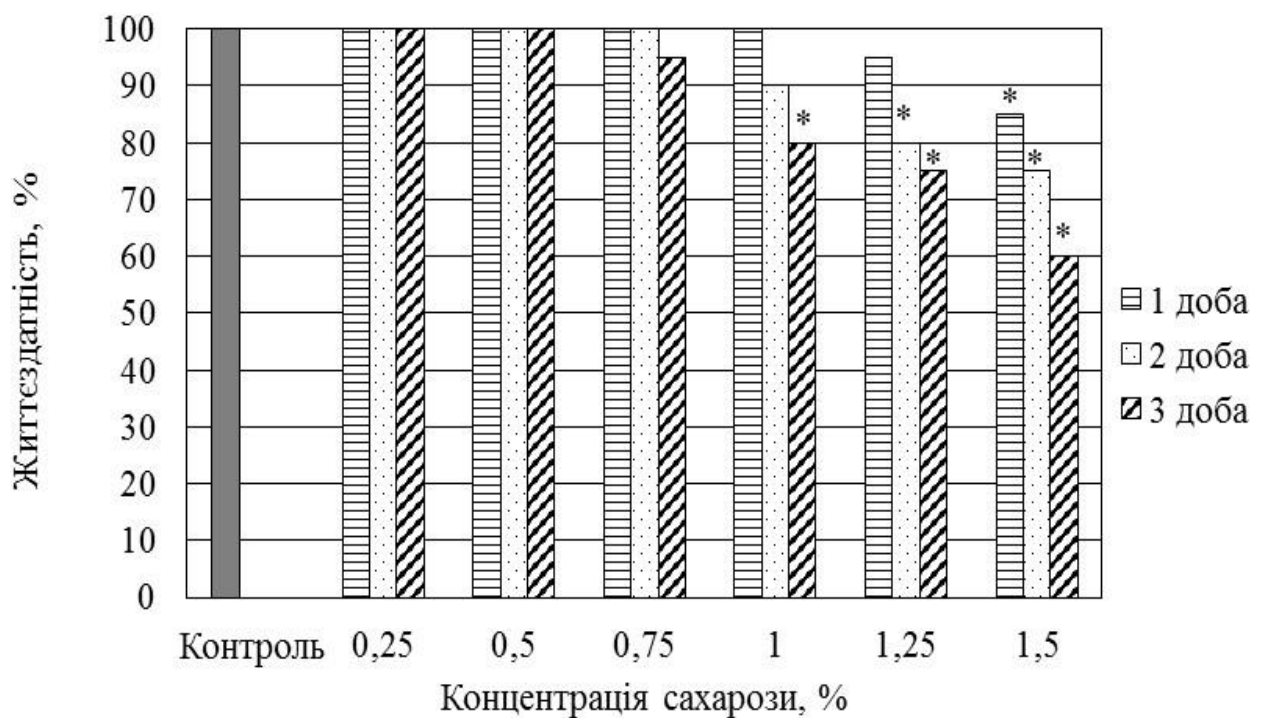


Рис. 5.1.1. Життєздатність живців винограду після насичення розчинами сахарози різної концентрації методом вакуум-інфільтрації і різним часом експозиції в середовищі такої ж концентрації.

Примітки: * – статистично достовірні відмінності у порівнянні з контролем ($p=0.05$), $n=20$.

Експеримент показав, що зі зростанням концентрації вивчених розчинів сахарози після насичення бруньок винограду і часу експозиції, час пробудження бруньок збільшувався до 5 разів у порівнянні з контрольною

групою (табл. 5.1.1). Можливо вплив сахарози виявляється у подовженні стану спокою досліджуваних зразків. Це допущення було нами враховано у подальших дослідженнях з кріоконсервування.

Таблиця 5.1.1

Початок набрякання бруньок після насичення живців винограду розчинами сахарози різної концентрації методом вакуум-інфільтрації з різним часом експозиції в середовищі такої ж концентрації

Концентрація сахарози, М	Експозиція, доба		
	1	2	3
Контроль	$6,5 \pm 0,5$	--	--
0,25	7 ± 1	7 ± 1	$7,5 \pm 0,5$
0,5	$9,5 \pm 1,5$	$10 \pm 1^*$	$11 \pm 1^*$
0,75	$11 \pm 1^*$	$14 \pm 2^*$	$14,5 \pm 1,5^*$
1,0	$14 \pm 2^*$	$16 \pm 2^*$	$16,5 \pm 1,5^*$
1,25	$18 \pm 2^*$	$22 \pm 2^*$	$23 \pm 3^*$
1,5	$22 \pm 2^*$	$24,5 \pm 1,5$	$26,5 \pm 1,5^*$

Примітка: * – статистично значимі відмінності у порівнянні з контролем ($p < 0,05$), $n=20$.

5.2 Визначення захисної дії сахарози на живці винограду в умовах дегідратації

Експеримент включав три групи живців винограду сорту Шевченко з різним рівнем вологості 50–52 (контроль), 39–42, 30–33 % з подальшим насиченням розчинами сахарози 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 М методом вакуум-інфільтрації. За контроль слугували живці з фізіологічним рівнем вологості (50–52%, перша група), які було насичено живильним середовищем МС. Як

видно з таблиці 5.2.1, життєздатність зразків з (вихідною) вологістю 51 ± 1.5 , насичених сахарозою, не змінювалась в залежності від концентрації сахарози і становила 100 %. Це може свідчити про відсутність вираженої токсичної дії сахарози в діапазоні концентрацій 0,1–0,7 М на живці винограду з вологістю ~ 50 %.

Таблиця 5.2.1

Оцінка життєздатності бруньок винограду в залежності від рівня вологості і насичення розчинами сахарози різної концентрації

Вологість живців	МС	Сахароза 0.1 М+МС	Сахароза 0.3 М+МС	Сахароза 0.5 М+МС	Сахароза 0.7 М+МС
%	Життєздатність, %				
51 ± 1.5	100	100	100	100	100
40.5 ± 1.5	90	80*	80*	100	100
31.5 ± 1.5	60*	80*	60*	60*	60*

Примітка: * – статистично значимі відмінності у порівнянні з контролем ($p < 0,05$), $n=10$.

Для живців з вихідною вологістю 40.5 ± 1.5 % (другий варіант експерименту) життєздатність бруньок зростала зі збільшенням концентрації сахарози. Це може демонструвати захисну дію сахарози при дегідратації живців у межах ~ 40 % вологості і нижче.

У третьому варіанті експерименту, де вологість зразків становила близько 30 %, сахароза не чинила захисної дії після зневоднення, а прийнятний відсоток життєздатності показано лише у контролі і у групі оброблення 0,1 М розчином сахарози. Зниження життєздатності бруньок у зразках, оброблених розчинами сахарози в концентраціях 0,3–0,7 М, імовірно

пов'язано з додатковим зневодненням, яке знижує реальну вологість в живцях ще нижче заявленої.

Передобробка - виключно необхідний етап при кріозбереженні, вона є критично важливою процедурою для виживання тканин рослин при кріоконсервуванні, тому що кріопротектори самі по собі не можуть захистити необроблені клітини або тканини для збереження високого відсотка життєздатності. Передобробка використовується для того, щоб рослини витримували обробку кріопротекторами і процедуру заморожування і розморожування [82].

Метою передобробки є поступове зневоднення клітин до введення високо концентрованих і часто токсичних кріопротекторів. Зневоднення можна проводити різними способами: висушуванням стерильним потоком повітря або використанням речовин, що висушують. Успішне кріоконсервування рослинних тканин і меристем отримано при використанні передобробки у 2 М гліцерину та у 0,4–0,6 М сахарози протягом 20 хв при кімнатній температурі [53].

Є дані про визначення оптимальної концентрації сахарози у середовищі для попередньої обробки меристем груші. Молярність сахарози в дослідях варіювала від 0,1 до 0,5 М [136].

Попереднє культивування меристем, отриманих з рослин, вирощених *in vitro* на твердому середовищі з 0,3–0,7 М сахарозою протягом 1-2 днів, було дуже ефективним для поліпшення відростання кріоконсервованих меристем [15, 66]. Під час прекультивування, концентрація сахарози в рослинах значно збільшується [75, 101]. Дослідники виявили, що попереднє культивування виділених меристем на поживних середовищах, збагачених сахарозою (0,3–0,7 М), сприяє накопиченню цукрів, які збільшують стабілізацію мембран в умовах сильної дегідратації [14].

Дослідники з'ясували, що попередня обробка сахарозою протягом 14 днів при адаптації до холоду призводить до ще більшого ефекту витривалості до холоду рослин малини, ніж постійна температура + 4 °C [68]. Спочатку

вважали, що сахари мають осмотичний ефект тільки зовні клітини, але зараз відомо, що сахароза та інші дисахариди проникають в клітини і стабілізують протеїни і мембрани під час дегідратації.

При кріоконсервуванні культивованих клітин тютюну за допомогою вітрифікації було чітко продемонстровано, що розвиток толерантності до PVS2 у клітинах тютюну під час попереднього культивування у 0,3 М розчині манітолу протягом 1 дня пояснюється реакцією клітин на легкий осмотичний стрес [83]. Під час попереднього культивування відбувається вироблення абсцизової кислоти, проліну та деяких білків, а також поглинання манітолу.

Попереднє культивування меристем плодових культур у розчинах сахарози після холодової акліматизації було ефективним для отримання високих рівнів формування пагонів [66, 82, 87, 93].

Метод вітрифікації успішно застосовували до холоднокліматичних та попередньо культивованих меристем деревних рослин, вирощених *in vitro*. Холодова адаптація при температурі 5 °C протягом 3 тижнів з 8-годинним фотоперіодом значно покращила відновлення меристем яблуні, груші та шовковиці, охолоджених до -196 °C за допомогою вітрифікації [87, 93].

Таким чином, у деревних рослин помірного клімату попереднє культивування після холодової адаптації є необхідним етапом у забезпеченні високого рівня формування пагонів.

У деяких тропічних рослин попереднє культивування меристем на середовищі, збагаченому сахарозою, було дуже важливе для отримання високого проростання після кріоконсервації [21]. Було продемонстровано, що меристеми після попереднього культивування на середовищі МС з додаванням сахарози та подальшого кріоконсервування методом вітрифікації, давали майже 100 % відновлення росту пагонів [95]. Те саме попереднє культивування було успішно застосовано до меристем банана, відростання його меристем, охолоджених до -196 °C, становило 60–80 %.

Таким чином, попереднє культивування є додатковим перспективним етапом, який слід включити в процедуру вітрифікації деяких тропічних рослин. Ця процедура вітрифікації, з невеликими змінами, була успішно застосована Thinh N.T. [95] до приблизно 20 тропічних однодольних рослин.

Дуже цікаво відзначити, що одна і та ж процедура вітрифікації із невеликими змінами може застосовуватися до широкого кола тропічних рослин з декількох родів та сімейств.

Таким чином, у розділі роботи було визначено діапазон оптимальних робочих концентрацій сахарози для насичення бруньок винограду у стані спокою, який становив 0,1 – 0,7 М.

Досліджено життєздатність бруньок і терміни їх пророщування після насичення розчинами сахарози різних концентрацій методом вакуум-інфільтрації з різним часом експозиції.

Оцінена життєздатність живців винограду в залежності від рівня вологості і насичення розчинами сахарози різної концентрації методом вакуум-інфільтрації.

За матеріалами розділу 5 опубліковано роботи [78, 167-170, 177, 183].

РОЗДІЛ 6

КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ІЗОЛЬОВАНИХ СПЛЯЧИХ БРУНЬОК ВИНОГРАДУ

6.1 Насичення бруньок винограду методом вакуум-інфільтрації

Тривале зберігання вегетативних частин рослин можливе тільки в умовах кріобанків, а для їх успішного кріоконсервування необхідне якісне насичення кріозахисними середовищами [43]. У зв'язку з великою кількістю різноманітних каналів та порожнин з повітрям у бруньках винограду, насичення їх кріозахисними речовинами для подальшого кріоконсервування є надзвичайно складним процесом [162].

На даний час розроблено низка кріозахисних середовищ для кріоконсервування рослин, яким дали назву PVS [87]. Але ефективних способів насичення ізольованих бруньок винограду кріозахисними середовищами PVS немає.

Існують різні способи насичення рослинних експлантів фізіологічними та кріозахисними середовищами. Традиційні способи насичення, як правило, однотипні і здійснюються за рахунок поступового дифузійного розподілу рідини тканинами експланта [177]. Відомі способи пасивного насичення невеликих рослинних зразків кріозахисними середовищами PVS [46, 54, 85, 91, 104] для подальшого консервування методом вітрифікації з охолодженням у рідкому азоті. Такі способи ґрунтуються на інкубації рослинного зразка протягом від 15 хвилин до 2 годин у концентрованому кріозахисному середовищі за температурою 0 °С або 25 °С. Але зі збільшенням розміру рослинних об'єктів потрібно збільшувати час їх інкубації у кріозахисному розчині для забезпечення проникнення достатньої кількості кріопротекторів у рослинні тканини і рівномірності їх розподілення. Тому метод пасивного вимочування не є прийнятним для бруньок винограду, оскільки тривалий контакт з концентрованими

кріозахисними розчинами призведе до загибелі поверхневого шару клітин бруньок, в той час як їх внутрішні шари залишаться ненасиченими через значний об'єм та гетерогенність бруньок.

Останнім часом набуває популярності інноваційний спосіб насичення меристем рослин кріозахисними середовищами PVS методом вакуум-інфільтрації [27, 65]. Насичені таким методом рослинні експланти зазвичай кріоконсервують з застосуванням вітрифікації, тому метод кріоконсервування отримав назву VIV (vacuum infiltration vitrification). Метод насичення розчинами PVS полягає в створенні зниженого тиску (50–80 кПа) під час інкубації меристем в середовищах PVS при 0 °C або 25 °C до 5 хвилин. Зниження тиску дозволяє прискорити процес насичення ембріональних тканин і знизити час інкубації у кріозахисному середовищі. Однак метод вакуум-інфільтрації ще не застосовувався для таких складних об'єктів, як бруньки винограду, які є великими за розміром, гетерогенними зразками з великою кількістю повітряних каналів і порожнин. Для насичення рослинних культур такого типу потрібна більш тривала інкубація у кріозахисному середовищі для забезпечення проникнення його достатньої кількості і рівномірного розподілення у тканинах бруньок.

У даній роботі поставлено за мету удосконалити відомий спосіб насичення меристем рослин кріозахисними середовищами PVS таким чином, щоб забезпечити можливість ефективного насичення ізольованих бруньок винограду. Дослідження з модифікації методу вакуум-інфільтрації здійснювали на прикладі бруньок винограду Руський Конкорд.

В даній роботі, враховуючи особливості будови бруньок, до відомих етапів вакуум-інфільтрації було додано етап дегазації бруньок і кріозахисного середовища за тиску 20 кПа протягом 3–5 хв. Попередня дегація бруньок і кріозахисного середовища дозволяє зменшити концентрацію розчинених газів повітря у кріозахисному середовищі та звільнити канали та порожнини бруньок від повітря, полегшуючи подальше насичення тканин бруньок кріозахисними середовищами [78, 162]. Було

також знижено тиск нижче величин, відомих з даних літератури, та збільшення часу інкубації бруньок у розчині за зниженого тиску. Підвищення тиску до атмосферного здійснювали поступово протягом 2–2,5 хв для уникнення додаткових механічних пошкоджень бруньок.

Кріозахисні середовища PVS є прозорими, що ускладнює оцінку глибини проникнення речовин із розчину і рівномірності їх розподілення у різних шарах бруньок винограду. Тому для оцінки даних параметрів на першому етапі проводили інкубацію бруньок з барвниками (0,8 г/л еозину; 0,5 г/л флуоресцеїн натрію). Глибину проникнення еозину оцінювали візуально на зрізах бруньок. Розподілення флуоресцеїну натрію у тканинах бруньок винограду при використанні вакуум-інфільтрації спостерігали методом конфокальної флуоресцентної мікроскопії. Життєздатність бруньок винограду оцінювали після насичення їх PVS2 за їх набряканням в умовах фітотрону (рис. 6.1.1).



Рис. 6.1.1. Оцінка життєздатності бруньок винограду за їх набряканням в умовах фітотрону.

Виявлено, що після насичення бруньок винограду розчином PVS2 при тиску під час інкубації 80 та 40 кПа життєздатність бруньок становить 94 та

87 %, відповідно (табл. 6.1.1). Зниження тиску до 20 кПа призводить до достовірного зниження життєздатності бруньок.

Таблиця 6.1.1

Вплив тиску при насиченні бруньок винограду методом вакуум-інфільтрації розчином PVS2 на життєздатність бруньок з оцінкою забарвлення тканин еозином

Параметри оцінки		Тиск, кПа		
		80	40	20
Життєздатність, %		94±5	87±9	18±5*
Шари бруньок	Меристемальна тканина	Не забарвлена	Забарвлена	Забарвлена
	Примордіальні листки	Забарвлені	Забарвлені	Забарвлені

Примітка: * – достовірна відмінність по відношенню до тиску 80 та 40 кПа ($p=0.05$), $n=6$.

Оцінка проникнення барвника у різні шари бруньок винограду під час їх інкубації при різному тиску показала, що, якщо насичення бруньок здійснюється за тиском 80 кПа, барвник еозин проникає тільки у зовнішні примордіальні листки, а центральна частина бруньок залишається ненасиченою барвником. При тиску 20 та 40 кПа рівномірно забарвлюються усі шари бруньок (табл. 6.1.1).

Таким чином, тиск 80 кПа дозволяє отримати високу життєздатність бруньок після насичення, але він є недостатнім для проникнення речовин у внутрішні меристемальні тканини бруньок. Інкубація бруньок при тиску 40 кПа забезпечує високу життєздатність бруньок після насичення, а речовини з

розчину проникають у всі їх шари. Зниження тиску до 20 кПа призводить до достовірного зниження життєздатності бруньок.

Для визначення оптимального часу, необхідного для рівномірного розподілення речовин в усіх шарах бруньок винограду проводили інкубацію бруньок в умовах зниженого тиску з барвником еозином протягом 5, 15, 20 або 30 хв. Виявлено, що за 5 хв барвник проникає тільки у зовнішні примордіальні листки, а за 15–20 хв рівномірно профарбовуються усі шари бруньок (табл. 6.1.2). Збільшення часу інкубації до 30 хв не призводить до змін якості насичення бруньок. Таким чином 15-20 хв є часом, необхідним і достатнім для рівномірного розподілення речовин в усіх шарах бруньок.

Таблиця 6.1.2

Вплив часу інкубації бруньок винограду (40 кПа) у розчині еозину при насиченні методом вакуум-інфільтрації на їх забарвлення (n=3)

Шари бруньок	Час інкубації, хв			
	5	15	20	30
Меристемальна тканина	Не забарвлена	Забарвлена	Забарвлена	Забарвлена
Примордіальні листки	Забарвлені	Забарвлені	Забарвлені	Забарвлені

Для оцінки важливості етапу дегазації проводили насичення бруньок винограду барвником еозином з етапом дегазації і без нього. Далі порівнювали глибину проникнення барвника у шари бруньок. Виявлено, що етап дегазації сприяє насиченню усіх шарів бруньок (табл. 6.1.3).

Таблиця 6.1.3

Вплив етапу дегазації на забарвлення бруньок винограду розчином еозину шляхом насиченням методом вакуум-інфільтрації (n=3)

Шари бруньок	З дегазацією	Без дегазації
Меристемальна тканина	Забарвлена	Не забарвлена
Примордіальні листки	Забарвлені	Забарвлені

Рівномірний розподіл барвника після процедури вакуум-інфільтрації з етапом дегазації на зрізах бруньок винограду також було продемонстровано у даній роботі методом флуоресцентної мікроскопії із застосуванням флуоресцеїну натрію з фільтром емісії 505–526 нм (рис. 6.1.2).

Отримані дані доказують важливість етапу дегазації при використанні методу вакуум-інфільтрації для бруньок, оскільки навіть розчин з низьким рівнем в'язкості (розчин барвника) не проникає за 15–20 хв усередину бруньок, а розчини PVS мають високу в'язкість, що значно ускладнює насичення. При застосуванні зниженого тиску під час інкубації бруньок у кріозахисному середовищі без попередньої дегазації повітря, яке міститься у порожнинах і каналах бруньок, не може вільно виходити з них через велику в'язкість кріозахисних середовищ PVS, що перешкоджає їх проникненню всередину бруньок.

