ТРУДЫ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОГО
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО
ИНСТИТУТА ЛЕСНОГО ХОЗЯЙСТВА

www.journal.spb-niilh.ru
ISSN 2079-6080

УДК 630*232.315.2

Результаты опытов по криосохранению желудей *Quercus robur* L.

© А.С. Бондаренко, О.Ю. Бутенко

Experiment results on cryopreservation of *Quercus robur* L. acorns

A.S. Bondarenko, O.Y. Butenko (Saint Petersburg Forestry Research Institute)

Acorns of *Quercus robur* L. are classified as recalcitrant seeds. They have a high water content in tissues and can be only stored for a relatively short periods. The investigations show that size of cotyledons can influence on growth and development of roots and shoots of seedlings of *Quercus robur*. It is shown that decrease of cotyledons decreases of plants height, however difference between variants decreased at the end of the vegetation season. Embryos die when there are no cotyledons. Different cryoprotectants that prevent the formation of ice crystals inside cells were tested, such as DMSO, glycerol and sucrose. Drying in a stream of air (flash-dried) and drying with vacuum pump which decrease moisture of seeds before freezing was tested. Decrease of moisture of acorns parts oversaw within a 10% (from 50-51 to 41-44). There are tested 10 variants with rapid immersion to liquid nitrogen and one variant with a gradual decrease and increase in temperature. All experiment acorns died. Experiments were performed that eliminated harmful effects of cryoprotectants and flash-dried of parts seeds without following immersion to liquid nitrogen. Negative effects were not observed. High vigor of seeds grains are observed at the end of first year (10 mo) of storage in refrigerator (2 ºC). Seed germination changed insignificantly.

Key words: defrosting, activated silica, root, shoot, seedling

Результаты опытов по криосохранению желудей *Quercus robur* L.

А.С. Бондаренко, О.Ю. Бутенко

Желуди дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) относятся к рекальцитратным семенам, так как имеют высокое содержание воды в тканях и могут быть сохранены в течение относительно короткого времени. Выполнены исследования по определению зависимости роста и развития корней и побегов проростков дуба от размеров семядолей. Показано, что чем меньшего размера оставлена семядоля, тем ниже высота растения, однако к концу вегетационного периода разница между крайними вариантами в опыте сглаживается. При пол-

ном удалении семядолей зародыш погибает. Были испытаны различные криопротекторы, такие как ДМСО, глицерол и сахароза для защиты клеток тканей от пагубного влияния сверхнизких температур. Также были применены флеш-сушка и сушка с помощью вакуумного насоса для снижения влажности посевного материала перед замораживанием. При данном способе наблюдалось снижение влажности частей желудей в пределах 10% (с 50-51 до 41-44%). С непосредственным погружением семян в жидкий азот опробовано 10 вариантов, с постепенным снижением температуры – один. Однако при использовании для хранения температур ниже точки перекристаллизации воды все опытные образцы желудей погибают, несмотря на различные варианты подготовки. С целью исключения вредного влияния криопротекторов и высушивания были выполнены эксперименты по оценке их воздействия на семена. Они показали, что отрицательного влияния не наблюдалось. К окончанию первого года хранения (10 месяцев) посевного материала в кондиционируемых условиях (+2 °С) прослеживалось значительное повышение энергии прорастания. Показатели всхожести за указанный период изменялись незначительно.

Ключевые слова: размораживание, активированный силикагель, корень, побег, сеянец

Бондаренко Александр Сергеевич – ведущий науч. сотр. НИО селекции, воспроизводства и химического ухода за лесом, канд. с.-х. наук

E-mail: asbond@mail.ru

Бутенко Олеся Юрьевна – старший науч. сотр. НИО селекции, воспроизводства и химического ухода за лесом, канд. с.-х. наук

E-mail: din_don@bk.ru

ФБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт лесного хозяйства»
194021, Санкт-Петербург, Институтский пр., 21

Телефон: 8 (812) 552-80-26

E-mail: mail@spb-niilh.ru

Введение

В настоящее время в быстро изменяющихся условиях окружающей среды стратегия сохранения биологического разнообразия лесных экосистем [11] приобретает особенное значение. Кроме сбережения генетического материала в естественных популяциях, довольно широко используется сохранение видов *ex situ* на основе создания клоновых лесосеменных плантаций. Одним из способов достижения названной цели является хранение семян или их фрагментов в банках генов.