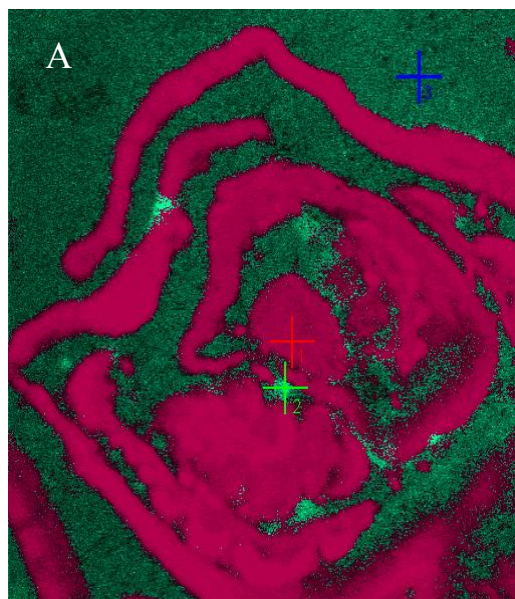
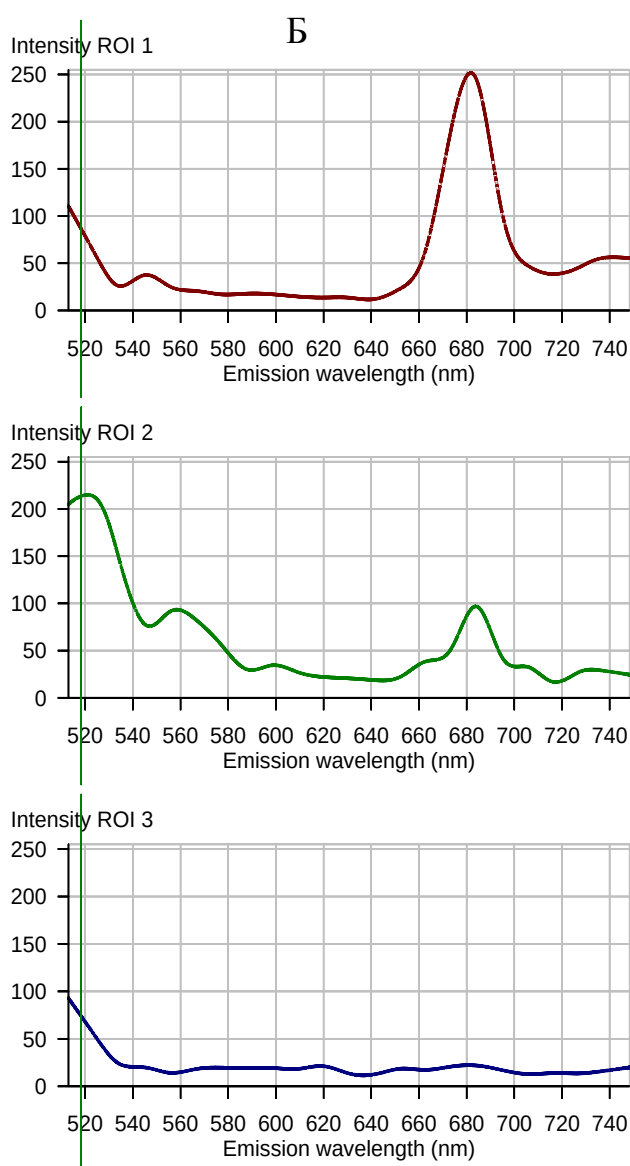


Рис. 6.1.2. Флуоресцентне зображення (А) та спектри флуоресценції (Б) зрізу бруньки винограду, яку насичено розчином флуоресцеїну натрію методом вакуум-інфільтрації.

Таким чином, у роботі було удосконалено метод вакуум-інфільтрації шляхом додавання етапу дегазації, збільшення часу інкубації до 15–20 хв, зниження тиску до 35–40 кПа та більш повільним підвищенням тиску до атмосферного протягом 2–2,5 хв, що дозволило більш ефективно насичувати ізолювані бруньки винограду.

6.2 Низькотемпературні фазові переходи і склування у розчинах PVS

На даний час розроблено ряд сучасних технологій кріоконсервування для збереження гермплазми рослин [43, 77, 97, 102, 182]. До них відносяться вітрифікація, інкапсуляція, дегідратація, контрольована швидкість охолодження. В основному при кріоконсервації рослинних об'єктів застосовуються два методи охолодження. Перший – контрольоване повільне охолодження, передбачає швидкість охолодження не надто повільну, щоб клітини не занадто зневоднилися, але не занадто швидко, щоб утворився внутрішньоклітинний лід. Другий, більш простий для практичного використання, передбачає максимально високі швидкості охолодження, які досягаються, звичайно, зануренням зразків безпосередньо у рідкий азот, і високі концентрації кріопротекторів для запобігання внутрішньоклітинної кристалізації [46, 102, 178]. Як правило, середовища PVS мають високу токсичність для рослинних експлантів, тому слід враховувати час насичення, структуру та розмір об'єкта, температуру насичення та концентрацію PVS, щоб зменшити шкідливий вплив.

В даний час продовжуються модифікації складу PVS для різних рослин, а також розробка нових комбінованих розчинів [47, 107, 108]. Розведення PVS водою є одним із підходів для уникнення вираженої токсичності для рослинних експлантів [67]. Ці водні розчини можуть забезпечити насичення кріопротекторами великих рослинних об'єктів при кімнатній температурі протягом більш тривалого часу, забезпечуючи тим самим краще проникнення кріопротектора в рослинні клітини без порушення життєздатності.

Завдяки високій концентрації кріозахисних речовин в їх складі, при високих швидкостях охолодження розчини PVS не кристалізуються, а при досягненні певної температури переходять у твердоаморфний стан. Однак відсутність кристалізації на етапі охолодження не виключає її розвитку при

нагріванні вище температури склування. Розвитком кристалізації після розсклування, її температурою і інтенсивністю теплового ефекту характеризують стабільність аморфного стану кріозахисних розчинів [3, 4, 5, 108, 163].

При кріоконсервуванні методом вітрифікації досягнення стабільного склоподібного стану і уникнення утворення льоду – два критичні чинники для успішного розвитку технологій забезпечення виживання кріоконсервованої зародкової плазми. Розвитку кріоінженерних технологій сприяють біофізичні дослідження, які допомагають забезпечити стабільність скла при кріоконсервації [114, 165].

Метою даного дослідження була оцінка методом ДСК здатності до склування та стабільності аморфного стану концентрованих і розведених розчинів серії PVS. У роботі були досліджені фазові переходи і склування кріозахисних розчинів найбільш перспективних для кріоконсервування бруньок винограду: PVS1, PVS2, PVS3, PVS4 і PVSN [107].

На ДСК-термограмах розчинів PVS1, PVS2 і PVS3 (рис. 6.2.1, табл. 6.2.1), отриманих на етапі нагріву, був зареєстрований тільки стрибок теплопоглинання (1) при температурі T_g (табл. 6.2.1), пов'язаний з розсклуванням зразка, тобто переходом з твердоаморфного стану у стан переохолодженої рідини. Ніяких екзо- або ендотермічних піків зареєстровано не було, що свідчить про відсутність кристалізації, як на етапі охолодження, так і на етапі нагріву. Це говорить про те, що розчини PVS1, PVS2 і PVS3 на етапі охолодження повністю переходять у склоподібний стан, причому з високою стабільністю аморфної фази, яка навіть протягом повільного нагріву вище температури розсклування не кристалізується.

На термограмах розчинів PVS4 та PVSN крім розсклування було зареєстровано екзотермічний пік кристалізації (2) і ендотермічний пік плавлення (3) (рис. 6.2.1, табл. 6.2.1). У розчині PVS4 спостерігається суперпозиція піків: кристалізація ($T_c = -64\text{ }^{\circ}\text{C}$) не встигає повністю завершитися і починається розвиток процесу плавлення ($T_m = -50,5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

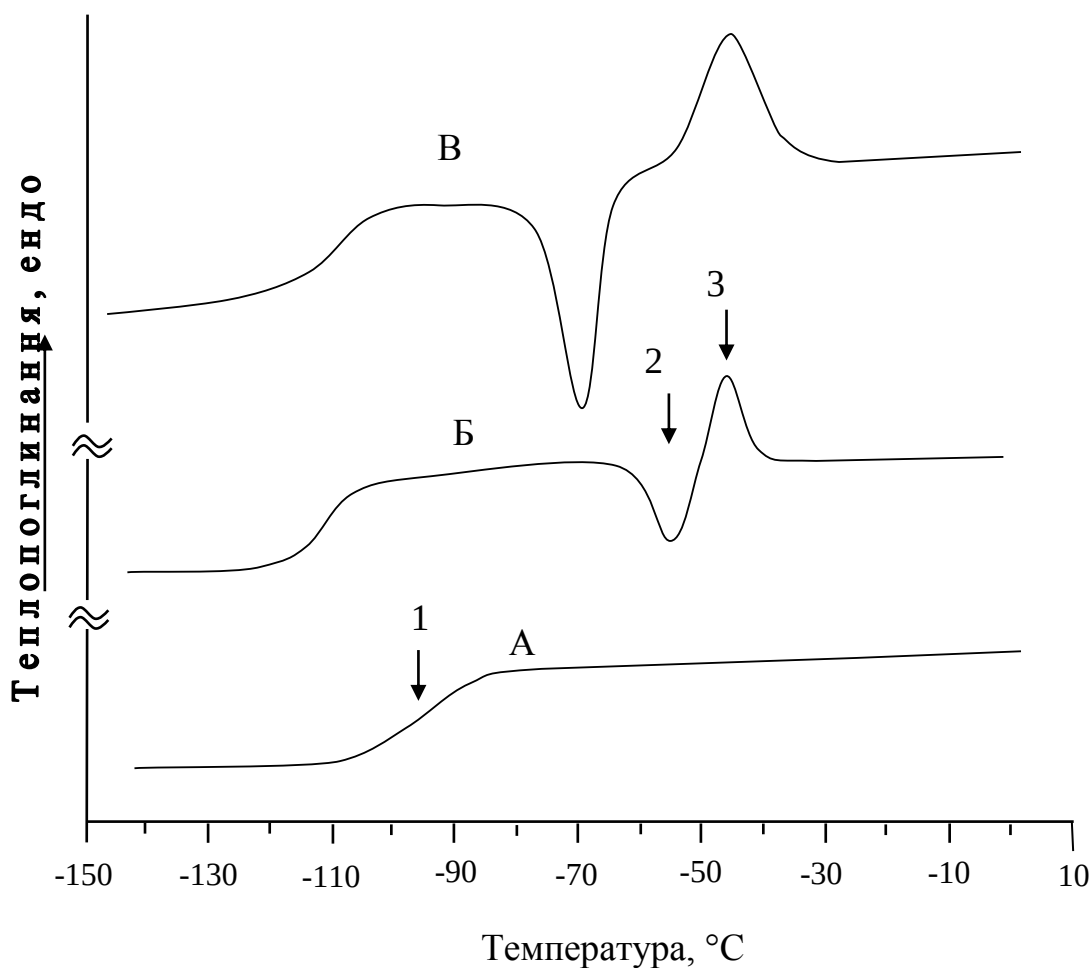


Рис. 6.2.1. ДСК-термограми розчинів PVS: А – PVS3; Б – PVS4; В – PVSН. 1 – розклування; 2 – кристалізація; 3 – плавлення.

Слід відмітити, що і для PVS4, і для PVSН площі під піками кристалізації та плавлення достовірно не відрізняються (рис. 6.2.2). Це свідчить про те, що розвиток кристалізації відбувається тільки на етапі нагріву. Те, що теплові ефекти кристалізації і плавлення у розчині PVSН у 2,8 разів більші, ніж у PVS4, говорить про те, що на етапі нагріву у зразку PVSН кристалічної фази встигає розвинути значно більше. Крім цього на рис. 6.2.1 і табл. 6.2.1 можна бачити, що температурний інтервал між розклуванням зразка і розвитком кристалізації із рідкої фази, що з'явилась, у розчині PVS4 істотно більший. Так, різниця між температурою склування і температурою кристалізації розчину PVS4 складає 47,5, а для PVSН – 39,1

градусів, що свідчить про більшу стабільність аморфної фази розчину PVS4. Імовірно, заміщення інших кріозахисних компонентів сахарозою в PVSН [107] негативно впливає на стабільність аморфного стану кріозахисного розчину.

Таблиця 6.2.1

Температури фазових переходів і склування у концентрованих і розведених розчинах PVS

Зразок	T_g , °C	T_c , °C	T_m , °C
PVS1	$-109,0 \pm 0,5$	—	—
80 % PVS1	$-116,2 \pm 0,5$	$-72,0 \pm 0,5$	$-45,7 \pm 0,5$
PVS2	$-115,3 \pm 0,5$	—	—
80 % PVS2	$-123,0 \pm 0,5$	$-114,3 \pm 0,5$	$-37,4 \pm 0,5$
PVS3	$-93,9 \pm 0,5^*$	—	—
80 % PVS3	$-105 \pm 0,5$	$-56,2 \pm 0,5$	$-40,8 \pm 0,5$
60 % PVS3	$-106,2 \pm 0,5$	$-107 \pm 0,5$	$-28,7 \pm 0,5$
PVS4	$-111,5 \pm 0,5$	$-64,0 \pm 0,5^\#$	$-50,5 \pm 0,5$
80 % PVS4	$-117,4 \pm 0,5$	$-103 \pm 0,5$	$-43,9 \pm 0,5$
PVSН	$-110,0 \pm 0,5$	$-70,9 \pm 0,5$	$-50,0 \pm 0,5$
80 % PVSН	$-117,2 \pm 0,5$	$-107,9 \pm 0,5$	$-37,9 \pm 0,5$

Примітки: T_g – температура склування, T_c – температура кристалізації при нагріві, T_m – температура плавлення.

* – статистично достовірні відмінності у порівнянні з іншими PVS ($p=0.05$), $n=5$; # – статистично достовірні відмінності у порівнянні з PVSН ($p=0.05$), $n=5$.

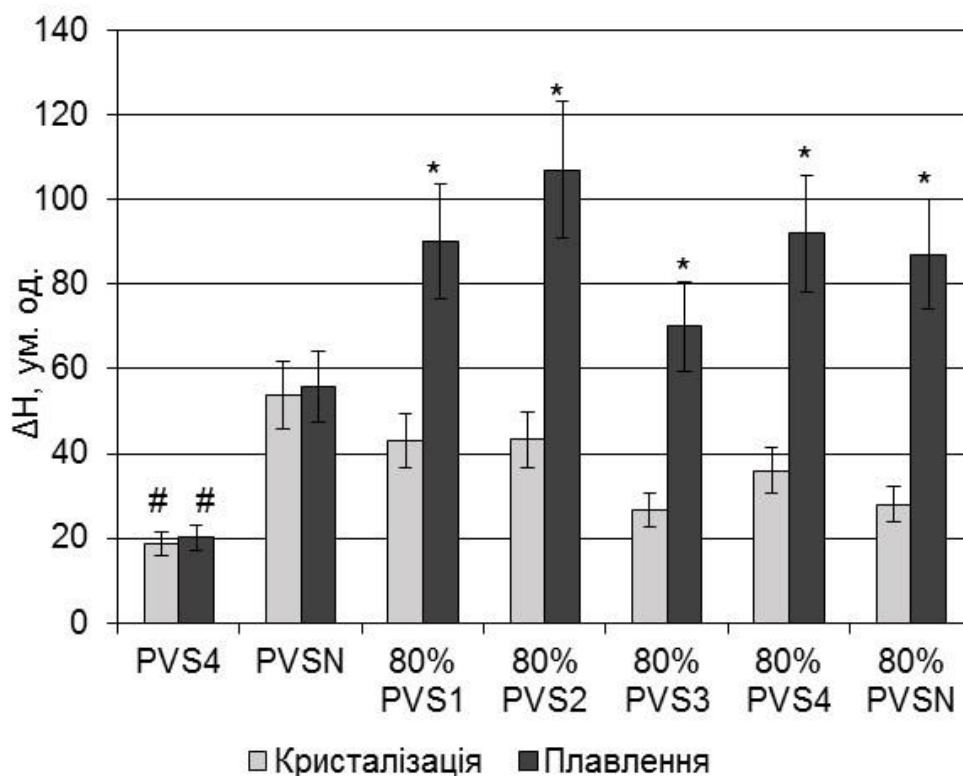


Рис. 6.2.2. Ентальпії (ΔH) кристалізації і плавлення розчинів PVS.

– статистично достовірні відмінності у порівнянні з іншими PVS ($p=0.05$), $n = 5$;

* – статистично достовірні відмінності у порівнянні з ентальпією кристалізації того ж PVS ($p=0.05$), $n = 5$.

Необхідно відзначити, що розвиток кристалізації в висококонцентрованих розчинах PVS4 і PVSН може бути пов'язано з низькими швидкостями нагріву, використаними в роботі. При більш високих швидкостях нагріву цієї кристалізації, ймовірно, можна уникнути. Авторами роботи [94] відмічено, що зниження швидкості нагрівання розчинів PVS призводить до збільшення проценту кристалізації, у той час як на розвиток процесу склування особливо не впливають ні швидкості охолодження, ні відігрівання.

Аналізуючи температури і інтенсивності склування досліджених вітрифікуючих розчинів, можна відмітити, що температури склування PVS1,

PVS2, PVS4 і PVSН достовірно не відрізняються, у той час як для PVS3 температура достовірна вища і складає $-93,9^{\circ}\text{C}$ (табл. 6.2.1). Це може бути пов'язано з відсутністю у середовищі PVS3 ДМСО і етиленгліколю, які мають більш низьку температуру склування, та більшою кількістю сахарози у їх складі, температура склування водних розчинів якої вища.

Наситити великі об'єкти, такі як бруньки у стані спокою, 100 % PVS досить складно. Для забезпечення ефективного насичення рослинних експлантів кріопротекторами необхідна тривала інкубація. Однак через токсичність PVS клітини на поверхні зразка можуть бути пошкоджені. Було виявлено, що 80-відсоткові концентрації PVS, в деяких випадках, є достатнім для успішного склування рослин [107]. Тому в цьому дослідженні також була досліджена стабільність аморфної фази у розведених PVS. Як видно з таблиці 6.2.1, кристалізація відбувається у всіх 80-відсоткових розчинах PVS при повільному нагріванні. При цьому температура кристалізації відрізняється для всіх досліджуваних розчинів. Стабільність аморфної фази була найвищою для 80 % PVS1 та 80 % PVS3. У цих розчинах кристалізація аморфної фази відбувається не відразу після появи рідкої фази, а при більш високих температурах ближче до точки плавлення. Кристалізації 80 % PVS1 та 80 % PVS3 можна запобігти, змінивши об'єм зразка та швидкість нагрівання. Ентальпія плавлення для всіх досліджених 80 % PVS була значно вищою, ніж ентальпія кристалізації (рис. 6.2.2). Це свідчить про те, що в цих випадках рідина PVS частково кристалізується на стадії охолодження. Аналізуючи стрибки теплоємності 80 % та 100 % PVS, було виявлено, що здатність до склування для PVS2, PVS3 та PVS4 суттєво не відрізняється (рис. 6.2.3). Для 80 % PVS1 та 80 % PVSН стрибки теплопоглинання були значно нижчими, ніж для відповідних 100 % PVS. Це може бути пов'язано з меншою концентрацією компонентів кріопротекторів у цих розчинах.

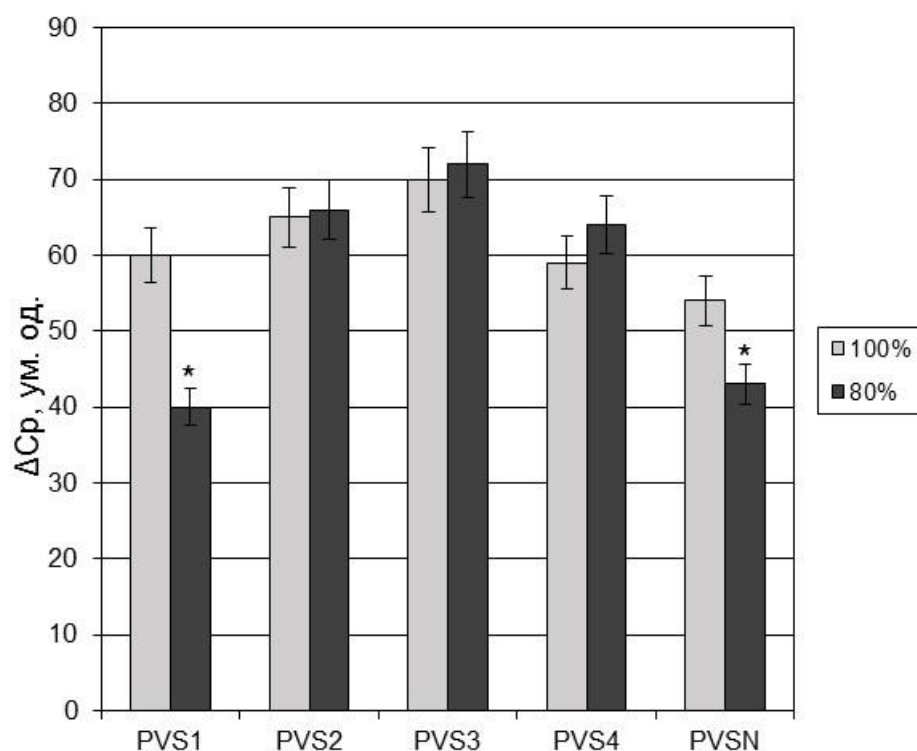


Рис. 6.2.3. Стрибок теплоємності при склуванні (ΔC_p) розчинів PVS.

* – статистично достовірні відмінності у порівнянні зі 100 % PVS ($p=0.05$), $n = 4$.

Таким чином, розчини PVS1, PVS2 і PVS3 мають більш високу здатність до склування та стабільність аморфної фази порівняно з PVS4 і PVS5. PVS2 та PVS3 мають високу склоутворюючу здатність навіть у 80 % концентрації, що робить його більш перспективним при кріоконсервуванні різноманітних рослинних об'єктів.

6.3 Порівняльний аналіз ефективності методу VIV та пасивного насичення ізольованих бруньок винограду розчинами PVS методом ДСК

У роботі було проведено порівняльну оцінку ефективності методу вакуум-інфільтрації і пасивного інкубування для насичення середовищами PVS бруньок винограду сорту Руський Конкорд. Ефективність насичення бруньок оцінювали методом низькотемпературної ДСК за зміною температур фазових переходів, ентальпій кристалізації та плавлення води і стрибка теплоємності при склуванні.

На рисунку 6.3.1, як приклад, наведено термограми ДСК контрольних бруньок винограду (45 % вологості) та бруньок, які були насичені розчином PVS2 різними методами. Видно, що у контрольних бруньках, окрім інтенсивного ендотермічного піку (4) (плавлення льоду у бруньках) спостерігаються низькотемпературні переходи: розмиті за температурою розсклування, кристалізація та передплавлення з низьким рівнем тепловиділення та теплопоглинання, відповідно (рис. 6.3.1, А). Це говорить про те, що зв'язана біологічними структурами вода не встигає закристалізуватися при швидкому охолодженні і переходить у твердоаморфний склоподібний стан. На етапі повільного нагріву після розсклування можна спостерігати кристалізацію і плавлення зв'язаної води бруньок. Подібні низькотемпературні фазові переходи незначної інтенсивності можна побачити на термограмах ДСК ембріонів папайї за відсутності кріопротекторів у роботі Nadarajan J. та Pritchard H.W. [65].

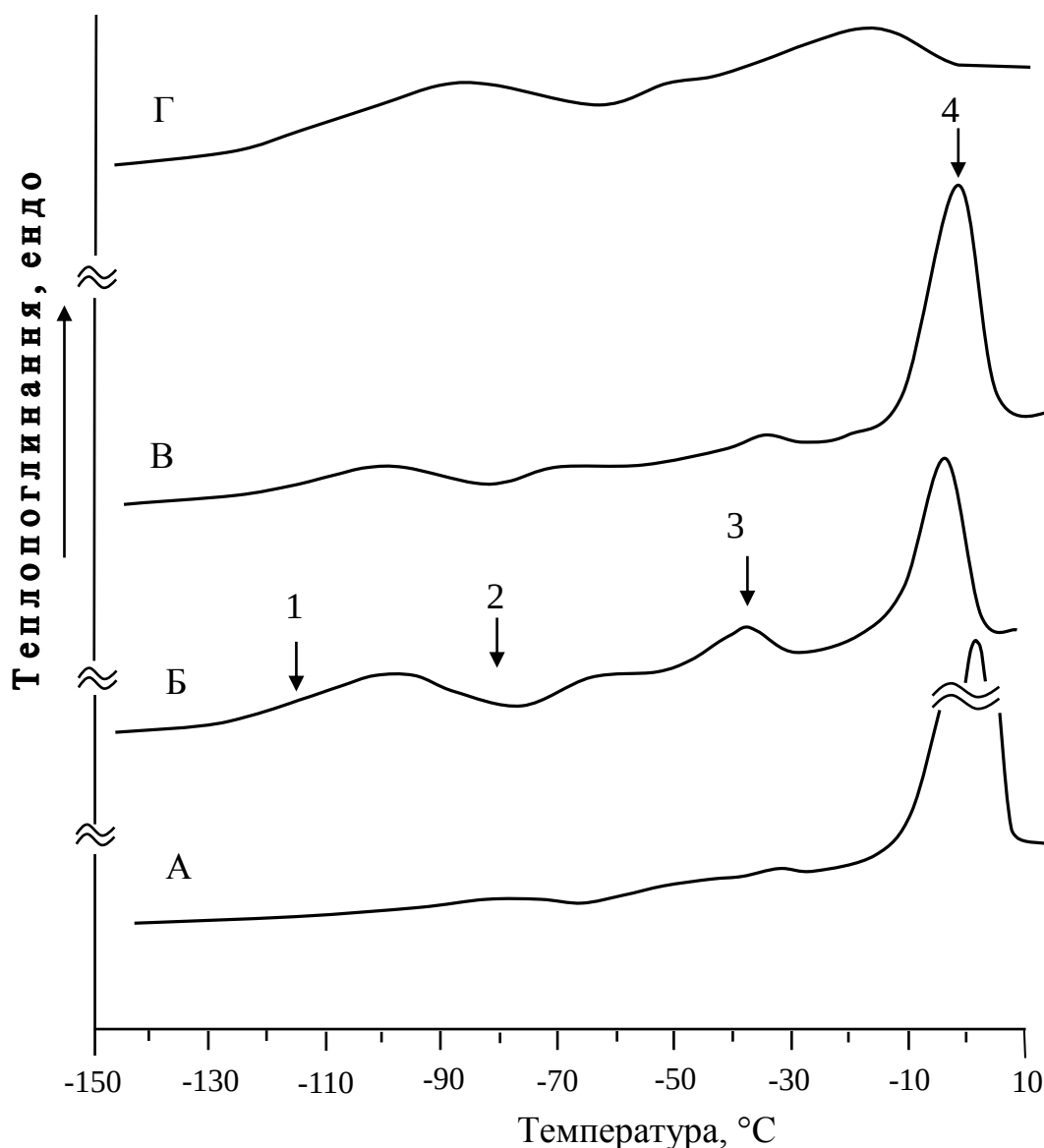


Рис. 6.3.1. ДСК-термограми: А – бруньки винограду (контроль); Б – бруньки винограду, насичені PVS2 методом VIV; В – бруньки винограду, насичені PVS2 методом вимочування (60 хв); Г – бруньки винограду, насичені PVS2 методом вимочування (6 год). 1 – розклування; 2 – кристалізація; 3 – передплавлення; 4 – плавлення.

При насиченні методом вакуум-інфільтрації бруньок винограду на термограмах крім розклування значної інтенсивності зареєстровано екзотермічний пік завершення кристалізації на етапі нагріву (рис. 6.3.1, Б). У

роботі для отримання максимальної кількості склоподібної фази використані високі швидкості охолодження і на етапі нагріву переохолоджена рідина кристалізується. При подальшому нагріванні бруньок зареєстровано ендотермічний пік передплавлення, який пов'язують з плавленням зв'язаної води. Слід відмітити, що інтенсивність переходів у зразках бруньок, які були насичені методом VIV і методом пасивного вимочування (60 хв), відрізняється. Так, наприклад, на термограмах ДСК бруньок при використанні методу VIV стрибок теплопоглинання при склуванні в два рази більше у порівнянні з пасивним вимочуванням (рис. 6.3.2), що свідчить про значуще більшу кількість склоподібної фази. Температура плавлення при використанні методу VIV на 4 градуси нижче, а ентальпія плавлення зв'язаної води вище в 2,9 разів у порівнянні з традиційним методом пасивного насичення (рис. 6.3.3). Значуще нижчою при цьому є ентальпія плавлення льоду.

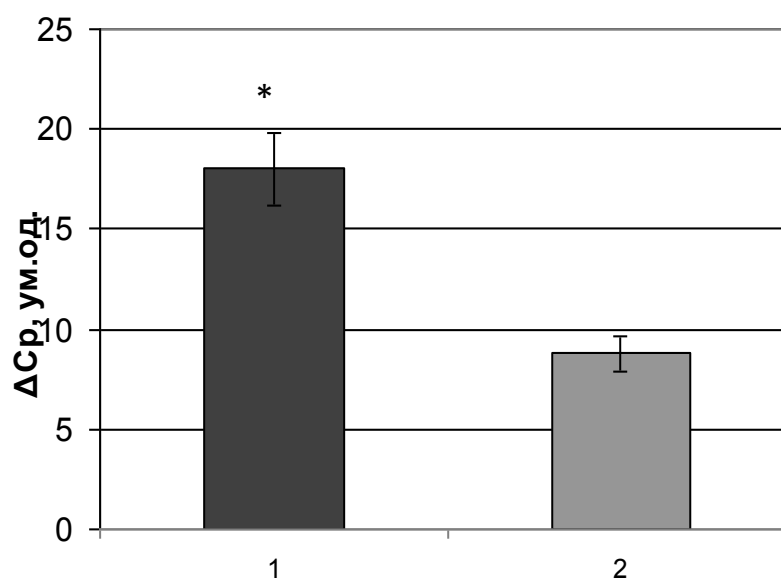


Рис. 6.3.2. Стрибок теплопоглинання у бруньках винограду, насичених PVS2 методом VIV (1) і пасивним вимочуванням (2); * – відмінність значуща по відношенню до пасивного вимочування ($p < 0,05$).

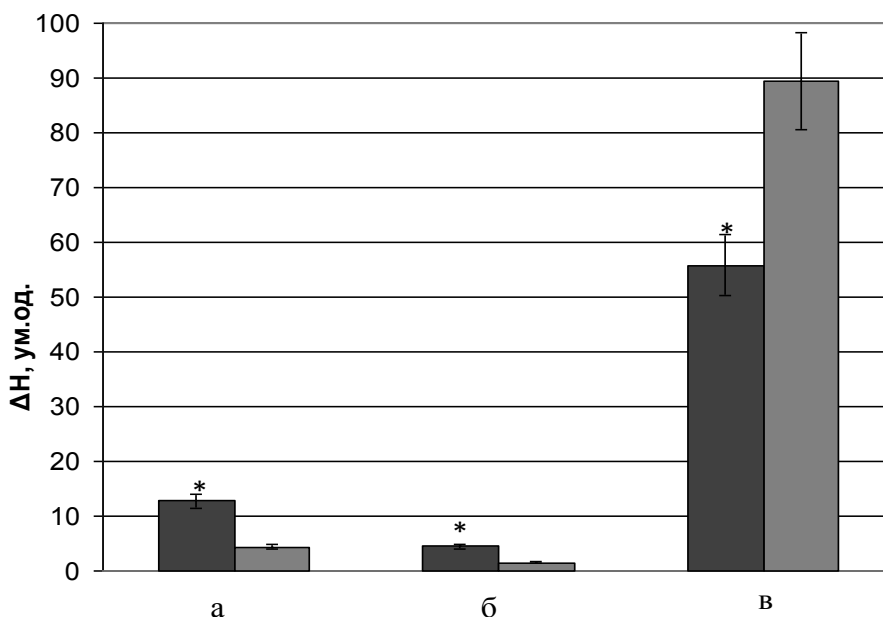


Рис. 6.3.3. Зміни ентальпії при кристалізації (а), передплавленні (б) та плавленні (в) бруньок винограду, насичених PVS2 методом VIV (■) і пасивним вимочуванням (□); * – відмінність значуща по відношенню до пасивного вимочування ($p < 0,05$).

Безумовно, більш тривале насичення бруньок методом пасивної інкубації призведе до збільшення концентрації кріозахисних речовин всередині бруньок і, відповідно, до збільшення кількості склоподібної фази і зменшенні інтенсивності кристалізації при охолодженні. Це показано у роботі на прикладі насичення PVS2 протягом 6 год (рис. 6.3.1, Г). Видно, що бруньки при охолодженні майже повністю перейшли до аморфного склоподібного стану і на етапі нагріву зареєстровано інтенсивний, але розмитий за температурою стрибок теплопоглинання. Піки завершення кристалізації на етапі нагріву і плавлення льоду близькі за площею, що свідчить про те, що плавиться лід, який утворився при повільному відігріванні, а при охолодженні кристалізація була, імовірно, відсутня. Але збільшення тривалості інкубації до таких великих термінів може призвести до загибелі бруньок, тому такі дослідження мають тільки теоретичне значення.

Було досліджено також низькотемпературні фазові переходи і склування у бруньках винограду, які насичували розчинами PVS1, PVS3, PVS4 та PVS_N методом вакуум-інфільтрації. При насиченні методом вакуум-інфільтрації отримано значні зміни досліджених параметрів фазових переходів. Температури та інтенсивності стрибка теплопоглинання при склуванні, температури фазових переходів та їх ентальпії для бруньок винограду, які було насичено методом вакуум-інфільтрації, наведено у таблицях 6.3.1 та 6.3.2. Видно, що після насичення бруньок PVS2 температура та ентальпія плавлення достовірно нижчі, ніж для інших PVS, що свідчить про якісніше насичення розчином PVS2. Також, беручи за увагу його високу склоутворюючу здатність, саме PVS2 було застосовано при дослідженні з кріоконсервування інших сортів винограду.

Таблиця 6.3.1

Температури фазових переходів у контрольних бруньках та бруньках винограду, які було насичено різними розчинами PVS методом вакуум-інфільтрації

Образец	$T_g, ^\circ\text{C}$	$T_c, ^\circ\text{C}$	$T_{pm}, ^\circ\text{C}$	$T_m, ^\circ\text{C}$
Контроль	-87.9 ± 1.6	-64.8 ± 1.4	-37 ± 0.5	-2.4 ± 0.5
PVS1	$-107.1 \pm 0.5^*$	-68.5 ± 0.5	-37.2 ± 0.5	$-7.2 \pm 0.5^*$
PVS2	-115.1 ± 0.5	-77.6 ± 0.5	-37.1 ± 0.5	$-15.1 \pm 0.5^{* \#}$
PVS3	$-105 \pm 0.5^*$	-62.5 ± 0.5	-36.4 ± 0.5	$-7.9 \pm 0.5^*$
PVS4	$-107.2 \pm 0.5^*$	-77.4 ± 0.5	-37.5 ± 0.5	$-9 \pm 0.5^*$
PVS _N	-106.9 ± 0.5	-85.2 ± 0.5	-48.9 ± 0.5	-4.1 ± 0.5

Примітки: T_g – температура склування, T_c – температура кристалізації при нагріві, T_{pm} – температура передплавлення, T_m – температура плавлення.

* – достовірна відмінність по відношенню до контролю ($p=0.05$), ($n=5$);

– достовірна відмінність по відношенню до інших PVS ($p=0.05$), ($n=5$).

Таблиця 6.3.2

Стрибок теплопоглинання та зміни ентальпії при фазових переходах у контрольних бруньках та бруньках, які було насичено різними розчинами PVS методом вакуум-інфільтрації

Образец	Δc_p , ум. од.	ΔH_c , ум. од.	ΔH_{pm} , ум. од.	ΔH_m , ум. од.
Контроль	9.1±1.0	0.83±0.21	0.38±0.16	174.1±29.8
PVS1	20.5±3.7*	9.22±1.15*	2.96±2.48*	68.3±9.9*
PVS2	18.0±0.9*	12.81±1.56*	4.5±0.51* [#]	55.72±6.34* [#]
PVS3	32.9±2.6*	1.98±0.56*	1.07±0.32*	116.7±17.3*
PVS4	34.8±3.9*	26.5±2.31*	0.42±0.13	73.6±11.5*
PVSN	12.3±2.1	1.33±0.17	0.79±0.13	123.5±11.5

Примітки: Δc_p – стрибок теплопоглинання при склуванні, ΔH_c – ентальпія кристалізації при нагріві, ΔH_{pm} – ентальпія передплавлення, ΔH_m – ентальпія плавлення.

* – достовірна відмінність по відношенню до контролю ($p=0.05$), ($n=5$);

– достовірна відмінність по відношенню до інших PVS ($p=0.05$), ($n=5$).

Отримані результати свідчать про значне збільшення концентрації кріозахисних речовин у бруньках винограду й істотне зменшення кількості вільної води, яка кристалізується при охолодженні, під час використання VIV технології. Термічний аналіз рослинних матеріалів з використанням ДСК демонструє міцний взаємозв'язок між наявністю кристалізації або плавлення льоду з пошкодженнями біологічних об'єктів [104]. Адже саме фізико-хімічні фактори, що супроводжують фазовий перехід «вода–лід» та «лід–вода» є головними факторами. Застосування сучасного методу насичення бруньок винограду може значно підвищити їх виживання при кріоконсервуванні.

Крім того тривалий час інкубації у кріозахисних розчинах, який є необхідним при використанні класичного пасивного насичення, може призводити до загибелі поверхневого шару клітин бруньок, який контактує з кріозахисним середовищем.

Таким чином, нами виявлено, що створення зниженого тиску в тканинах бруньок перед зануренням у кріозахисний розчин призводить до кращого проникнення кріозахисних речовин у тканини бруньок у порівнянні з традиційним методом насичення і потребує значно менше часу для ефективного насичення. Метод VIV дозволяє знизити у декілька разів час інкубації бруньок винограду у кріозахисному розчині, а отже вплив токсичної дії розчинів, у порівнянні з пасивним насиченням, а також забезпечує більш ефективне насичення бруньок кріозахисним розчином. Краще насичення при використанні методу VIV ефективно запобігає розвитку кристалізації при охолодженні бруньок винограду і сприяє переходу рідини у склоподібну фазу [78].

6.4 Кріоконсервування бруньок винограду

Найпростішим способом тривалого зберігання генетичних ресурсів для більшості рослин є кріоконсервування. Відновлення рослин після кріоконсервування може відбуватися шляхом прямого щеплення бруньки, мікротрансплантації меристем, культивуванням меристем на відповідному середовищі або шляхом прямого вкорінення живців. При цьому зводиться до мінімуму можливість виникнення соматоклональних варіантів, що важливо, коли необхідно зберегти цілісність клону з унікальною комбінацією генів, як у випадку плодових культур [43, 54, 158].

Нами було показано висока ефективність методу вакуум-інфільтрації порівняно з пасивною еквілібрацією при насиченні ізольованих бруньок винограду на прикладі сорту Руський Конкорд. У данному підрозділі було досліджено вплив методу насичення на життєздатність бруньок після кріоконсервування [79]. Порівняно ефективність методу VIV та пасивного

насичення ізольованих сплячих бруньок винограду сортів Руський Конкорд, Ріпарія Х Рупестріс (РР) 101/14 та Загадка крізахисним середовищем PVS2.

Збереженість меристематичних частин бруньок після кріоконсервування оцінювали шляхом забарвлення розчином 2,3,5-трифенілтетразолію хлоридом (ТТХ) (рис. 6.4.1). Низький окиснювально-відновлюючий потенціал даної сполуки забезпечує перехоплення ними іонів H^+ , які переносяться НАД (никотинамідадениндинуклеотідом) у процесі клітинного дихання. При цьому відбувається відновлення тетразолієвих солей і їх перехід в водонерозчинну форму – формазану [174]. Реакція відбувається в цитоплазмі за рахунок діяльності цитоплазматичних дегідрогеназ і в мітохондріальному електронтранспортному ланцюзі. За інтенсивністю накопичення формазану, який має пурпурове забарвлення, оцінюють метаболічну активність клітин. Життєздатність виноградних бруньок оцінювалася візуально за часом їх набухання та подальшого росту.



Рис. 6.4.1. Оцінка збереженості тканин бруньок винограду (забарвлення у 1% розчині ТТХ): живі клітини яскраво забарвлені.

Після зберігання при кріогенних температурах зразки, які були спочатку зневоднені, відігрівають і повторно зволожують. Відігрівання

живців або бруньок без застосування кріопротекторів, зазвичай, відбувається повільно при кімнатній температурі або при температурі приблизно 4 °С. При кріоконсервуванні бруньки, які були оброблені кріопротекторами з використанням контрольованого охолодження або методів вітрифікації, зазвичай швидко відігріваються на водяній бані. У даній роботі бруньки відігрівали на водяній бані з початковою температурою 40 °С зі зниженням її до 20 °С, щоб забезпечити максимально високу швидкість нагрівання, але запобігти перегріванню бруньок у гарячій воді.

Результати збереженості та життєздатності деконсервованих бруньок винограду подані у таблиці 6.4.1. Показано, що збереженість виноградних бруньок для сортів Руський Конкорд, РР 101/14 та Загадка за тестом відновлення тетразолія хлористого складала 60–80 % після застосування методу VIV. Життєздатність деконсервованих бруньок протягом 4 тижнів культивування становила 30 % для сорту Руський Конкорд, 40 % для Загадки, 0 % для РР 101/14.

Таблиця 6.4.1

Збереженість та життєздатність бруньок винограду після кріоконсервування

Сорт винограду	Конт-роль	Кріоконсервування методом VIV		Кріоконсервування після пасивного насичення	
		Збереженість, %	Життєздатність, %	Збереженість, %	Життєздатність, %
РР 101/14	90	60*	0	0	0
Руський Конкорд	100	60*	30*	0	0
Загадка	100	80*	40*	0	0

Примітка: * – відмінності достовірні порівняно із кріоконсервуванням бруньок відповідного сорту після пасивного насичення ($p < 0,01$), $n = 10$.

При використанні пасивного методу насичення бруньок винограду перед кріоконсервуванням збереженість та життєздатність деконсервованих зразків була 0 % для усіх досліджених сортів винограду.

Стан тканин бруньок у контролі і після кріоконсервування оцінювали також методом конфокальної флуоресцентної мікроскопії. На рис. 6.4.2 наведено флуоресцентні зображення та спектри власної флуоресценції тканин бруньок винограду. Можна спостерігати інтенсивний пік флуоресценції хлорофілу у діапазоні 650–700 нм. Спектри власної флуоресценції рослин чутливі до змін середовища, що дозволяє використовувати мікроспектральний аналіз для біомоніторингу [131, 181].