Надежным методом повышения продуктивности и биологической устойчивости лесных насаждений, является сохранение и использование семян урожайных лет. Поэтому большое значение имеет выбор техники хранения, которая в значительной степени зависит от их способности переносить потерю воды. Семена, которые без потери жизнеспособности могут выдержать снижение содержания воды в тканях до 5%, относятся к группе ортодоксальных, а погибающие в результате высушивания ниже критического уровня гидратации (от 12 до 40%) – к рекальцитрантным [7]. Ко второй принадлежат, в частности, желуди дуба черешчатого, которые могут быть сохранены только в течение относительно короткого периода времени [4]. Это объясняется высоким уровнем метаболической активности в сочетании с низким уровнем внутриклеточной дифференциации [6], что приводит к пагубному стрессирующему воздействию дегидратации [14, 15]. В связи с чем, при рассмотрении способов хранения желудей особое внимание уделяется их влажности, температуре хранения и составу газовой атмосферы [2, 3].

Поскольку резервное копирование живых коллекций является более надежным способом сохранения растительного генофонда, криоконсервация (сохранение биологического материала при температуре кипения жидкого азота –196 ºС или в его парах при температуре около –135 ºС) рассматривается в качестве дополнительного метода [13]. При его применении для рекальцитрантных семян успешно используют отделенные от семян зародыши или имеющие ещё более мелкие размеры зародышевые оси. В ходе криопротекции отделенные части семян подвергаются процедурам, предотвращающим гибель клеток в результате появления кристаллов льда. При этом происходит безопасный переход цитоплазмы в аморфное (стеклообразное) состояние. Данная методика обычно требует введения криопротекторных веществ, таких, например, как сахароза и глицерин, а также быстрого охлаждения при непосредственном контакте тканей с жидким азотом [7]. Существует два основных типа процедур криосохранения: обычное медленное замораживание, основанное на вызванном замораживанием обезвоживании, и флеш-замораживание (витрификация), которая включает в себя обезвоживание до выполнения процедуры охлаждения [9].

Помимо этого изучались также возможности замораживания и сохранения в жидком азоте выделенных из желудей дуба черешчатого меристем зародышевых почек – плюмул. Из размороженных тканей удалось получить растения с нормальной морфологией. Успешно выполнены и работы по замораживанию в жидком азоте эмбриогенной каллусной ткани дуба черешчатого, полученной ранее из незрелых зиготических зародышей при культивировании *in vitro* [7].

В ряде экспериментов было выяснено, что целые эмбриональные оси не выживают после криохранения. При этом, по мнению исследователей, тяжелый корешок зародыша является излишним балластом, хотя он и более устойчив к высушиванию. При его выживании после криозамораживания формирование целого растения не происходило [8]. Имеются противоречивые данные об успешности использования частичного быстрого высушивания с последующим быстрым погружением в жидкий азот зиготических эмбрионов дуба черешчатого [5, 10].

Нами были выполнены исследования по возможности использования криогенных температур для длительного хранения семян хвойных пород [1], которые показали успешность

данной технологии: из криозамороженного семенного материала в теплице были выращены сеянцы ели и сосны. В связи с этим было принято решения применить эти разработки к другим древесным породам, в частности, к желудям дуба черешчатого.