Після кріоконсервування методом VIV бруньок винограду спектри власної флуоресценції практично не змінювались, що продемонстровано на рис. 6.4.3 на прикладі винограду Руський Конкорд. Це свідчить про прийнятність застосованих у роботі підходів до кріоконсервування бруньок.

Великий відсоток життєздатних деконсервованих бруньок сорту Загадка може бути видовою ознакою та обумовлений особливостями деревини, яка має більш пористу структуру на відміну від сортів Руський Конкорд і РР 101/14. Також важливим, на наш погляд, є розташування бруньок на живцях. З огляду на те, що у сорту РР 101/14, як і у інших морозовитривалих сортів, бруньки мають маленький розмір та утоплені у структуру деревини, насичення їх розчином PVS ускладнено. У природних умовах це дозволяє знизити ризик погодних шкідливих чинників, таких як обмерзання та добові піки низької температури. Бруньки на живцях у сорту Загадка більші за розміром ніж бруньки сорту Руський Конкорд та більш відокремлені від деревини. Також в експерименті було з'ясовано, що щільність бруньки значно менше щільності деревини. Отримані результати дозволяють припустити, що життєздатність бруньок після кріоконсервування з використанням методу VIV залежить від щільності деревини, відокремленості бруньок від структури живця, в'язкості робочих розчинів та менш залежить від морозовитривалості сортів. На наш погляд, саме ці

показники впливають на ефективність насичення методом VIV, а отже і на результати кріоконсервування [78, 79].

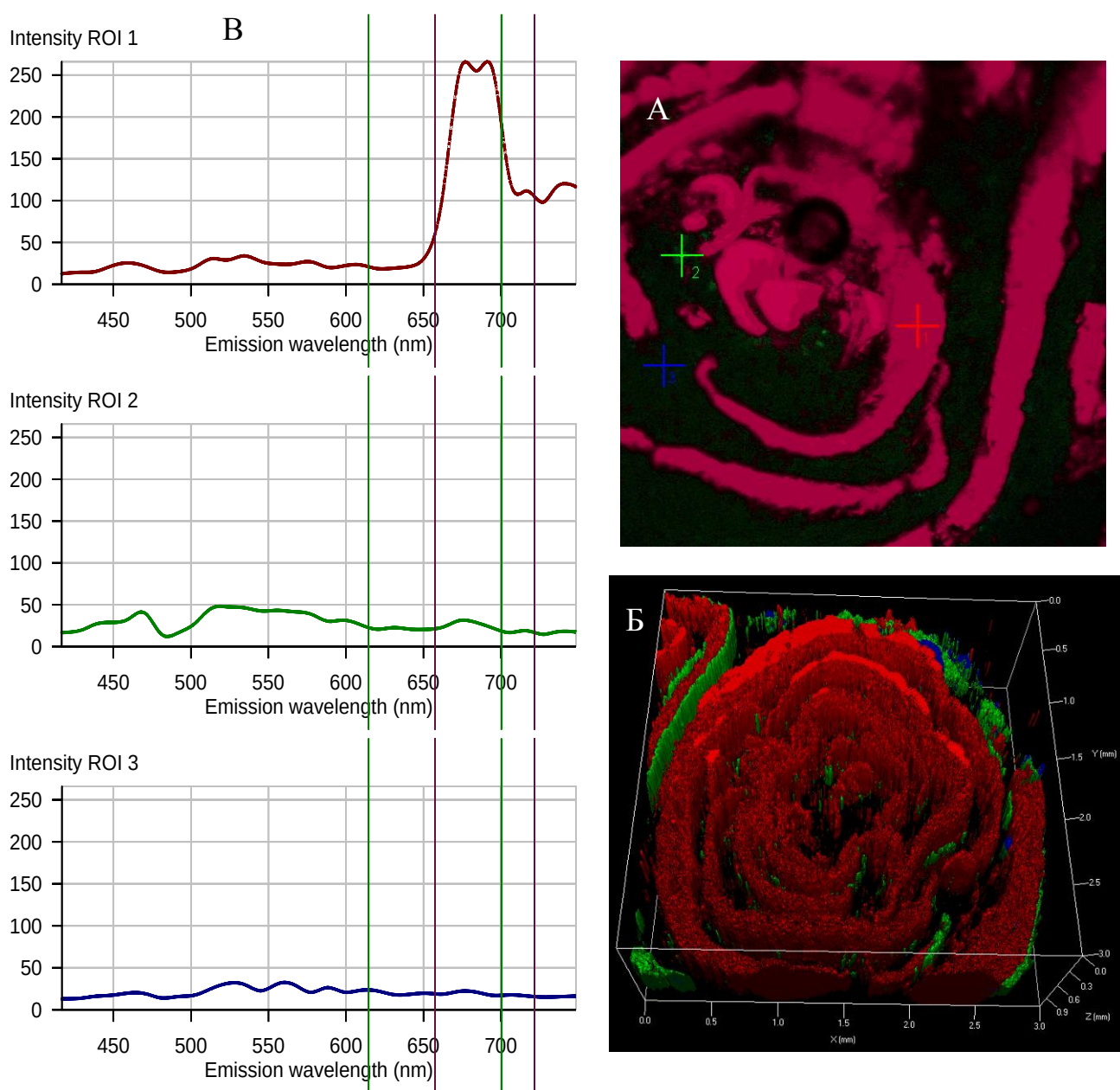


Рис. 6.4.2. Флуоресцентні 2D- (А), 3D-зображення (Б) та спектри власної флуоресценції (В) зрізу бруньки винограду сорту Руський Конкорд у контролі.

Б

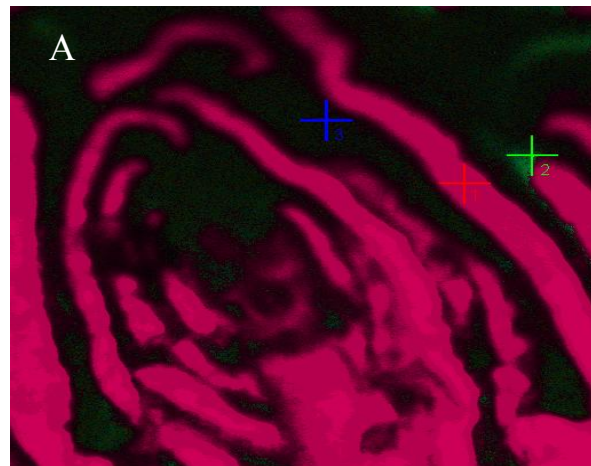
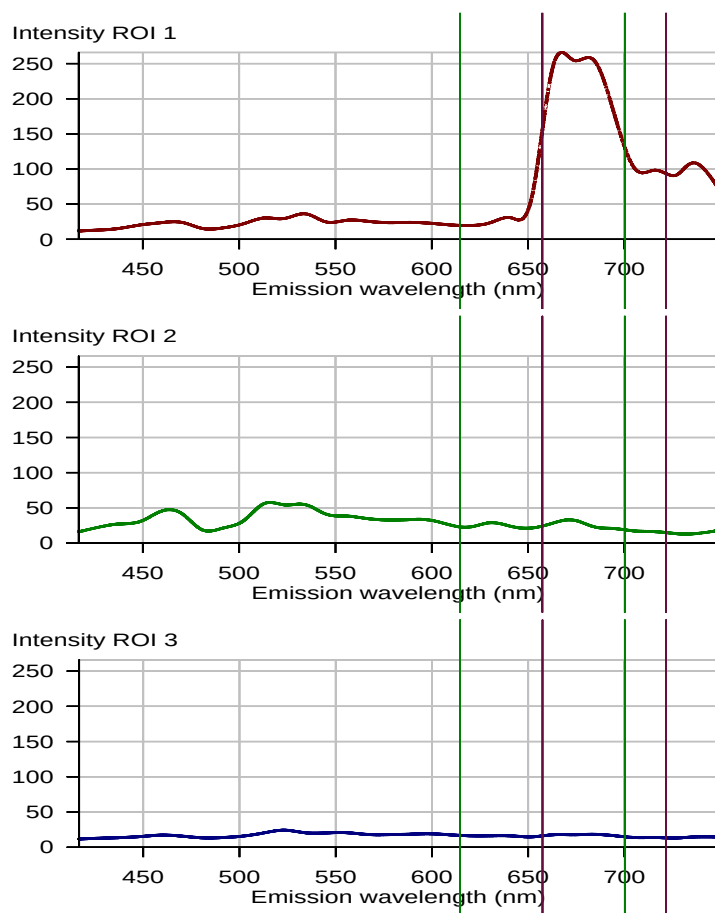


Рис. 6.4.3. Флуоресцентне зображення (А) та спектри власної флуоресценції (Б) зрізу бруньки винограду сорту Руський Конкорд, яка була кріоконсервована методом VIV та відігріта.

Таким чином, використання методу VIV дозволяє підвищити збереженість та життєздатність ізолюваних бруньок винограду при кріоконсервуванні у порівнянні зі стандартним методом насичення. Застосування кріоконсервування методом VIV може стати основою загальної, високопродуктивної технології для збереження *ex situ* генетичних ресурсів рослин, сприяти продовольчій безпеці, захисту видів із різноманітних середовищ існування.

За матеріалами розділу 6 опубліковано роботи [78, 79, 107, 108, 145, 162, 163, 165, 182].

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Розробка методів низькотемпературного зберігання генетичних ресурсів рослин на даний час є одним з найважливіших завдань кріобіології. Для кріоконсервування рослин, які мають вегетативне розмноження, зокрема плодових та ягідних культур, найчастіше використовують апікальні меристеми. Зимуючі бруньки та живці плодово-ягідних культур використовують рідше, що пов'язано з відсутністю ефективних технологій їх кріоконсервування, зокрема це стосується винограду. Регенерація меристем у посадковий матеріал ускладнена процедурами культивування, необхідністю зростання в стерильних умовах, акліматизації до умов парника, в той час як при зберіганні живців або бруньок шляхом щеплення можна за дуже короткий час реанімувати генотип деконсервованого матеріалу.

У дисертаційній роботі проведені роботи як по створенню польових ампелографічних колекцій, так і визначенню умов для покращення життєздатності прищепних частин винограду після гіпотермічного та низькотемпературного зберігання.

Була проведена інтродукція 65 південних сортів на дослідній ділянці Біологічної станції ХНУ ім. В.Н. Каразіна та 75 сортів винограду на території ІПКіК НАН України, зокрема саджанців сортів нової генетики, різного терміну визрівання. Серед сортів винограду у створених ампелографічних колекціях є сорти з різною високопродуктивністю, морозостійкістю, комплексостійкістю до різних хвороб і шкідників та різною промисловою цінністю. Проведена робота може забезпечити унікальним матеріалом селекціонерів Харківської області, оскільки дозволяє зберігати нові сорти та сорти, які можуть бути втраченими. Створені у рамках дисертаційної роботи *in vivo* колекції є передумовою створення низькотемпературної *in vitro* колекції винограду, яка стане базою довготривалого зберігання генетичного різноманіття безвірусного посадкового матеріалу сортів винограду для профільних інститутів та селекційних установ України.

Найбільш ефективним способом зберігання виноградної лози є гіпотермічне зберігання в умовах холодильника при $+4-0^{\circ}\text{C}$, однак у зрізаних пагонів внаслідок капілярної провідності судин неминуха втрата вологи, що може призводити до зниження рівня життєздатності живців. У роботі досліджено вплив дегідратації живців винограду з відкритими зрізами в умовах холодильної камери на їхню життєздатність. Встановлено межу зневоднення живців винограду сорт Шевченко, яка склала приблизно 40 % вологості, при якій життєздатність вірогідно не змінювалась. У роботі запропоновано метод вакуум-інфільтрації і доведена його висока ефективність для відновлення рівня вологості живців винограду, розроблено пристрої для насичення рослинних об'єктів трубчасто-капілярної структури. Визначено оптимальний тиск (70 кПа) для безпечного і ефективного насичення як живильними, так і кріозахисними середовищами живців винограду з відкритими зрізами.

Встановлено, що час проходження розчину еозину через одновузлові живці винограду при насиченні методом вакуум-інфільтрації досить короткий (7–10 с), що обумовлено анатомічною особливістю винограду, лоза якого має пористу структуру. У тривузлових живцях винограду час насичення збільшувався у 20 разів порівняно з одновузловими та у 7 разів порівняно з двовузловими живцями. При збільшенні діаметра живців час насичення зменшувався, що обумовлено збільшенням площі трубчасто-капілярної системи таких живців. Оцінка можливого пошкодження живців винограду при застосовуванні вакууму показала, що при використаних у роботі значеннях тиску життєздатність бруньок за тестом культивування не змінювалась порівняно з контролем.

Час насичення одновузлових живців винограду розчинами сахарози та гліцерину у концентраціях 10–50 % методом вакуум-інфільтрації складав менш однієї хвилини. Подібні розчини часто використовуються для попередньої обробки рослинних експлантів для подальшого кріоконсервування. Метою цих прийомів є запобігання ушкодженню

мембран кристалами льоду, а також ослабленню осмотичного шоку, що виникає при зневодненні клітин. Тому метод вакуум-інфільтрації може ефективно застосовуватись як для попередньої обробки живильними та/або кріозахисними речовинами, так і для відновлення вологості після тривалого гіпотермічного зберігання. Крім того, застосування методу вакуум-інфільтрації дозволяє знизити небезпеку зараження здорового матеріалу від хворих живців вірусами або бактеріями, оскільки виключає етап тривалого замочування прищепних і підщепних частин лоз.

Досліджено вплив концентрації сахарози на життєздатність живців при насиченні методом вакуум-інфільтрації. Показано, що сахароза в концентраціях 0,1–0,7 М достовірно не впливає на життєздатність бруньок незалежно від часу подальшої інкубації у розчині тієї ж концентрації (до трьох діб). Зі зростанням концентрації розчинів сахарози і часу експозиції до 5 разів збільшувався час пробудження бруньок у порівнянні з контрольною групою (насичення живильним середовищем МС). Можливо, вплив сахарози виявляється у подовженні стану спокою досліджуваних зразків, що може бути використано при подальшому кріоконсервуванні. Дослідження впливу сахарози на живці винограду в умовах дегідратації показало, що захисна дія сахарози залежить від рівня зневоднення живців. Для живців з вихідною вологістю 39–42 % життєздатність бруньок зростала зі збільшенням концентрації сахарози. При зниженні вихідної вологості живців до 30–33 % сахароза практично не чинила захисної дії після зневоднення, а прийнятний відсоток життєздатності показано лише у групі оброблення 0,1 М розчином сахарози.

Відсутність на даний час ефективних методів кріоконсервування бруньок винограду пов'язана зі складнощами їх насичення кріозахисними середовищами через велику кількість різноманітних каналів та порожнин з повітрям у бруньках винограду. У роботі розроблено пристрій для насичення ізольованих бруньок методом вакуум-інфільтрації та доведено висока ефективність запропонованого метода для насичення бруньок винограду

різними розчинами. Визначено основні етапи вакуум-інфільтрації та оптимальні параметри тиску та часу для насичення бруньок винограду у стану спокою розчинами PVS. Важливим етапом є попередня дегазація бруньок і кріозахисного середовища при тиску 20 кПа, а на етапі насичування необхідно застосовувати тиск 40 кПа протягом 15–20 хв. з поступовим його підвищенням протягом 2–2,5 хв до атмосферного. При пасивному вимочуванні зі збільшенням розміру рослинних об'єктів потрібно збільшувати час їх інкубації у кріозахисному розчині, а тривалий контакт з концентрованими кріозахисними розчинами може приводити до загибелі поверхневого шару клітин бруньок, при цьому, їх внутрішні шари залишаються ненасиченими через значний об'єм та гетерогенність бруньок. Вакуум-інфільтрація дозволяє зменшити час контакту біологічного зразка з кріозахисними розчинами та покращити глибину проникнення та рівномірність розподілення речовин по тканинах бруньок.

Розчини PVS призначені для кріоконсервування рослинних об'єктів методом вітрифікації. При цьому надзвичайно важливим параметром є стабільність аморфного стану кріозахисних розчинів, яку характеризують наявністю кристалізації після розсклування, її температурою та інтенсивністю теплового ефекту. У роботі досліджено низькотемпературні фазові переходи і склування концентрованих і розведених розчинів PVS1, PVS2, PVS3, PVS4 та PVSN та проаналізовано стабільність аморфного стану, який ними утворений. Після швидкого охолодження PVS1, PVS2 і PVS3 не реєструвалося ніяких екзо- або ендотермічних піків на етапі нагріву, що вказує на високу стабільність аморфного стану даних кріозахисних розчинів. Піки кристалізації і плавлення зареєстровано для розчинів PVS4 та PVSN, однак теплові ефекти кристалізації і плавлення достовірно не відрізнялися, що вказує про розвиток кристалізації тільки на етапі нагріву. При підвищенні швидкостей нагріву, цієї кристалізації можливо було б запобігти. Розчини PVS2 і PVS3 навіть у 80 % концентрації мають високу склоутворюючу здатність. Розчин PVS2 знайшов більш широке застосування у кріобіології і

зараз успішно застосовується для кріоконсервування експлантів більше 200 видів рослин, можливо це пов'язано з його меншою в'язкістю, ніж PVS3.

В дисертаційній роботі досліджено низькотемпературні фазові переходи і склування в бруньках винограду, які було насичено кріозахисними середовищами групи PVS різними методами. Показано, що при використанні методу вакуум-інфільтрації для насичення бруньок PVS2 стрибок теплоємності при склуванні в два рази більше, температура плавлення на 4 градуси нижче, а ентальпія плавлення зв'язаної води вище в 2,9 разів у порівнянні з традиційним методом пасивного насичення. Зміни даних параметрів свідчать про значуще більшу кількість склоподібної фази при використанні методу вакуум-інфільтрації. При цьому час контакту бруньок з кріозахисними розчинами знижується у чотири рази.

Досліджено вплив методу насичення на життєздатність бруньок винограду при кріоконсервуванні. Виявлено, що пасивне вимочування не забезпечує збереженості бруньок винограду при подальшому низькотемпературному впливі, застосування методу VIV давало достовірно вищі показники збереженості і життєздатності бруньок винограду. Після кріоконсервування бруньок під захистом PVS2 збереженість після застосування методу VIV для сортів Руський Конкорд, РР 101/14 та Загадка складає 60–80 %. Життєздатність деконсервованих бруньок після 4 тижнів культивування становила 30 % для сорту Руський Конкорд, 40 % для Загадки, 0 % для РР 101/14. При застосуванні пасивного вимочування для насичення бруньок винограду розчином PVS2 після кріоконсервування не було ні збережених, ні життєздатних бруньок. Кореляції між морозостійкістю та кріорезистентністю різних сортів винограду при використанні методу VIV виявлено не було. Таким чином, застосування вакуум-інфільтрації для насичення бруньок у стані спокою є сучасним перспективним підходом для кріобанкінгу прищепних частин рослин.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлені теоретичне й експериментальне узагальнення та нове рішення наукового завдання, направлено на вивчення впливу гіпотермічного зберігання живців винограду на їх збереженість, в залежності від способів їх обробки та рівня вологості. Розроблено нові способи насичення живців та ізольованих бруньок винограду кріозахисними і живильними середовищами, доведено їх ефективність у протоколах кріоконсервування і гіпотермічного зберігання гермплазми винограду. Дослідження, проведені у дисертаційній роботі, доводять важливість збереження гермплазми винограду у польових, гіпотермічних та низькотемпературних умовах.

1. Створено дві ампелографічні колекції при ІПКіК НАН України, що забезпечує збереження генетичних ресурсів рідкісних та перспективних сортів для Північного виноградарства України у польових умовах.

2. Встановлено, що метод вакуум-інфільтрації при використанні тиску близько 70 кПа є безпечним і ефективним та дозволяє: прискорити насичення прищепної частини винограду живильними та кріозахисними середовищами більш ніж у 10 разів, виключити стадію вимочування живців та знизити можливість перенесення вірусних інфекцій, відновлювати початкову вологість живців та суттєво збільшити термін гіпотермічного зберігання.

3. Визначено кількісні значення оптимальних концентрацій сахарози (0,1 – 0,7 М) для насичення сплячих бруньок винограду методом вакуум-інфільтрації та досліджені життєздатність бруньок та терміни їх пророщування залежно від рівня вологості та часу насичення.

4. Методом ДСК показано, що розчини PVS1, PVS2 і PVS3 мають високу склоутворюючу здатність та більшу стабільність аморфної фази порівняно з PVS4 і PVS_N, що робить їх більш перспективними при кріоконсервуванні різноманітних рослинних об'єктів.

5. Визначено, що для ефективного насичення бруньок винограду різними розчинами PVS з метою подальшого кріоконсервування необхідно застосовувати тиск 40 кПа протягом 15-20 хв з поступовим його підвищенням (протягом 2-2,5 хв) до атмосферного.