В связи с тем, что основное применение работ по криосохранению семян дуба черешчатого лежит в плоскости использования в рамках селекционно-семеноводческих центров, то есть относится к работам со значительными объемами семенного материала, рассмотренный выше положительный опыт криосохранения отдельных микроскопических частей семени дуба черешчатого был обобщен в качестве попытки разработать систему криосохранения целых желудей или их частей.

Целью наших исследований была оценка результатов воздействия на желуди дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) сверхнизких температур. В соответствии с этим при выполнении работ решались следующие задачи:

– анализ посевных качеств семенного материала, подготовленного для проведения экспериментов;

– разработка экспериментального плана, включающего перспективные варианты обработки желудей перед замораживанием ниже точки перекристаллизации воды и после размораживания;

– определение основных параметров семян дуба черешчатого при подготовке к замораживанию (размеры, влажность и др.)

– постановка экспериментов по воздействию режимов замораживания-размораживания ниже точки перекристаллизации воды желудей на их всхожесть с последующим анализом полученных данных.

Объекты и методы исследований

При выполнении исследований использовались партии семян дуба черешчатого, заготовленных в парковых насаждениях Санкт-Петербурга. До выполнения экспериментов желуди хранились в кондиционируемых условиях при температуре +2 °С в пластиковых пакетах толщиной 11 мкм. Энергия прорастания и всхожесть определялись по ГОСТ 13056.6-97 влажность – по ГОСТ 13056.3-86. Основные характеристики используемых в экспериментах партий семян приведены в таблице 1. Следует отметить наличие существенной разницы между образцами по значению такого показателя как энергия прорастания, в то время как всхожесть варьирует в гораздо меньшей степени. При указанной в таблице влажности желуди перестали отпотевать и демонстрировали высокую всхожесть, что свидетельствует о правильно подобранных параметрах условий хранения.

Таблица 1

Характеристика партий семян дуба черешчатого, используемых для выполнения исследований

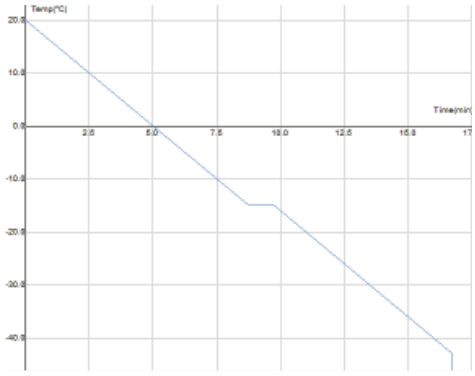
Год заготовки	Номер партии	Влажность, %	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %
2014	1	41	2	98
	2	43	63	100
	3	44	5	100
	4	42	89	89
	5	46	90	100
	6	43	90	100
2015	7	51	78	89

Все желуди после сбора были подвержены флотации для отбраковки пересушенных, поврежденных насекомыми и грибной биотой. После визуального осмотра оставшихся семян были удалены проросшие и имеющие механические повреждения. Затем семенной материал был просушен в течение двух дней и помещен в кондиционируемые условия (холодильник

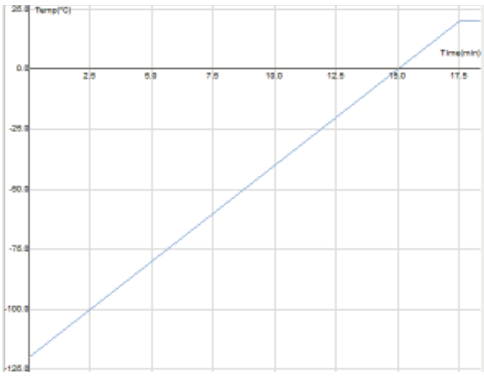
Liebherr Medline) при температуре +2 ºС.