6. Досліджено фазовий стан при низьких температурах в бруньках винограду, які було насичено кріозахисними середовищами групи PVS різними методами. Високі показники проникнення кріозахисних речовин усередину бруньок отримано при насиченні PVS2 за умови використання методу вакуум-інфільтрації. Встановлено, що стрибок теплоємності при склуванні в два рази більше, температура плавлення на 4 градуси нижче, ентальпія плавлення зв'язаної води в 2,9 разів вища у порівнянні з традиційним методом пасивного насичення, що свідчить про значуще більшу кількість склоподібної фази.

7. Встановлено, що пасивне вимочування не забезпечує збереженість бруньок винограду після кріоконсервування, тоді як застосування методу VIV є більш ефективним. Показано, що після кріоконсервування виноградних бруньок під захистом PVS2 збереженість для сортів Руський Конкорд, РР 101/14 та Загадка складає 60–80 % після застосування методу VIV, і 0 % – при насиченні пасивним вимочуванням. Життєздатність деконсервованих бруньок протягом 4 тижнів культивування становила 30 % для сорту Руський Конкорд, 40 % для сорту Загадка та 0 % для сорту РР 101/14.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Banilas G., Korkas E. Rapid micro-propagation of grapevine (cv. Agiorgitiko) through lateral bud development. *E-Journal of Science & Technology*. 2007. Vol. 2. P. 31–38.
2. Baranek M., Raddova J., Krizan B., Pidra M. Genetic changes in grapevine genomes after stress induced by in vitro cultivation, thermotherapy and virus infection, as revealed by AFLP. *Genetics and Molecular Biology*. 2009. Vol. 32. № 4. P. 834–839.
3. Baudot A., Alger L., Boutron P. Glass-Forming Tendency in the System Water-Dimethyl Sulfoxide. *Cryobiology*. 2000. Vol. 40. № 2. P. 151–158.
4. Baudot A., Boutron P. Glass-forming tendency and stability of aqueous solutions of diethyl-formamide and dimethylformamide. *Cryobiology*. 1998. Vol. 37. № 3. P. 187–199.
5. Baudot A., Peyridieu J. F., Boutron P., Mazuer J., Odin J. Effect of saccharides on the glass-forming tendency and stability of solutions of 2,3-butanediol, 1,2-propanediol, or 1,3-butanediol in water, phosphate-buffered saline, euro-collins solution, or saint thomas cardioplegic solution. *Cryobiology*. 1996. Vol. 33. № 3. P. 363–75.
6. Ben-Amar A., Daldoul S., Allel D., Reustle G., Mliki A. Reliable encapsulation-based cryopreservation protocol for safe storage and recovery of grapevine embryogenic cell cultures. *Scientia Horticulturae*. 2013. Vol. 157. P. 32–38.
7. Benelli C. Encapsulation of Shoot Tips and Nodal Segments for in Vitro Storage of “Kober 5BB” Grapevine Rootstock. 2016. *Horticulturae* Vol. 2 № 3. P. 10.
8. Benelli C., Lambardi M., Fabbri A. Low temperature storage and cryopreservation of the grape rootstock “Kober 5BB”. *Acta Horticulturae*. 2003. № 623. P. 249–253.
9. Benelli C., De Carlo A., Engelmann F. Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees

of Actinidia, Diospyros, Malus, Olea, Prunus, Pyrus and Vitis. *Biotechnology Advances*. 2013. Vol. 31. № 2. P. 175-185.

10. Bi Wen-Lu. Cryopreservation of Vitis spp. and cryotherapy for eradication of grapevine viruses. PhD thesis, Northwest A&F University, Yangling, China 2017.

11. Botti C., Garay L., Reginato G. The influence of culture dates, genotype and size and type of shoot apices on in vitro shoot proliferation of Vitis vinifera cvs Thompson Seedless, Ribier and Black Seedless. *Vitis*. 1993. Vol. 32. № 2. P. 125-126.

12. Carimi F., Carra A., Panis B., Pathirana R. Strategies for conservation of endangered wild grapevine (Vitis vinifera L. subsp. Sylvestris (C.C. Gmel.) Hegi). *Acta Horticulturae*. 2016. № 1115. P. 81–86.

13. Chang Y., Reed B. M. Extended alternating-temperature cold acclimation and culture duration improve pear shoot cryopreservation. *Cryobiology*. 2000. Vol. 40. P. 311–322.

14. Crowe J. H., Crowe L. M., Carpenter J. F. et. al. Interaction of sugars with membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1989. Vol. 947. P. 367–384.

15. Dereuddre J., Scottez C., Arnaud Y., Duron M. Resistance of alginate-coated axillary shoot tips of pear tree (Pyrus communis L. cv. Beurre Hardy) in vitro plantlets to dehydration and subsequent freezing in liquid nitrogen. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*. 1990. Vol. 310. P. 317–323.

16. Dettweiler E., This P., Eibach R. The European network for grapevine genetic resources conservation and characterization. *XXVème Congrès Mondial de la Vigne et du Vin*. 19-23 June 2000, Paris, France, 2000. P. 1–10.

17. Dussert S., Mauro M. C., Deloire A., Hamon S., Engelmann F. Cryopreservation of grape embryogenic cell suspensions: 1. Influence of pretreatment, freezing and thawing conditions. *CryoLetters*. 1991. Vol. 12. P. 287–298.

18. Dussert S., Mauro M. C., Engelmann F. Cryopreservation of grape embryogenic cell suspensions 2 : Influence of post-thaw culture conditions and application to different strains. *CryoLetters*. 1992. Vol. 13. P. 12–22.

19. Callow J. A., Ford-Lloyd B. V., Newbury H. J. Biotechnology and Plant Genetic Resources, Conservation and Use., Wallingford : CAB International, UK, 1997. 320 p.
20. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2011. Vol. 47. P. 5–16.
21. Engelmann F. Germplasm collection, storage and preservation / *Plant biotechnology and agriculture - prospects for the 21st Century* / editors Altman A., Hazegawa P.M. Cambridge : Academic Press, 2012. 624 p.
22. Esensee V., Stushnoff C., Forsline Ph. L. Cryoconservation of dormant grape (*Vitis* sp.) buds. *Horticultural Science*. 1990. Vol. 25. № 9. P. 1090.
23. Ezawa T., Harada T., Yakuwa T. Studies on freeze-preservation of fruit tree germplasm. III. Freeze-preservation of grape shoot tips. *Journal Faculty Agriculture, Kokkaido University*. 1989. Vol. 64. № 1. P. 51–55.
24. FAO. Report on the State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. 1996.
25. Forsline P. L., Lamdboy W. Recovery and Longevity of cryopreserved dormant apple buds. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1998. Vol. 123. № 3. P. 365–370.
26. Forsline P. L., Aldwinckle H. S., Dickson E. E., Luby J. J., Hokanson S. C. Collection, Maintenance, Characterization, and Utilization of Wild Apples of Central Asia. *Horticultural Reviews*. 2002 Vol. 29. P. 1–61.
27. Funnekotter B., Whiteley S. E., Turner S. R. et al. Evaluation of the new vacuum infiltration vitrification (VIV) cryopreservation technique for native Australian plant shoot tips. *CryoLetters*. 2015. Vol. 36. № 2. P. 104–113.
28. Ganeshan S. Cryogenic preservation of grape (*Vitis vinifera* L.) pollen. *Vitis*. 1985. Vol. 173. P. 169–173.
29. Ganeshan S., Alexander M. Fertilizing ability of cryopreserved grape (*Vitis vinifera* L.) pollen. *Vitis*. 1990. Vol 29. P. 145–150.

30. Grenier-de March G., de Boucaud M. T., Chmielarz P. Cryopreservation of *Prunus avium* L. embryogenic tissues. *CryoLetters*. 2005. Vol. 26. № 6. P. 341–348.
31. Goheen A. C. Virus diseases and grapevine selection. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1989. Vol. 40. P. 67–72.
32. Gonzales-Benito M. E., Martin C., Vidal J. R. Cryopreservation of embryogenic cell suspension of the Spanish grapevine cultivars 'Albariño' and 'Tempranillo'. *Vitis*. 2009. Vol. 48. № 3. P. 131–136.
33. Gribaudo I., Mannini F., Lisa A., Cuozzo D. Phenotypical modifications of micropropagated grapevines. *Acta Horticulturae*. 2000. № 530. P. 231–236.
34. Normah M. N., Narimah M. K., Clyde M. M., Harding K. Proceeding of the International Workshop on In vitro Conservation of Plant Genetic Resources. *University Kebangsaan Malaysia*. 1996. P. 135–168.
35. Harding K. Stability assessments of conserved plant germplasm. *Plant Conservation Biotechnology, Taylor & Francis, London*. 1999. P. 97–108.
36. Harvengt L., Meier Dinkel A., Dumas E., Collin E. Establishment of a cryopreserved gene bank of European elms. *Canadian Journal of Forest Research*. 2004. Vol. 34. № 1. P. 43–55.
37. Hassan N. A., Gomaa A. H., Shahin M. A., El Homosany A. A. In vitro storage and cryopreservation of some grape varieties. *Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants*. 2013. Vol. 5. P. 183–193.
38. Helliot B., de Boucaud M. T.. Effect of various parameters on the survival of cryopreserved *Prunus Ferlenain* in vitro plantlets shoot tips. *CryoLetters*. 1997. Vol. 18. P. 133–142.
39. Heloir M. C., Fournioux J. C., Oziol L., Bessis R. An improved procedure for the propagation in vitro of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir) using axillary bud microcuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1997. Vol. 49. P. 223–225.
40. Huglin P. Biologie et écologie de la vigne. Paris, 1986.

41. Jackson R. S. Wine Science: Principles and Applications. Burlington, USA, 2000. 769 p.
42. Jarret R. L., Florkowski W. J. In vitro active vs. field gene bank maintenance of sweet potato germplasm: Major costs and considerations. *Horticultural Science*. 1990. Vol. 25. P. 141-146.
43. Kalaiselvi R., Rajasekar M. A., Sankara G. S. Cryopreservation of plant materials - a review. *International Journal of Chemical Studies*. 2017. Vol. 5. № 5. P. 560–564.
44. Karoglan Kontić J., Preiner D., Šimon S., Zdunić G., Poljuha D., Maletić E. Sanitary Status of Croatian Native Grapevine Varieties. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2009. Vol. 74. P. 99-103.
45. Kartha K. K., Engelmann F. (1994) Cryopreservation and germplasm storage, NRCS publication no. 32487. *Plant Cell and Tissue Culture*. Kluwer Academic Publisher, Netherland, 1994. P. 195–230.
46. Kaviani B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Australian Journal of Crop Science*. 2011. Vol. 5. № 6. P. 778–800.
47. Kim H. H., Lee Y. G., Shin D. J., Kim T., Cho E. G., Engelmann F. Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures. *CryoLetters*. 2009. Vol. 30. P. 320–334.
48. Kominek P., Holleínova V. Evaluation of sanitary status of grapevines in Czech Republic. *Plant Soil Environ*. 2003. Vol. 49. P. 63–66.
49. Lacombe T., Audeguin L., Boselli M. et al. Grapevine European Catalogue: Towards a Comprehensive List. *Vitis*. 2011. Vol. 50. P. 65–68.
50. Lambardi M., Fabbri A., Caccavale A. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of in vitro-grown shoot tips. *Plant Cell Reports*. 2000. Vol. 19. P. 213–218.
51. Lynch P. T., Benson E. E., Harding K. Climate change: the role of ex situ and cryo conservation in the future security of economically important, vegetatively propagated plants. *Journal Horticultural Science & Biotechnology*. 2007. Vol. 82. № 2. P. 157–160.

52. Maletic E., Karoglan Kontic J., Pejic I. Clonal selection / *Grapevine - Ampelography, Ecology, Breeding* : Školska knjiga. Zagreb, Croatia, 2008. P. 175-177.
53. Markovic Z., Preiner D., Stupic D. et al. Cryopreservation and cryotherapy of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*. 2015. Vol. 54. P. 247–251.
54. Matsumoto T. Cryopreservation of plant genetic resources: conventional and new methods Matsumoto. *Reviews in Agricultural Science*. 2017. Vol. 5. P. 13–20.
55. Matsumoto T., Sakai A. Cryopreservation of axillary shoot tips of in vitro-grown grape (*Vitis*) by a two-step vitrification protocol. *Euphytica*. 2003. Vol. 131. P. 299–304.
56. Matsumoto T., Sakai A. Cryopreservation of grape in vitro-cultured axillary shoot-tips by three step vitrification . *Cryopreservation of tropical plant germplasm-current research progress and application*. 2000. P. 424-425.
57. Maul E., Töpfer R., Carka F. et al.. Identification and characterization of grapevine genetic resources maintained in Eastern European Collections. *Vitis*. 2015. Vol. 54. P. 5–12.
58. McGovern P. E., Glusker D. L., Exner J. L., Voigt M. M. Neolithic resinated wine. *Nature*. 1996. № 381. P. 480-481.
59. Mederos-Molina S. Culture medium requirements for micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. Listan Blanco. *Acta Horticulturae*. 2007. Vol. 754. P. 265–271.
60. Meneghetti S., Calo A., Bavaresco L. A Strategy to Investigate the Intravarietal Genetic Variability in *Vitis vinifera* L. for Clones and Biotypes Identification and to Correlate Molecular Profiles with Morphological Traits or Geographic Origins. *Molecular Biotechnology*. 2012. Vol. 52. № 1. P. 68–81.
61. Miaja M. L., Gribaudo I., Vallania R., Fernandez L. F. Low temperature storage and cryopreservation of a *Vitis vinifera* L. germplasm collection: first results. *Eucarpia symposium on Fruit Breeding and Genetics. Acta Horticulturae*. 2000. Vol. 538. P. 177–181.

62. Miaja M. L., Gambino G., Vallania R., Gribaudo I. Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. somatic embryos by vitrification or encapsulation- dehydration. *Acta Horticulturae*. 2004. Vol. 663. P. 599–604
63. Mullins M. G., Bouquet A., Larry E. Biolody of grapevine. Cambridge : University press, 1992. 239 p.
64. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 1962. Vol. 15. № 3. P. 473-497.
65. Nadarajan J., Pritchard H. W.. Biophysical characteristics of successful oilseed embryo cryoprotection and cryopreservation using vacuum infiltration vitrification: an innovation in plant cell preservation. *PLOS ONE*. 2014. Vol. 9. № 5. e96169.
66. Niino T., Sakai A., Yakuwa H., Nojiri K. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1992. Vol. 28. № 3. P. 261–266.
67. Nishizawa S., Sakai A., Amano Y., Matsuzawa T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science*. 1993. Vol. 91. № 1. P. 67–73.
68. Palonen P. Relationship of seasonal changes in carbohydrates and cold hardiness in canes and buds of three red raspberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1999. Vol. 124. № 5. P. 507–513.
69. Panattoni A., Luvisi A., Triolo E. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2013. Vol. 11. № 1. P. 173–188.
70. Panis B., Lambardi M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). *The role of biotechnology*. 2005. Vol. 5. № 7. P. 43–54.
71. Pathirana R., McLachlan A., Hedderley D., Carra A., Carimi F., Panis B. Removal of leafroll viruses from infected grapevine plants by droplet vitrification. *Acta Horticulturae*. 2015. Vol. 1083. P. 491–498

72. Pathirana R., McLachlan A., Hedderley D., Panis B., Carimi F. Pre-treatment with salicylic acid improves plant regeneration after cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) by droplet vitrification. *Acta physiologiae plantarum*. 2016. Vol. 38. № 1. P. 12.
73. Pejić I., Maletić E. Conservation, evaluation and revitalization of native grapevine varieties in Croatia. *Mitteilungen Klosterneuburg*. 2010. Vol. 60. № 3. P. 363–368.
74. Pelsy F. Molecular and cellular mechanisms of diversity within grapevine varieties. *Heredity*. 2010. Vol. 104. № 4. P. 331–340.
75. Plessis P., Leddet C., Collas A., Dereuddre J. Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration: effect of pretreatment, cooling and postculture conditions. *CryoLetters*. 1993. Vol. 14. P. 309–320.
76. Plessis P., Leddet C., Dereuddre J. Resistance to dehydration and to freezing in liquid nitrogen of alginate coated shoot-tips of grape vine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay). *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie 3 Sciences de la Vie*. 1991. Vol. 313. № 8. P. 373–380.
77. Popova E. V., Shukla M., Kim H. H., Saxena P. K. Plant cryopreservation for biotechnology and breeding / *Advances in plant breeding strategies: Breeding, biotechnology and molecular tools* / Editors. Al-Khairi J. M., Jain M., Johnson D. V. Springer, 2015. P. 63.
78. Prystalov A., Bobrova O., Govorova Yu., Rozanov L. Perspectives of vacuum infiltration vitrification (VIV)-cryopreservation in dormant grape buds biobanking. *Europe biobanking week 2019, biobanking for a healthier world*. 8–11 October 2019, Lubeck, German, 2019. P. 26–27.
79. Prystalov A., Bobrova O., Kuleshova L. Cryopreservation of grape buds. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2020. Vol. 30. № 3. P. 292.
80. Reed B. M. The basics of in vitro storage and cryopreservation. *National Clonal Germplasm Repository: Corvallis, OR*. 2002. P.34-46.
81. Reed B. M. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *CryoLetters*. 2001. Vol. 22. № 2. P. 97-104.

82. Reed B. M. Plant Cryopreservation: A Practical Guide. New York : Springer, 2008. 513 p.
83. Reinhoud P. J. Cryopreservation of tobacco suspension cells by vitrification : Doctoral dissertation. 1996.
84. Roubelakis-Angelakis K. A. Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology. New York : Springer, 2010. 610 p.
85. Ruzic D., Vujovic T., Cerovic R. Cryopreservation of cherry rootstock Gisela 5 (*Prunus cerasus* × *Prunus canescens*) shoot tips by droplet-vitrification technique. *Journal of Horticultural Research*. 2013. Vol. 21. № 2. P. 79–85.
86. Sakai A. Conservation of Plant Genetic Resources in vitro / *Conservation of Plant Genetic Resources in Vitro: General aspects* / Editors. Razdan M. K., Cocking M. C. USA : Bib. Orton IICA/CATIE, 1997. P. 53–66.
87. Sakai A., Hirai D., Niino T. Development of PVS-based vitrification and encapsulation–vitrification protocols / *Plant cryopreservation: a practical guide* / Editors. Reed B. M. Berlin : Springer, 2008. P. 33–58.
88. Sakai A., Nishiyama Y. Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen. *HortScience*. 1978. Vol. 13. P. 225–227.
89. Salomão A. N., Santos I. R. I., José S. C. B. R. Cryopreservation of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers seeditors. *Hoehnea*. Vol. 47. e1042019.
90. Sefc K. M., Lopes M. S., Lefort F., et al. Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to access the geographic origin of cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. 2000. Vol. 100. № 3–4. P. 498–505.
91. Shahab M. A. N., Jebelly M., Jafari A. A. Cryopreservation of *Ammodendron persicum* (Bunge ex Boiss.) Seeditors and Evaluation of the Cryogenic Seeditors under Various Conditions. *Journal of Rangeland Science*. 2018. Vol. 8. № 2. P. 103–116.
92. Silva R. C., Luis G. Z., Pereira J. E. S. Short term storage in vitro and large scale propagation of grapevine genotypes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2012. Vol. 47. № 3. P. 344–350.

93. Tanaka D., Niino T., Uemura M. Cryopreservation of Plant Genetic Resources. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018. Vol. 1081. P. 355-369.
94. Teixeira A. S., Faltus M., Zamecník J., Gonzalez-Benito M. E., Molina-Garcia A. D. Glass transition and heat capacity behaviors of plant vitrification solutions. *Thermochimica Acta*. 2014. Vol. 593. P. 43–49.
95. Thinh N.T. Cryopreservation of germplasm of vegetatively propagated tropical monocots by vitrification. Doctoral Paper, Faculty of Agriculture, Kobe University, Japan, 1997.
96. This P., Lacombe T., Mark R. Thomas. Historical origin and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Gen.* 2006. Vol. 22. № 9. P. 511–519.
97. Rasl T., Schalk M., Temsch E., Kodym A. Direct cryopreservation of winter acclimated buds of *Dracocephalum austriacum* (Lamiaceae) from field material. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2020. Vol. 142. P. 167–176.
98. Torregrosa L., Bouquet A., Goussard P. G. In vitro culture and propagation of grapevine / *Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine* / Ed. Roubelakis-Angelakis K. A. New York : Springer, 2001. P. 281–326.
99. Towill L. E., Forsline P. L., Walters C., Waddell J. W., Laufmann J. Cryopreservation of *Malus* germplasm using a winter vegetative buds method: results from 1915 accessions. *CryoLetters*. 2004. Vol. 25. № 5. P. 323–334.
100. Towill L. E., Bonnard R. Cryopreservation of apple using non-desiccated sections from winter-collected scions. *CryoLetters*. Vol. 26. № 5. P. 323-332
101. Uragami A. Cryopreservation of cultured cells of vegetables / *Cryopreservation of Plant Genetic Resources. Technical Assistance Activities for Genetic Resources Projects Ref.* Tokyo, 1993. P. 107–135.
102. Vendrame W., Takane R., Cardoso L., Alvarez L., Tadeu R. Cryopreservation of seeditors of *Melocactus zehntneri* Braun ex Ritter f. and *Cereus gounellei* Luetzelb ex Schum k. by the vitrification method. *Agronomy Science and Biotechnology*. 2020. Vol. 6. P. 1–7.