До проведения экспериментов в течение 2 недель состояние посевного материала контролировали ежедневно. При обнаружении запотевших желудей их вновь выкладывали на просушивание. Затем в течение двух месяцев каждые две недели выполнялся визуальный осмотр заложенных на хранение семян с целью удаления проросших и зараженных экземпляров. Периодичность контроля в дальнейшем была ежемесячной. (Следует отметить, что в партиях № 2 и № 5 в течение всего периода исследований зараженных экземпляров обнаружено не было).

При проведении экспериментов по криообработке желудей было применено 11 вариантов режимов замораживания-размораживания. Для постепенного замораживания (1 вариант) использовался программный криозамораживатель CryoLogic Freeze Control CL8800. Рабочей жидкостью для функционирования данной морозильной системы является жидкий азот. График выполнения протокола по процессам замораживания и размораживания представлен на рисунке 1.



а) замораживание



б) размораживание

Рис. 1. Протокол выполнения процессов замораживания и размораживания с помощью программного криозамораживателя

При быстром замораживании-размораживании (10 вариантов) желуди непосредственно погружались в жидкий азот (табл. 2).

Таблица 2

Описание вариантов выполненных исследований

Описание варианта
1. Желуди целые
2. Желуди очищенные и срезанные на 1/3 семядолей со стороны, противоположной корешку зародыша
3. Желуди очищенные и срезанные на 1/3 семядолей со стороны, противоположной корешку зародыша. Раствор ДМСО 99% (17,5 ч, t=23 ºС)
4. Желуди целые. Раствор ДМСО 99% (17,5 ч, t=23 ºС)
5. Желуди очищенные и срезанные на 1/3 семядолей со стороны, противоположной корешку зародыша. Перед замораживанием – раствор ДМСО 15% (2 ч, t=23 ºС). Размораживание – 30 мин, t=23 ºС, промывка водой три раза и выдерживание в ней – 1 ч

Описание варианта
6. Желуди очищенные, разделенные на две семядоли, одна из них обрезана примерно до 3 мм со стороны, противоположной корешку зародыша. Флеш-сушка – 1 ч, t=23 ºС
7. Желуди очищенные и разделенные на две семядоли, одна из них обрезана примерно до 3 мм со стороны, противоположной корешку зародыша. Флеш-сушка – 3 ч, t=23 ºС
8. Желуди очищенные и разделенные на две семядоли, одна из них обрезана примерно до 3 мм со стороны, противоположной корешку зародыша. Погружались в раствор ДМСО 15% (1 ч, t=23 ºС) [4]. После размораживания промывка водой – 10 мин
9. Желуди очищенные и разделенные на две семядоли, одна из них обрезана примерно до 3 мм со стороны, противоположной корешку зародыша. Методика работы аналогична методике, представленной D. Touchell, C. Walters [12]. Перед замораживанием – раствор 0,5 М сахарозы (18 ч, t=4 ºС) → раствор 0,75 М сахарозы (1 ч, t=23 ºС) → раствор 1,0 М сахарозы (1 ч, t=23 ºС) → раствор 1,5 М глицерола (1 ч, t=23 ºС) Высушивание в фильтровальных пакетах в 80 г активированного силикагеля Размораживание – раствор 1,2 М сахарозы (2 мин, t=42 ºС) → лед (2 мин) → раствор 0,75 М сахарозы (1 ч, t=23 ºС) → раствор 0,5 М сахарозы (1 ч, t=23 ºС)
10. Желуди очищенные, разделенные на две семядоли, одна из них обрезана примерно до 3 мм со стороны, противоположной корешку зародыша, помещались в эксикатор с активированным силикагелем. Высушивание с помощью вакуумного насоса в течение 1,5 ч

В вариантах с быстрым высушиванием (флеш-сушка) применялся термовентилятор Binatone VFH-2401 в режиме «вентиляция без нагрева». В качестве контроля в экспериментах использовались желуди дуба черешчатого одноименных партий, не подвергшиеся воздействию низкотемпературных режимов.

Для проращивания желудей использовался стандартный стол Якобсена, температура ложа которого составляла 24 °С.