103. Volis S. How to conserve threatened Chinese plant species with extremely small populations. *Plant Diversity*. 2016. Vol. 38. № 1. P. 45–52.
104. Volk G. M., Walters C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology*. 2006. Vol. 52. P. 48–61.
105. Volynkin V. A. Development of national programmes on plant genetic resources in Southeastern Europe – conservation of grapevine in the Caucasus and Northern Black Sea Region. *Second Project Meeting*. Yalta, Ukraine, 2004. P. 51–55.
106. Vončina D., Badurina D., Preiner D., Cvjetković B., Maletić E., Karoglan K. J. Incidence of virus infections in grapevines from Croatian collection plantations. *Phytopathologia Mediterranea*. 2011. Vol. 50. P. 316–326.
107. Vozovyk K., Bobrova O., Prystalov A., Shevchenko N., Kuleshova L. Amorphous state stability of plant vitrification solutions. *Biologija*. 2020. Vol. 66. № 1. P. 47–53.
108. Vozovyk K., Bobrova O., Shevchenko N., Prystalov A. Stability of amorphous state of plant vitrification solutions. *Smart Bio: Abstract book: International Conference*. 2–4 May 2019, Kaunas, 2019. P. 212.
109. Wang Q. C., Gafny R., Sahar N. et al. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration. *Plant Science*. 2002. Vol. 162. № 4. P. 551–558.
110. Wang Q. C., Tanne E., Arav A., Gafny R. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2000. Vol. 63. № 1. P. 41–46.
111. Wang R. R., Gao X. X., Chen L., Huo L. Q., Li M. F., Wang Q. C. Shoot recovery and genetic integrity of *Chrysanthemum morifolium* shoot tips following cryopreservation by droplet-vitrification. *Scientia Horticulturae*. 2014. Vol. 176. P. 330–339.
112. Wilms H., Sleziak N. F., Van der Auweraer M. et al. Development of a fast and user-friendly cryopreservation protocol for sweet potato genetic resources. *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10. № 1. P. 1–12.

113. Withers L.A., Engelmann F. In vitro conservation of plant genetic resources. *Biotechnology in Agriculture*. New York : Marcel Dekker, 1998. P. 57-88.
114. Zamecnik J, Faltus M, Bilavcik A, Kotkova R. Comparison of cryopreservation methods of vegetatively propagated crops based on thermal analysis / *Current Frontiers in Cryopreservation* / editor Igor Katkov. 2012 P: 333–358.
115. Zhao Y., Wu Y., Engelmann F., Zhou M., Chen S. Cryopreservation of apple in vitro shoot tips by the droplet freezing method. *CryoLetters*. 1999. Vol. 20. P. 109-112.
116. Zohary D., Hopf M. Domestication of plants in the old world: the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley. Oxford University, 2000. 340 p.
117. Žulj Mihaljević M., Šimon S., Pejić I., et al. Molecular characterization of old local grapevine varieties from South East European countries. *Vitis*. 2013. Vol. 52. № 2. P. 69-76.
118. Арестова. Н. О. Биологические и анатомо-физиологические особенности сортов винограда как показатель морозостойкости и аффинитета: автореф. дис. на здобуття наукового ступеня канд. с.-г. наук. Новочеркасск, 1997. 28 с.
119. Бабуш В. И. Повышение жаростойкости виноградных прививок, подлежащих парафинированию. *Садоводство, виноградарство и виноделие Молдавии*. 1981. № 2. С.30–31.
120. Баламирзоева З. М. Биологические аспекты ускоренного размножения винограда в условиях Дагестана: автореф. дис. на здобуття наукового ступеня доктора біол. Наук. Краснодар, 2005. С.24.
121. Баламирзоева З. М. Размножение винограда одревесневшими черенками с использованием искусственного тумана в условиях Дагестана. *Регулирование роста, развития и продуктивности растений* : материалы Международной научной конференции. 8–10 октября 2003, Минск, 2003. С. 84–85.

122. Белоус І. В. Стратегія розвитку виноградарства і виноробства України та передумови виходу їх продукції на світовий ринок. Одеса: ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова», 2015. 204 с.

123. Борисенко М. Н., Палеха А. Г., Волнов Ю. В. Влияние продолжительности вымочки подводных черенков на выход привитых виноградных саженцев. *Магарац. Виноградарство и виноделие*. 2006. №3. С. 12–14.

124. Вержук В. Г. та ін. Оценка жизнеспособности геноплазмы плодовых культур после криосохранения в парах жидкого азота при – 183–185°C. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2013. Т. 13 С. 27–29.

125. Вержук В.Г. та ін. Влияние эндогенных веществ моно- и дисахаридов на жизнеспособность плодовых растений после хранения в парах жидкого азота. *Плодоводство и ягодоводство России*. 2011. Т. 26. С. 17–23.

126. Вержук В. Г., Павлов А. В. Орлова С. Ю., Дорохов Д. С. Котов В. М. Жизнеспособность побегов яблони, груши и обработанных криопротекторами почек черемухи после хранения в жидком азоте. *Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств»*. 2014. № 1. С. 1–8.

127. Высоцкая О. Н. Криосохранение апексов земляники (*Fragaria L.*), изолированных из растений *in vitro*. *Плодоводство и ягодоводство России*. 2011. Т. 26. С. 138–144.

128. Генкель П. А., Окнина Е. З. О физиологии состояния покоя и способах его диагностики. *Физиология состояния покоя у растений: сборник статей*. Москва, 1980. - С. 29–54.

129. Гоголь-Янковский Г. И. Руководство по виноградарству. Москва : Госиздат, 1928. 555 с.

130. Горбунов Л. В., Шиянова Т. П., Рябчун В. К. Оптимізація умов дегідратації живців плодово-ягідних культур. *Генетичні ресурси рослин*. 2008. №5. С. 182–187.

131. Госебашвили М., Пхаладзе Л., Иванишвили Н., Магаришвили Г. Изучение качества приживаемости прививок на основе флуоресценции тканей винограда. *Сообщения Академии наук Грузии*. 2000. № 7. С. 31–33.
132. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. Москва : Агропромиздат, 1985. 351 с.
133. Жуков А. И. Прогрессивные приемы получения виноградных саженцев. *Проблемы развития, виноградарства, в Краснодарском крае*: сборник статей. Новочеркасск, 1984. С. 18–23.
134. Жуков А. И., Ильин В. И., Татасян А. А. Защита посадочного материала от иссушения. *Садоводство*. 1970. № 12. С.33.
135. Жуков А. И., Перов А. Н. Система ведения культуры винограда на основе агротехнических приемов. Анапа, 2001. 23 с.
136. Жумагулова Ж. Б., Фролов С. Н., Кампитова Г. А. Криосохранение меристем различных сортов груши. *Известия Национальной академии наук Республики Казахстан*. 2014. Т. 6. № 24. С. 34–38.
137. Заключний звіт НДР «Техніко-економічне та екологічне обґрунтування розміщення виноградників, моніторинг їх стану, ведення кадастру виноградників Одеської області» пріоритетне завдання Регіональної програми розвитку агропромислового комплексу Одеської області на 2014-2018 роки. Одеса : ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова», 2015. 120 с.
138. Зинченко А. В. Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур $-150^{\circ}\text{C} \div 0^{\circ}\text{C}$: автореф. дисс. на соискание научн. степени канд. физ.-мат. наук : спец. 01.04.15. Киев, 1983. 20 с.
139. Златковская Т. Д. О начальном периоде истории Тир. *Советская археология*. 1959. № 2. С. 61.
140. Кожухарь В. С. Эффективные приемы агротехники выращивания привитых виноградных саженцев. *Садоводство, виноградарство и виноделие Молдавии*. 1985. № 5. С. 10–13.
141. Колесник Л. В. Физиологические основы прививки винограда. Кишинев, 1956. 223 с.

142. Кондо И. Н. Динамика морозостойкости винограда на протяжении холодных месяцев. *Труды МолдНИИ садоводства, виноградарства и виноделия*. 1960. № 6. С. 165–170.

143. Кондо И. Н., Пудрикова Л. П. Результаты биохимического изучения побегов винограда в осенне-зимние месяцы. *Труды МолдНИИ садоводства, виноградарства и виноделия*. 1969. № 15 С. 52–104.

144. Лойко Р. Э. Северный виноград. Москва: МСП, 2003. 256 с.

145. Лысак Ю. С., Присталов А. И., Стрибуль Т. Ф., Ходько А. Т. Низкотемпературное консервирование меристем винограда. *Виноградарство и виноделие*. 2011. Т. 61. № 2. С. 5–6.

146. Макаревская Е. А. Физиология регенерационных процессов у черенков виноградной лозы. *Рост растений*. Львов, 1959. 214 с.

147. Малтабар Л. М., Унгурияну С. И. К вопросу насыщения черенков водой способом вакууминfiltrации *Садоводство, виноградарство и виноделие Молдавии*. 1969. № 12. С. 33–35.

148. Малтабар Л. М., Букатарь П. И., Тихвинский И. Н. Значение влажности черенков при выращивании виноградных саженцев. *Садоводство, виноградарство и виноделие Молдавии*. 1966. № 20. С. 38–41.

149. Малтабар Л. М., Тихвинский И. Н., Букатарь П. И. Парафинирование виноградных прививок. *Садоводство, виноградарство и виноделие Молдавии*. 1966. № 4. С. 37–41.

150. Малых П. Г. Хранение черенков и выращивание саженцев винограда с применением антитранспирантов : дис. ... канд. с.-г. наук : 06.01.07. Новочеркасск, 2007. 142 с.

151. Мамаров П. Т. Мировой опыт в производстве посадочного материала винограда. София, 1970. 36 с.

152. Мишуренко А. Г., Шерер В. А., Овчинникова Л. Ф. Зимостойкость винограда. Киев : Урожай, 1975. 176 с.

153. Молодкин В. Ю. Значение влажности семян некоторых зерновых и зерновых бобовых культур при криоконсервации в жидком азоте. *Бюллетень ВИР*. 1986. № 165. С. 22-24.

154. Молодкин В. Ю. Методы консервации семян культурных растений при низких и сверхнизких температурах : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. с.-г. наук. Л., 1987. 18 с.
155. Недов П. Н. Новые методы фитопатологических и иммунологических исследований в виноградарстве. Кишинев: Штиинца, 1985. 138 с.
156. Павлов А. В., Поротников И. В., Вержук В. Г., Воробейков Г. А. Сохранение селекционного материала плодовых и ягодных культур при сверхнизких температурах. *Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств»*. 2016. № 1. С. 55–60.
157. Петин Н. С. Взаимосвязь водного режима и некоторых физиологических процессов растений с их продуктивностью в условиях различного водоснабжения. *Водный режим растений в связи с обменом веществ и продуктивностью*. 1963. С. 3–22.
158. Плеханова М. Н. Коллекции генетических ресурсов плодовых и ягодных культур: структура и проблемы сохранения в живом виде. *Мичуринские чтения : материалы конференции*. Мичуринск, 2002. С. 4.
159. Погосян С. А., Хачатрян С. С. Селекция столовых и технических сортов винограда. Ереван, 1983. 58 с.
160. Полулях А. А., Волинкін В. О. Генетичні ресурси винограду України: збереження, вивчення і використання. *Генетичні ресурси рослин*. 2008. № 5. С. 23–34.
161. Присталов А. И., Бондарь И. Н., Полулях А. А., Лиховской В. В. Виноградарство Слобожанщины: история, проблемы, перспективы создания и сохранения коллекций. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія : Біологія*. 2014. Вип. 20. № 1100. С. 53–60.
162. Присталов А. И., Кулешова Л. Г., Боброва Е. Н. Насыщение изолированных почек винограда витрифицирующим раствором методом вакуум-инфильтрации. *Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології : матеріали V Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених, 7–8 листопад 2018, Вінниця, 2018*. С. 159-161.

163. Присталов А. И., Кулешова Л. Г., Боброва Е. Н. Стабильность аморфного состояния витрифицирующихся сред для криоконсервирования растительных объектов. *Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології* : матеріали V Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених, 7–8 листопад 2018, Вінниця, 2018. С. 161-163.

164. Присталов А. И., Кулешова Л. Г. Альтернативные способы обработки виноградников. *Галузеві проблеми екологічної безпеки*: збірник матеріалів IV Міжнародної науково-практичної конференції студентів, магістрантів та аспірантів, 19 жовтня 2018, Харків, 2018. С. 151.

165. Присталов А. И., Боброва О. М., Кулешова Л. Г. Comparative evaluation of the saturation efficiency of isolated grape buds with cryoprotectants. *13 IMBG all- Ukrainian conference of young scientists*. 22-25 May 2019, Kyiv, 2019. P. 24–25.

166. Присталов А. И., Кулешова Л. Г. Розробка примусового насичення живців винограду різними середовищами методом вакуум-інфільтрації. *International research and practice conference “Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences”* : матеріали конференції. 27-28 December 2017, Lublin, 2017. P. 278–282.

167. Присталов А. И., Кулешова Л. Г., Боброва О. М., Зеленьянська Н. М. Ефективність метода вакуум-інфільтрації для насичення різними розчинами рослинних об'єктів трубчасто-капілярної структури. *Вісник проблем біології і медицини*. 2020. Т. 4. № 158. С. 65-69.

168. Присталов АІ, Кулешова ЛГ, Розанов ЛФ, винахідники. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Пристрій для вакуум-інфільтрації живців плодово-ягідних культур: пат. 121556 Україна. № 201705937; заявл. 14.06.2017; опубл. 11.12.2017, Бюл. № 23.

169. Присталов АІ, Шевченко НО, Зеленьянська НМ, Кулешова ЛГ, винахідники. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб відмивання живців плодово-ягідних культур від

криозахисних середовищ: пат. 136543 Україна. № 201901934; заявл. 26.02.2019; опубл. 27.08.2019, Бюл. №16.

170. Присталов А. І. Вплив рівня вологості гермплазми винограду на її життєздатність після різних способів і термінів гіпотермічного зберігання. *Проблеми кріобіології та кріомедицини*. 2017. Т. 27. № 2. С. 181.

171. Раджабов А. К. Формирование продуктивности и качества винограда: агротехнические, сортовые и экологические особенности : дис. ... доктора с.-х. наук : 06.01.08. Москва, 2000. 301 с.

172. Радчевский П. П. Ускоренное размножение столового винограда: буклет. Москва : Россельхозиздат, 1987. 12 с.

173. Русяева А. С. Земледельческие культы в Ольвии догетского времени. Київ : Наукова думка, 1979. 172 с.

174. Рыжик И. В. Оценка метаболической активности клеток фукусовых водорослей тетразолиевым методом. *Algologia*. 2013. V. 23. № 1. С. 10–18.

175. Сафина Г. Ф. Влияние низких и сверхнизких температур на жизнеспособность семян плодовых и ягодных растений. *Вестник ВОГиС*. 2008. Т. 12. № 4. С. 38–45.

176. Смирнов К. В., Малтабар Л. М., Раджабов А. К., Матузок А. М. Виноградарство. Москва : Изд-во МСХА, 1998. 510 с.

177. Стрибуль Т. Ф., Лысак Ю. С., Присталов А. И., Коваленко И. Ф. Исследование динамики насыщения меристем винограда криозащитными средами. *Криоконсервация, как способ сохранения биологического разнообразия. Биофизика живой клетки*: зб. матеріалів доп. учасн. 28–30 октября 2008, Пушино. 2008. С. 125.

178. Стрибуль Т. Ф., Шевченко Н. А., Присталов А. И., Лысак Ю. С. Методы получения сверхбыстрых скоростей охлаждения биологических объектов. *Криоконсервация, как способ сохранения биологического разнообразия. Биофизика живой клетки*: зб. матеріалів доп. учасн. 28–30 октября 2008, Пушино. 2008. С. 126.

179. Туманов И. И. Физиология закаливания и морозостойкость растений. Москва : Наука, 1979. 350 с.
180. ФАО. Проект стандартов банков генов генетических ресурсов растений для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства. Издание второе, исправленное и дополненное. Рим 2015.
181. Феофанов А. В. Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях. *Успехи биологической химии*. 2007. Т. 47. С. 371–410.
182. Чернобай Н. А., Шевченко Н. О., Присталов А. І., Каднікова Н. Г. Кріоконсервування генетичних ресурсів рослин в Україні. *Біологія рослин та біотехнологія* : збірник матеріалів доповідей учасників третьої конференції молодих вчених. 16–18 травень 2017, Київ, 2017. С. 19.
183. Шевченко НО, Присталов АІ, Стрибуль ТФ, винахідники. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Лабораторний пристрій для вакуум-інфільтрації живців плодово-ягідних культур: пат. 85644 Україна. № 201307024; заявл. 04.06.2013; опубл. 25.11.2013, Бюл. № 22.
184. Шевченко НО, Присталов АІ, Стрибуль ТФ, винахідники. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб отримання високих швидкостей охолодження біологічних об'єктів: пат. 38896 Україна. № 200810002; заявл. 01.08.2008; опубл. 26.01.2009, Бюл. № 2.
185. Шевченко НО, Присталов АІ, Стрибуль ТФ, винахідники. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб отримання високих швидкостей охолодження біологічних об'єктів: пат. 38895 Україна. № 200810001; заявл. 01.08.2008; опубл. 26.01.2009, Бюл. № 2.

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Статті у фахових журналах України

1. **Присталов А. І.**, Кулешова Л. Г., Боброва О. М., Зеленьянська Н. М. Ефективність метода вакуум-інфільтрації для насичення різними розчинами рослинних об'єктів трубчасто-капілярної структури. Вісник проблем біології і медицини. 2020. Т. 4. № 158. С. 65-69. (*Google Scholar, Index Copernicus, Crossref*) DOI: 10.29254/2077-4214-2020-4-158-65-69

2. **Присталов А. И.**, Бондарь И. Н., Полулях А. А., Лиховской В. В. Виноградарство Слобожанщины: история, проблемы, перспективы создания и сохранения коллекций. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія : Біологія. 2014. Вип. 20. № 1100. С. 53–60. (*Google Scholar, WorldCat, Crossref, Web of Science*)

Статті в наукових журналах інших країн

3. Vozovyk K., Bobrova O., **Prystalov A.**, Shevchenko N., Kuleshova L. Amorphous state stability of plant vitrification solutions. *Biologija*. 2020. Vol. 66. № 1. P. 47-53.

Статті в збірках матеріалів конференцій

4. **Присталов А. І.**, Кулешова Л. Г. Розробка примусового насичення живців винограду різними середовищами методом вакуум-інфільтрації. International research and practice conference “Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences” : матеріали конференції. 27-28 December 2017, Lublin, 2017. P. 278–282.

5. **Присталов А. И.**, Кулешова Л. Г., Боброва Е. Н. Насыщение изолированных почек винограда витрифицирующимся раствором методом вакуум-инfiltrации. Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології : матеріали V Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених, 7–8 листопад 2018, Вінниця, 2018. С. 159-161.

6. **Присталов А. И.**, Кулешова Л. Г., Боброва Е. Н. Стабильность аморфного состояния витрифицирующихся сред для криоконсервирования растительных

об'єктів. Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології : матеріали V Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених, 7–8 листопад 2018, Вінниця, 2018. С. 161-163.

Тези конференцій

7. Лысак Ю. С., **Присталов А. И.**, Стрибуль Т. Ф., Ходько А. Т. Низкотемпературное консервирование меристем винограда. Виноградарство и виноделие. 2011. Т. 61. № 2. С. 5–6.
8. **Prystalov A.**, Bobrova O., Govorova Yu., Rozanov L. Perspectives of vacuum infiltration vitrification (VIV)-cryopreservation in dormant grape buds biobanking. Europe biobanking week 2019, biobanking for a healthier world. 8–11 October 2019, Lubeck, German, 2019. P. 26–27.
9. Стрибуль Т. Ф., Шевченко Н. А., **Присталов А. И.**, Лысак Ю. С. Методы получения сверхбыстрых скоростей охлаждения биологических объектов. Криоконсервация, как способ сохранения биологического разнообразия. Биофизика живой клетки: зб. матеріалів доп. учасн. 28–30 октября 2008, Пущино. 2008. С. 126.
10. Стрибуль Т. Ф., Лысак Ю. С., **Присталов А. И.**, Коваленко И. Ф. Исследование динамики насыщения меристем винограда криозащитными средами. Криоконсервация, как способ сохранения биологического разнообразия. Биофизика живой клетки: зб. матеріалів доп. учасн. 28–30 октября 2008, Пущино. 2008. С. 125.
11. Чернобай Н. А., Шевченко Н. О., **Присталов А. И.**, Каднікова Н. Г. Кріоконсервування генетичних ресурсів рослин в Україні. Біологія рослин та біотехнологія : збірник матеріалів доповідей учасників третьої конференції молодих вчених. 16–18 травень 2017, Київ, 2017. С. 19.
12. **Присталов А. И.** Вплив рівня вологості гермплазми винограду на її життєздатність після різних способів і термінів гіпотермічного зберігання. Проблеми кріобіології та кріомедицини. 2017. Т. 27. № 2. С. 181.
13. **Присталов А. И.**, Кулешова Л. Г. Альтернативные способы обработки виноградников. Галузеві проблеми екологічної безпеки: збірник матеріалів IV Міжнародної науково-практичної конференції студентів, магістрантів та аспірантів, 19 жовтня 2018, Харків, 2018. С. 151.

14. **Приста́лов А. І.**, Боброва О. М., Кулешова Л. Г. Comparative evaluation of the saturation efficiency of isolated grape buds with cryoprotectants. 13 IMBG all- Ukrainian conference of young scientists. 22-25 May 2019, Kyiv, 2019. P. 24–25.
15. Vozovyk K., Bobrova O., Shevchenko N., **Prystalov A.** Stability of amorphous state of plant vitrification solutions. Smart Bio: Abstract book: International Conference. 2-4 May 2019, Kaunas, 2019. P. 212.
16. **Prystalov A.**, Bobrova O., Kuleshova L. Cryopreservation of grape buds. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2020. Vol. 30. № 3. P. 292.

Патенти України на корисну модель

17. Шевченко Н. О., **Приста́лов А. І.**, Стрибуль Т. Ф., винахідники. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб отримання високих швидкостей охолодження біологічних об'єктів: пат. 38896 Україна. № 200810002; заявл. 01.08.2008; опубл. 26.01.2009, Бюл. № 2.
18. Шевченко Н. О., **Приста́лов А. І.**, Стрибуль Т. Ф., винахідники. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб отримання високих швидкостей охолодження біологічних об'єктів: пат. 38895 Україна. № 200810001; заявл. 01.08.2008; опубл. 26.01.2009, Бюл. № 2.
19. Шевченко Н. О., **Приста́лов А. І.**, Стрибуль Т. Ф., винахідники. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Лабораторний пристрій для вакуум-інфільтрації живців плодово-ягідних культур: пат. 85644 Україна. № 201307024; заявл. 04.06.2013; опубл. 25.11.2013, Бюл. № 22.
20. **Приста́лов А. І.**, Кулешова Л. Г., Розанов Л. Ф., винахідники. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Пристрій для вакуум-інфільтрації живців плодово-ягідних культур: пат. 121556 Україна. № 201705937; заявл. 14.06.2017; опубл. 11.12.2017, Бюл. № 23.

21. **Приста́лов А. І.**, Шевченко Н. О., Зеленьянська Н. М., Кулешова Л. Г., винахідники. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб відмивання живців плодово-ягідних культур від кріозахисних середовищ: пат. 136543 Україна. № 201901934; заявл. 26.02.2019; опубл. 27.08.2019, Бюл. №16.

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Матеріали дисертаційної роботи були представлені на наступних конференціях:

XIX міжнародна конференція «Консервация генетических ресурсов» (Росія, Пущино, 2008);

Міжнародна науково-практична конференція «Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences» (Польща, Люблин, 2017);

41 конференція молодих вчених ІПКіК НАН України спільно з кафедрою UNESCO «Холод в біології і медицині» (Україна, Харків, 2017);

IV міжнародна науково-практична конференція студентів, магістрантів та аспірантів «Галузеві проблеми екологічної безпеки» (Україна, Харків, 2018);

V міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології» (Україна, Вінниця, 2018);

13-та всеукраїнська конференція молодих вчених (Україна, Київ, 2019);

Міжнародна конференція «Смарт Біо» (Литва, Каунас, 2019);

Міжнародна конференція «Europe biobanking week» (Німеччина, Любек, 2019);

44 конференція молодих вчених ІПКіК НАН України спільно з кафедрою UNESCO «Холод в біології і медицині» (Україна, Харків, 2020).

ДОДАТОК Б

ДО РОЗДІЛУ 3



Старі герби міста Чугуїв та Ізюм.



Велику популярність здобув цикл робіт фотографа О. М. Іваніцького - «Крах Царського поїзда біля станції Борки під Харковом у 1888 році».



Дом "Дача Іваницького" ("Хутір") около с. Гайдари, Змиевского р-на.

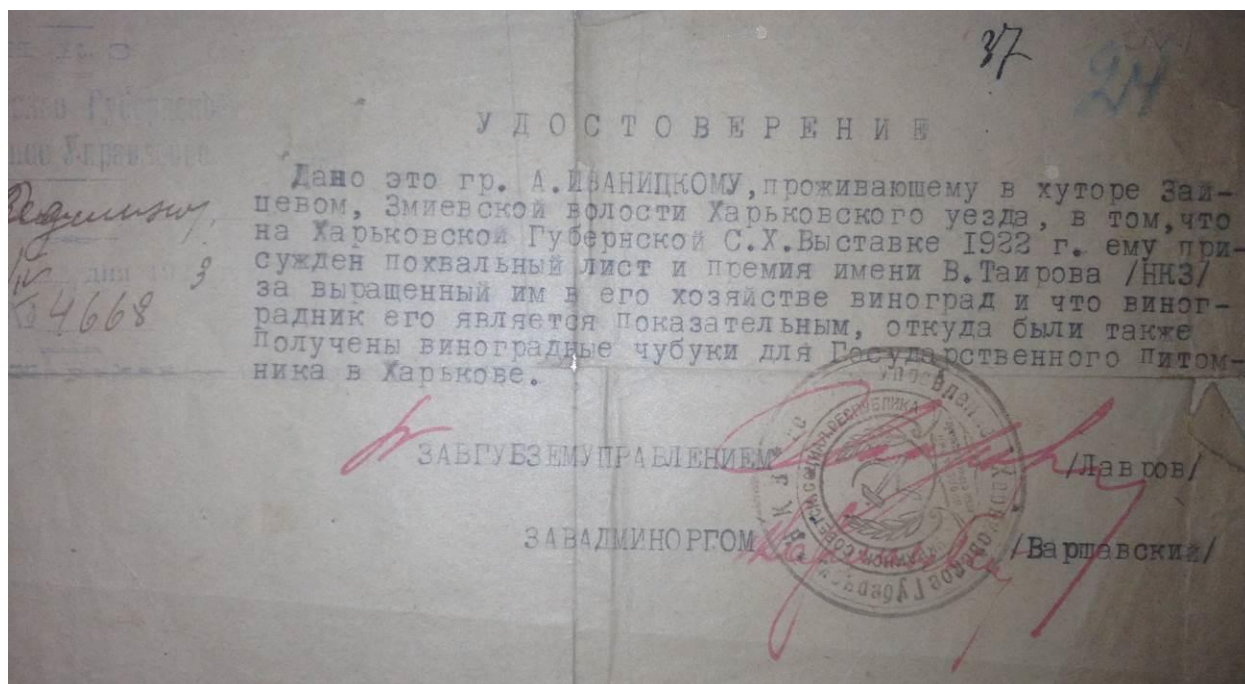
За цю роботу Імператор Олександр III подарував Олексію Михайловичу Іваніцькому ділянку землі на високому правому березі Сіверського Дінця у селища Гайдари, Зміївського уїзду, де на початку XX століття був побудований будинок з мезоніном.



Молодой виноградник на "Хуторе", заложенный Александром Іваницьким еще в бытность его студентом естественного отделения физ.мат. ф-та Харьковского Императорского университета

На фото О.О. Іваніцький –юнкер Ніколаєвського кавалерійського училища в С. П. та його сестра Ніна (1915р.).

Молодший син Олександр з дитинства захоплювався сільським господарством. Ще будучи студентом біологічного відділення фізико - математичного факультету Харківського Імператорського університету він перетворив Хутір в показове сільськогосподарське багатогалузеве мале підприємство.

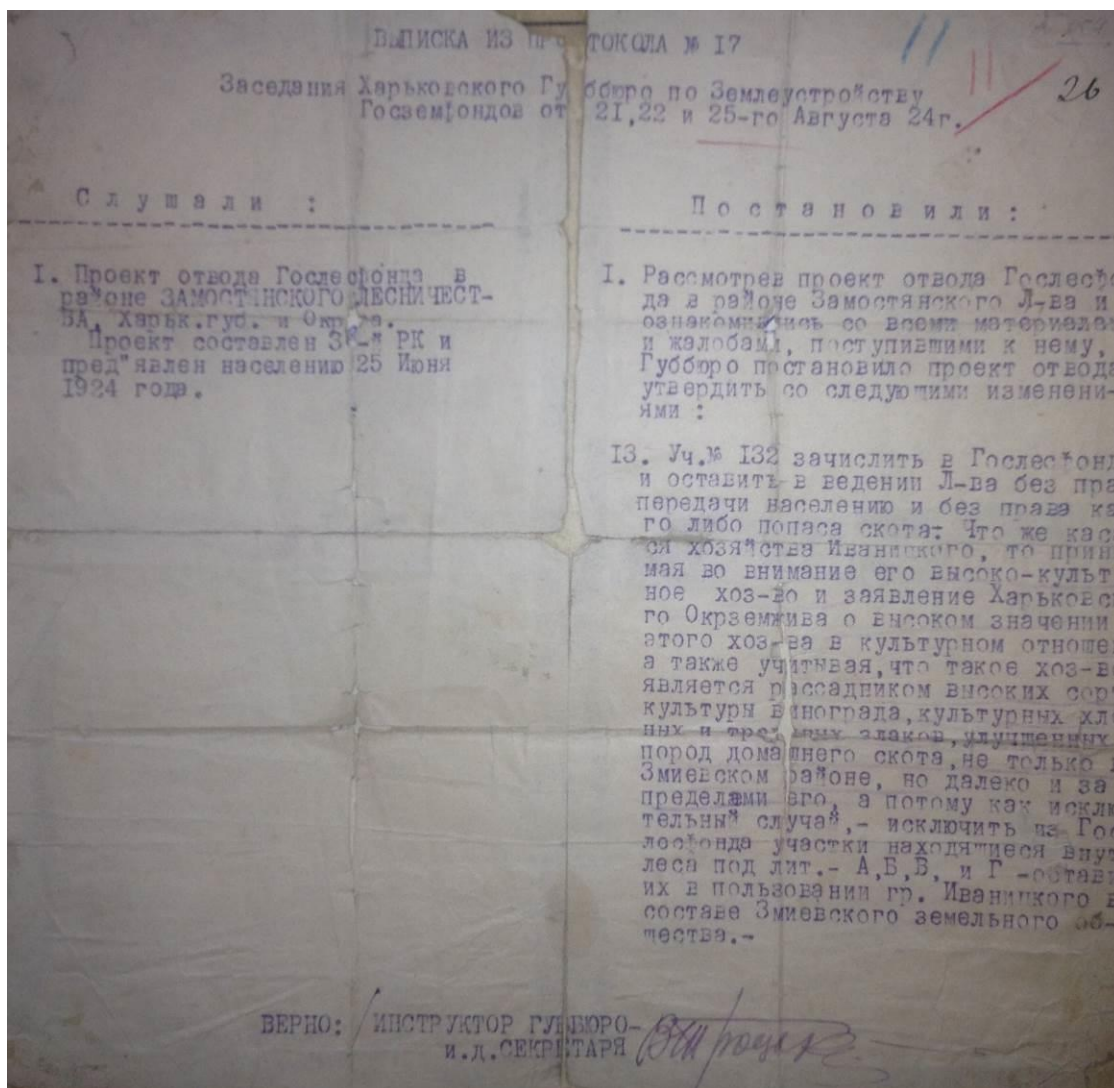


За видатний вклад у виноградарство та створення нових перспективних гібридів, придатних для північного культивування у 1922 р на Харківській губернській С.Х. виставці Олександр був нагороджений похвальним листом і премією ім. Таїрова (Народного комісаріату землеробства).

Уже за радянських часів (1924 г.) його господарство було розсадником нових злакових, великої рогатої худоби і птиці, цінних сортів плодових дерев і винограду, що зробило його відомим далеко за межами Зміївського уїзду. Чубуками з його виноградників було закладено Державний розплідник у Харкові.

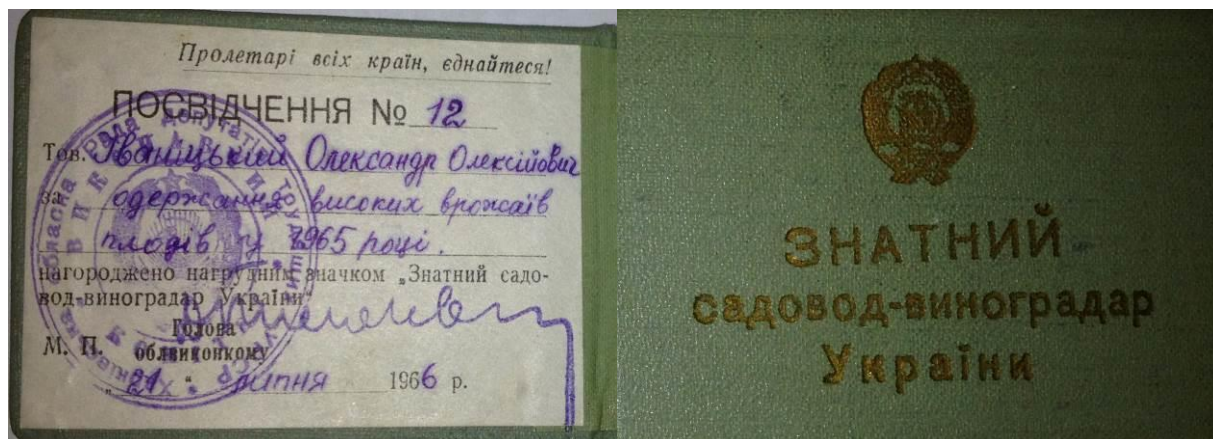


У 1925 році О.О. Іваніцький став дійсним членом Харківського товариства випробувачів природи.

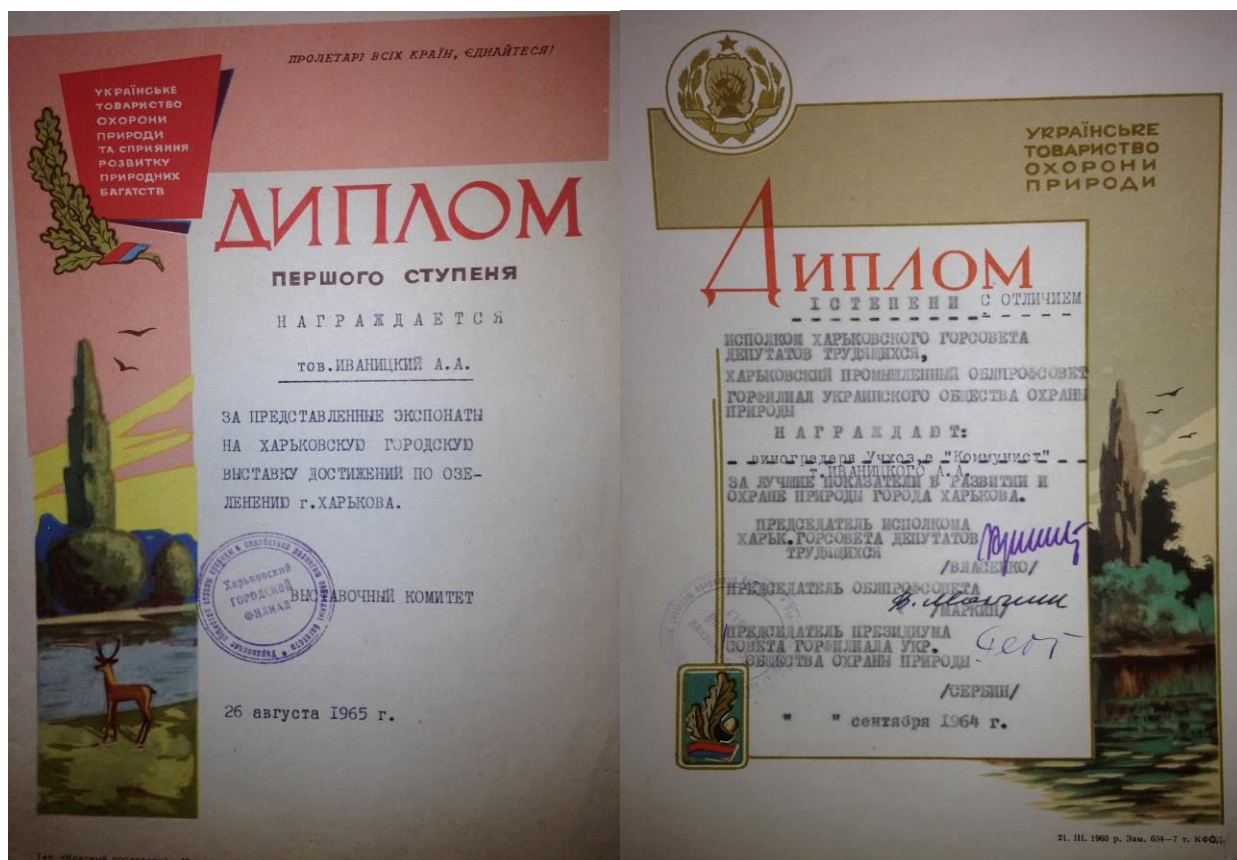


У 1924 р Олександра позбавляють виборчих прав, але на захист господарства встали офіційні сільськогосподарські організації, але вже у 1930 р Олександр знову був позбавлений виборчих прав з втратою усього господарства. А лози виноградаря, який лишився догляду, стали обвивати крони зростаючого підліска.

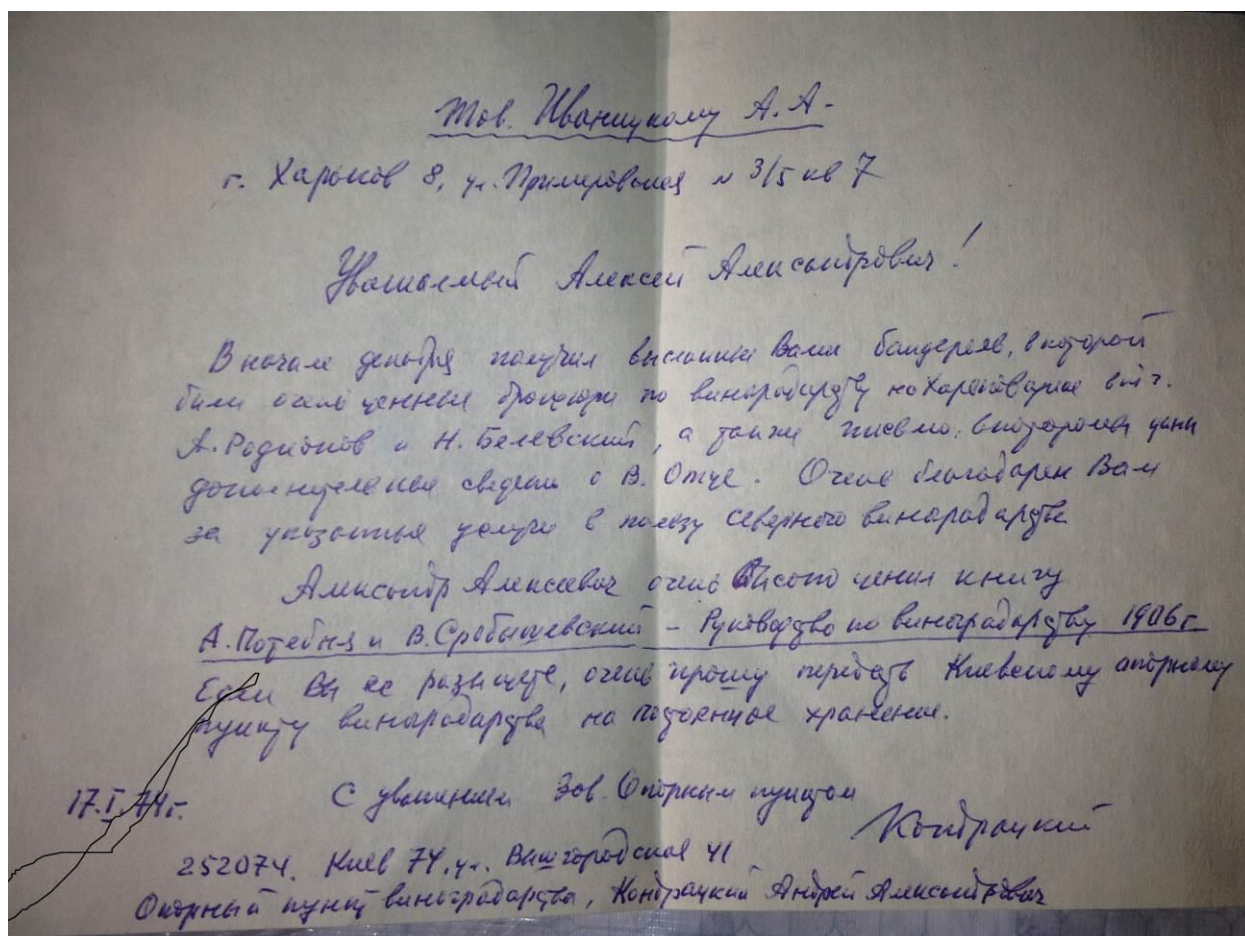
У подальшому О.О.Іваніцький багато зробив для відродження виноградарства на теренах Слобожанського краю, що зафіксовано у багатьох документах.