При сушке и замораживании большое значение имеет объем материала – чем он меньше, тем быстрее и равномернее происходит высушивание и проникновение криопротектора. С целью уменьшения размера желудей у них были удалены части семядолей. При этом необходимо было определить предельный размер семядоли, при котором сохраняется жизнеспособность семян, и в дальнейшем возможно нормальное развитие корешка и побега. Опыты проводились в следующих вариантах:

– простое разделение на две семядоли (I вариант);

– разделение на две семядоли с уменьшением их в два раза (II вариант);

– разделение на две семядоли, одна из них обрезана примерно до 3 мм со стороны, противоположной корешку зародыша (III вариант);

– полное удаление семядолей (IV вариант).

Полученные проростки были высажены в конце марта 2015 г. в контейнеры объемом 0,5 л и помещены под светоустановку с круглосуточным освещением 1300 лк. В начале мая 2015 г. все растения были перемещены в теплицу закрытого грунта. Использованный для выращивания сеянцев почвогрунт представлял собой смесь верхового слаборазложившегося торфа (степень разложения не более 15%) с минеральными добавками и микроудобрениями.

Для определения уровня токсичности раствора ДМСО (диметилсульфоксид) для желудей был выполнен опыт с данным криопротектором без последующего воздействия сверхнизкими температурами.

С целью исключения влияния флеш-сушки на жизнеспособность желудей дуба был заложен контроль, включающий быстрое 3-часовое высушивание без последующего замораживания.

Статистический анализ результатов опытов производился с применением таких стандартных пакетов программ компьютерного обеспечения как MS Excel 2010 и StatSoft Statistica 8.0.

Результаты и их обсуждение

Как показали результаты опытов по определению размеров семядолей (I вариант), при простом разделении желудя на две семядоли наблюдается нормальное развитие корешка и побега (рис. 2).

Рис. 2. Развитие корешков при простом разделении желудей на две семядоли (I вариант)

При разделении желудей на две семядоли с уменьшением их в два раза (II вариант) гибели зародыша также не наблюдается, происходит нормальное формирование как корешка, так и побега (рис. 3).

Рис. 3. Развитие корешков и побегов у желудей при разделении на две семядоли с последующим уменьшением их в два раза (II вариант)

У желудей, разделенных пополам с обрезанными вокруг зародыша семядолями размером 3 мм со стороны, противоположной корешку зародыша также наблюдалось хорошее развитие корня и побега (рис. 4).

Рис. 4. Нормальное развитие корня и побега у желудей, разделенных пополам с обрезанными вокруг зародыша семядолями размером 3 мм (III вариант)

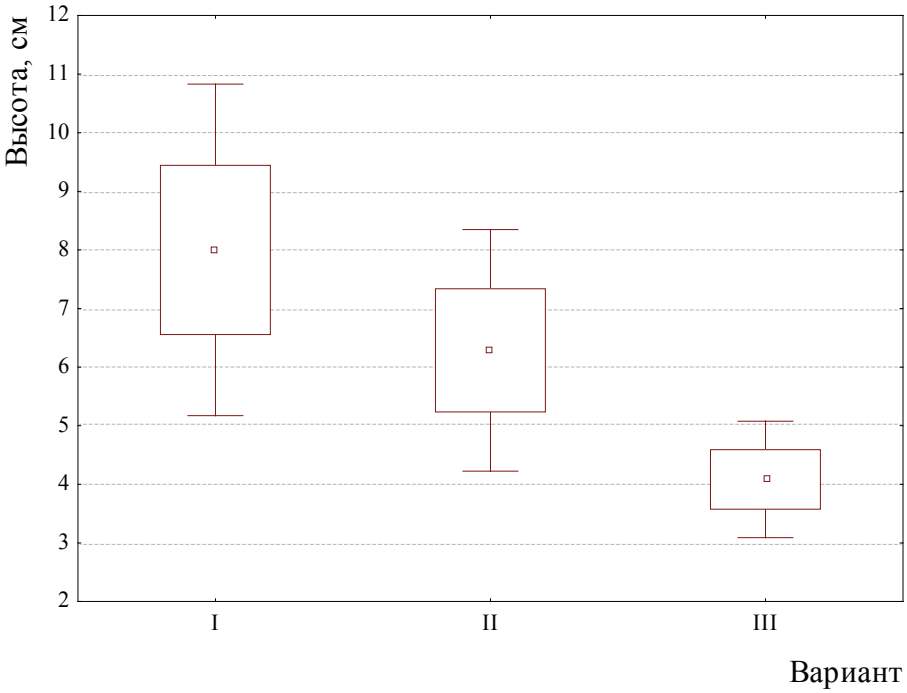
Таким образом, желуди дают нормально развитые проростки даже при небольшом размере семядолей. Тем не менее, при попытке оставить зародыш без них наблюдается его гибель (рис. 5).