За значний внесок у розвиток виноградарства України, у 1965 році О. О. Іваніцький був нагороджений званням «Відомий садівник-виноградар України».



На фото Іваніцький Олександр Олексійович, агроном-виноградарь навчального господарства "Коммунист" Харківського сількогосп. інститута ім. Докучаєва, 1960-і роки та нагрудна відзнака.



Слід зазначити, що записи, щоденники, замітки А.А. Іваницького були посмертно передані його сином Олексієм Олександровичем Іваницьким завідувачу Київського опорного пункту Українського НДІ виноградарства і виноробства ім. В.С. Таїрова Кондрацькому О. О., що сприяло створенню цілого ряду сортів, призначених для північних районів України.

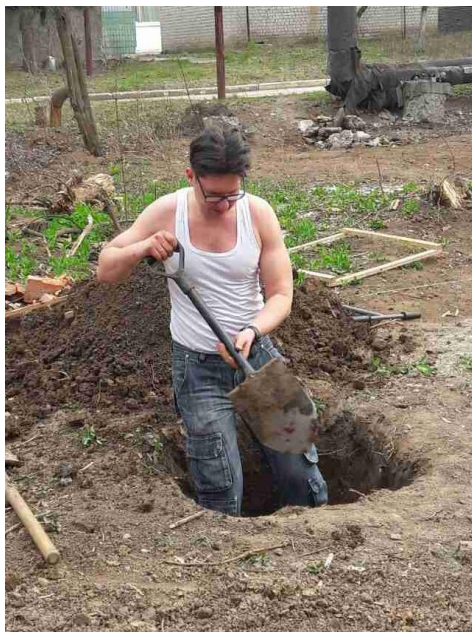


Обговорення створення майбутньої ампелографічної колекції поблизу селища Гайдари.

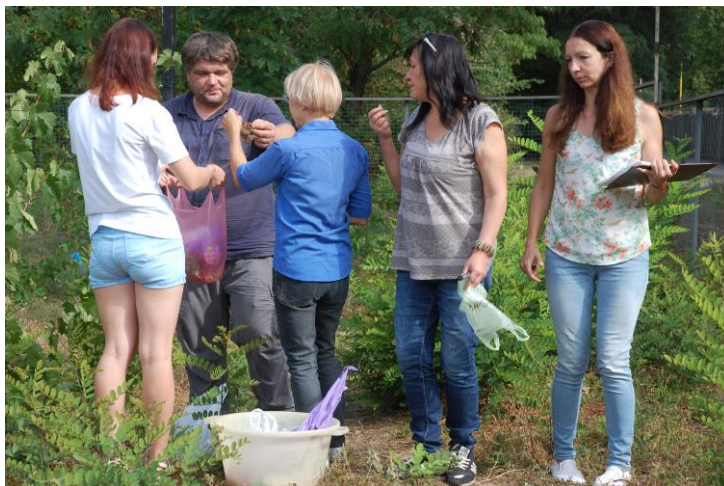
Професор Ю. Г. Шкорбатов, О. О. Іваницький (Олексій Олександрович - син), А. І. Присталов (аспірант).



Культивація ґрунту, друга закладка виноградника та укриття молодий колекції для зимівлі поблизу с. Гайдари (Біологічна станція ХНУ ім. В. Н. Каразіна).



Роботи по створенню ампелографічної колекції ІПКіК НАН України.



Роботи по підтриманню ампелографічної колекції ІПКіК НАН України.

ДОДАТОК В

Перелік сортів у ампелографічній колекції при Біологічній станції ХНУ ім В.Н. Каразіна

№	Назва сорту	Оригінатор	LT50-100, °C
1	Мускат Голодриги	НВФ «Ампелос», Україна	-19...-22
2	Подарок Магарача	(Ркацителі х Магарач 2-57-72 (Мцване кахетинський х Сочинський чорний) "Магарач", Україна	-23...-26
3	Цитронний Магарача	((Мадлен Анжевін х "Магарач 124-66-26 (Ркацителі х Магарач 2-57-72) "Магарач", Україна	-23...-26
4	Спартанець Магарача	(Зейбель 18-666 х Сапери Северний) "Магарач", Україна	-19...-22
5	Голубок	(Северний х смесь пильці сортів 40 лет Октябрі, Одеський ранній і № 1-17-54 (Аликант Буше х Каберне Совіньон)). ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна	-23...-26
6	Ароматний	ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна (Вертиш чилага × Ромулус)	-23...-25
7	Рислинг Магарача	(Рислинг рейнський х Сейв Виллар 12-309) "Магарач", Україна	-23...-26
8	Антей Магарачський	"Магарач", Україна	-23...-26
9	Мускат Голодриги	(Королева виноградників х Магарач 124-66-26) НВФ «Ампелос», Україна	-19...-22
10	Мускат Оттонель	(Шасла х невідомий мускатний сорт) Франція 1852 р. Р. Море	-19...-22
11	Ріпарія Рупестрис 101/14	(Витис Ріпарія *Витис Рупестрис) Франція	-30...-35
12	Руський Конкорд	(Конкорд*амурський виноград) І. В. Мічурін, Росія	-28...-32
13	Загрей	ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна (Овідіопольський × Мускат розовий)	-23...-26
14	Флейм сидлис	(Кишмиш білий овальний, Кардинал, Сенсо і др) США, Каліфорнія	-19...-22
15	Эйнсет сидлис	(Фредонія х Каннер (Хуниця х Кишмиш білий овальний)) США, Нью-Йорк	-27...-30
16	Ванеса	(Сенека х NY 45910) Канада	-27...-30
17	Кишмиш Лучистий	(Кардинал х Кишмиш розовий) "Віерул", Молдова	-15...-18
18	Кишмиш Іртишар	(Нимранг х Кишмиш чорний) НПО ім. Р. Р. Шредера, Узбекистан	-19...-22
19	Кишмиш Мускатний	(Мускат александрійський х Кишмиш білий) НПСВіВ Узбекистан	-15...-18
20	Кишмиш Узунбашли	Невідоме походження	-15...-18
21	Кишмиш Молдавський	(Победа х Кишмиш розовий) НИИВіВ НПО "Віерул", Молдова	-19...-22
22	Кишмиш Таїровський	ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна (Королева виноградників × Суміш пилку)	-19...-22
23	Юпитер	Університет штату Арканзас, США	-27...-29
24	Lakemont	(Онтаріо х Султаніна), США	-25...-27
25	Ромулус	(Онтаріо х Кишмиш білий) США	-23...-26
26	Слав'янка	(Бикан х Султаніна) ВСИ "Г. Димитров", м. Софія, Болгарія	-15...-18
27	Загадка	(Геркулес *Дат'є де Сен-Вальє) ІВіВ Таїрово, Україна	-23...-26
28	Флора	ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна	-19...-22
29	Рута	(Талисман х Кишмиш лучистий) В.В. Загорюлько, Україна	-19...-22
30	Кодрянка	"Віерул", Молдова	-19...-22
31	Руський раній	(Шасла Северна х Мичуринець) ВНПВіВ ім. Я.І. Потапенко, Росія	-19...-22
32	Фрумоаса албе	(Гузаль кара х Сейв Виллар 20-473) "Віерул", Молдова	-19...-22

33	Жемчуг Саба	Венгрія	-19...-22
34	Іванна	(Подарок Запорожью х Кишмиш лучистый) В.В. Загорулько, Україна	-19...-22
35	Пам'яти Негруля	(Корна нягра х Датъе де Сен-Валье) "Вієрул", Молдова	-23...-26
36	ПГ-12	((Ката-Курган х Кировабадский столовый) х Антей Магараца) "Магарац", Україна	-19...-22
37	Оригінал	ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна	-19...-22
38	Айгезард	(Катта Курган х Паркент) Армянский НІВВіП	-15...-18
39	Аркадія	(Молдова х Кардинал) ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна	-19...-22
40	Водограй	(Аркадія х Кишмиш лучистый) В. В. Загорулько, Україна	-19...-22
41	Восторг	((Заря севера х Долорес) х Русский ранний) ВНПВіВ ім. Я.І. Потапенко, Росія	-23...-26
42	Грочанка	(Жемчуг Саба х Карабурну) Югославія	-15...-18
43	Італія	(Бикан х Мускат гамбургский)	-15...-18
44	Кеша	(Фрумоаса Албэ х Восторг) ВНПВіВ ім. Я.І. Потапенко, Росія	-23...-26
45	Мускат Літній	(Пьеррель х Королева виноградников) "Вієрул", Молдова	-19...-22
46	Маршальський	(Катта-Курган х Победа) "Вієрул", Молдова	-19...-22
47	Мускат Янтарний	(Ранний Кибрайский х Мускат восточный) Среднеаз.ОС ВІР, "Вієрул", Молдова	-19...-22
48	Одеський Сувенір	(Молдавський х Мускат гамбургский). ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна	-15...-18
49	Олімпіада	(Якдона х Жемчуг Саба) ВНПВіВ ім. Я.І. Потапенко, Росія	-15...-18
50	Плевен	(Італія х Янтарь) Болгарія	-15...-18
51	Страшенський	((Дружба х Катта-Курган х Додреляби)хМускат де Сен-Валье)"Вієрул", Молдова	-19...-22
52	Супер ран Болгар	(Італія х Янтарь) ІВіВ м. Плевен, Болгарія	-15...-18
53	Тамерлан	(Фрумоаса Албэ х Восторг) ВНПВіВ ім. Я.І. Потапенко, Росія	-23...-26
54	Томайський	(Пьеррель х Кардинал) "Вієрул", Молдова	-19...-22
55	Фаворит	Шасла Виктория х Королева виноградников) НІВіВ, м. Кечкемет, Венгрія	-15...-18
56	Хусайне Келин Бармак	стародавній узбекський столовий сорт	-15...-18
57	Чауш білий	Туреччина	-15...-18
58	Чауш рожевий	Туреччина	-15...-18
59	Шахтерський ранній	(Арктик х Кишмиш черный) Донецька ОС	-23...-26
60	Шевченко	Заря севера х Паркент) ЦГЛ ім. І.В. Мічуріна	-23...-26
61	Юбіляр	Нимранг х Матяш Янош) ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна	-15...-18
62	Янтарь	Королева виноградников х Карабурну) Болгарія	-15...-18
63	Ланка	ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна (Датъе де Сен-Валье × Декоративний))	-19...-22
64	Таїрян	ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна (Кобзарь × Оригінал) × Восторг	-15...-18
65	Ланжерон	ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна (Оригінал × 8-25-113) × суміш пилку	-19...-22

ДОДАТОК Г

Перелік сортів у ампелографічній колекції при ІПК і К НАН України

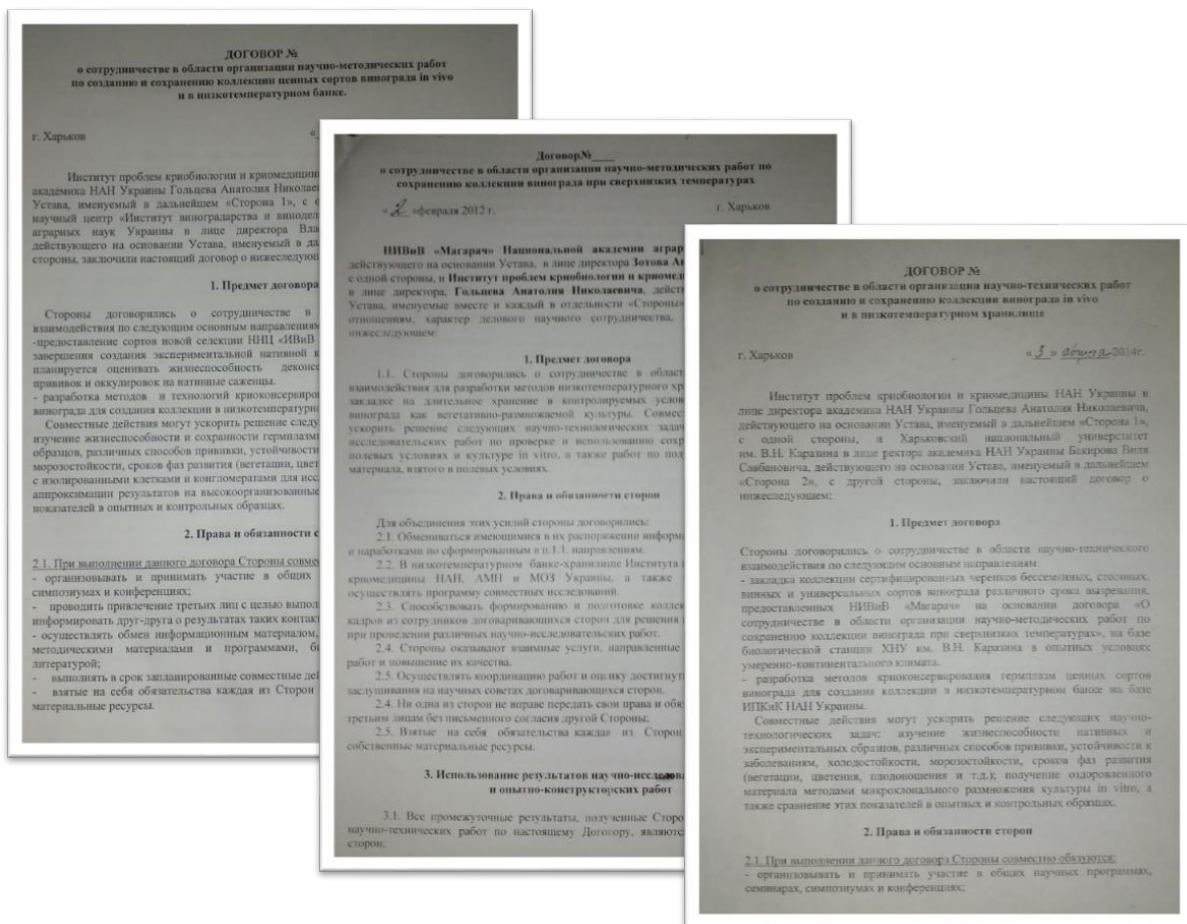
№	Назва	Оригігатор	LT50-100, °C
1	Мускат Голодриги	НВФ «Ампелос», Україна (Королева виноградників × Магарач 124-66-26)	-19..-22
2	Цитронний Магарача	ІВіВ «Магарач», (Мадлен Анжевин × Магарач 124-66-26 (Ркацителі× Магарач 2-57-72) × Новоукраїнський ранній)	-23..-26
3	Розалія	Угорщина(Рислінг×Трамінер)	-23..-26
4	Монарх	Німеччина ((Мерцлінг×(Сапераві північний × Мускат Оттонель))× Дорнфельдер)	-23..-25
5	Загрей	ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна (Овідіопольський × Мускат рожевий)	-23..-26
6	Голубок	ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна (Північний × суміш пилку сортів 40 років Жовтня, Одеський ранній і № 1-17-54 (Алікант Буше × Каберне Совіньон))	-23..-26
7	Фронтін'як	Університет штата Мінесота, США (MN 89 × Ландо 4511)	< -30
8	Бако	Морис Бако, Франція (Фолль бланш × Vitis Riparia)	-23..-26
9	Лідія	___отриман із Vitis Labrusca, США_	-27..-30
10	Буффало	Корнельський університет, США (Herbert × Watkins)	-27..-30
11	Велес	Україна (Софія × Русбол)	-19..-22
12	Русбол мускатний	ВНДІВіВ ім. Я.І. Потапенко, Росія (V-45/23 (Болгарія стійка) × Русбол)	-23..-26
13	Юпітер	Університет штату Арканзас, США	-23..-26
14	Кишмиш Таїровський	ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна (Королева виноград-ників × Суміш пилку)	-19..-22
15	Рута	Україна (Талісман × Кишмиш лучистий)	-19..-22
16	Руський ранній	ВНДІВіВ ім. Я.І. Потапенко, Росія (Шасла північна × Мічуринець)	-19..-22
17	Іванна	Україна (Подарунок Запоріжжю × Кишмиш лучистий)	-19..-22
18	Пам'яти Негруля	«Вісрул», Молдова (Корна негра × Дат'є де Сен-Вальє)	-23..-26
19	Оригінал	ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна	-19..-22
20	Прозрачний	(V-70-90 × Шавлійний)	-23..-26
21	Ізюминка	ІВіВ «Магарач», Україна (Чауш × Кардинал)	-15..-18
22	Галахад	Росія ((Талісман × Восторг) × Восторг мускатний)	-23..-26

23	Долгожданний	Росія (Талісман × Кишмиш лучистий)	-19..-22
24	Юліан	Росія (Кеша × Ризамат)	-23..-26
25	Гарольд	ВНДІВіВ ім. Я.І. Потапенко, Росія ((Восторг × Аркадія) × Мускат літній)	-19..-22
26	Ксенія (Анжеліка)	Україна	-21..-23
27	Антоній великий	Україна (Талісман × Кишмиш лучистий)	-23..-25
28	Адлер	Росія (Талісман × Августин)	-23..-26
29	Брестовіца	ІВіВ, Болгарія (Італія × Янтар)	-19..-22
30	Гала	Україна (Подарунок Запоріжжю × Кодрянка)	-19..-22
31	Століття ЗГТУ	ОВ «Виноградна Еліта», Україна (Подарунок Запоріжжю × Восторг)	-19..-22
32	Благовест	Україна (Талісман × Кишмиш лучистий)	-19..-22
33	Сенатор	Україна (Подарунок Запоріжжю × ПГ-12)	-19..-22
34	Нов. Подар. Запоріжжю	ОВ «Виноградна Еліта», Україна (Подарунок Запоріжжю × Восторг)	-23..-26
35	Лівія	ІВіВ «Магарач», Україна (Фламінго × Аркадія)	-19..-22
36	Анюта	Україна (Талісман × Кишмиш лучистий)	-19..-22
37	Хрустящий	Росія (Німранг × Жемчуг Саба)	-19..-22
38	Зарево	Молдова	-19..-22
39	Страшенський	«Віерул», Молдова ((Дружба × Катта-Курган × Додреляби) × Мускат де Сен-Вальє)	-19..-22
40	Вера	Росія (Талісман × Осінній чорний)	-23..-26
41	Наdejда АЗОС	АЗОС, Росія (Молдова × Кардинал)	-19..-22
42	Талісман	ВНДІВіВ ім.Я.І. Потапенко, Росія (Фрумоаса Албе × Восторг)	-23..-26
43	Пам'яті Хірурга	Росія (Кеша-1 × Ністру)	-15..-18
44	Богатяновський	Україна Талісман × Кишмиш Лучистий	-23..-26
45	Низина	Україна Талісман × Томайський	-19..-22
46	Софія	Україна (Аркадія × Кишмиш лучистий)	-19..-22
47	Любимий	«Віерул», Молдова (Талісман × Аркадія × Дружба)	-19..-22
48	Одісей	Росія (Восковой × Кишмиш Новочеркаський)	-23..-26
49	Одеський сувенір	ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна (Молдавський × Мускат гамбургський)	-15..-18
50	Ланжерон	ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна (Оригінал × 8-25-113) × суміш пилку	-19..-22

51	Ланка	ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна (Датъе де Сен-Валье × Декоративний))	-19..-22
52	Мускат янтарний	«Віерул», Молдова (Ранній кібрайський × Мускат східний)	-19..-22
53	Мускат Таїровський	ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна (Одеський ранній × Мускат гамбургський)	-15..-18
54	Мускат Літній	«Віерул» Молдова, (Перрель × Королева виноградників)	-15..-18
55	Таїрян	ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна (Кобзарь × Оригінал) × Восторг	-15..-18
56	Ароматний	ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна (Вертиш чилага × Ромулус)	-23..-25
57	Аркадія	ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», Україна (Молдова × Кардинал)	-19..-22
58	Декабрський	«Віерул», Молдова (Корна нягра × Вілар блан)	-27..-30
59	Самба	Талісман × Оригінал	-23
60	Наталія	Молдова × Кардинал	-23
61	Гордей	Україна	-23
62	Z-10	Україна (Подарунок Запоріжжю × Кишмиш лучистий)	-21
63	Фаїна	Україна	-21
64	Мечта	ОСХИ, Україна (Чауш рожевий × Кишмиш чорний)	-19...-22
65	Віктор	Росія. Крайнов	-19...-22
66	Івана	(Подарок Запорожжю х Кишмиш лучистый) В.В. Загорулько, Україна	-19...-22
67	Lakemont	(Онтарио х Султанина), США	-25...-27
68	Фрумоаса албе	(Гузаль кара х Сейв Виллар 20-473) "Віерул", Молдова	-19...-22
69	ПГ-12	((Ката-Курган х Кировабадський столовий) х Антей Магарача) "Магарач", Україна	-19...-22
70	Кеша	(Фрумоаса Албэ х Восторг) ВНИИВіВ им. Я.І. Потапенко, Россия	-23...-26
71	Флейм сидлис	США (Кишмиш білий × Кардинал × Сенсо	-15...-18
72	Кишмиш Столетіє	США	-25...-27
73	Юбілей Новочеркаська	Росія, Крайнов	-21...-23
74	Преображеніє	Росія, Крайнов	-21...-23
75	Байконур	(Талісман*Красотка) Павловський, Росія.	-24...-26

ДОДАТОК Д

Договори о науковом співробітництві



Акти впровадження