Рис. 5. Зародыши желудей, погибшие в результате удаления семядолей (IV вариант)

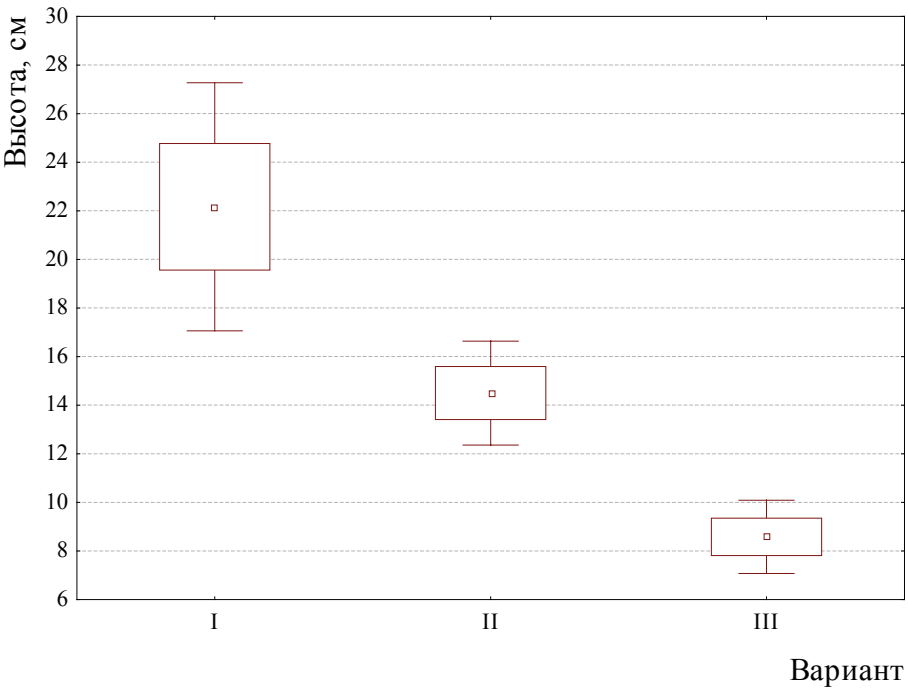
Для оценки дальнейшего развития сеянцев из семядолей различных размеров (варианты I-III) проростки были высажены в закрытый грунт, где показали хороший рост. Но, несмотря на то, что все зародыши желудей смогли сформировать нормальный корешок и побег на стадии проростка, энергия роста по высоте у них оказалась разной: чем меньшего размера была оставлена семядоля, тем ниже высота растений в течение всего срока наблюдений.

Сопоставление средних значений высот на основе использования дисперсионного анализа показало, что различия между вариантами в марте недостоверны на уровне значимости 0,05 (рис. 6а), но уже к апрелю (рис. 6б) происходит значительный рывок в росте по высоте, что ха-

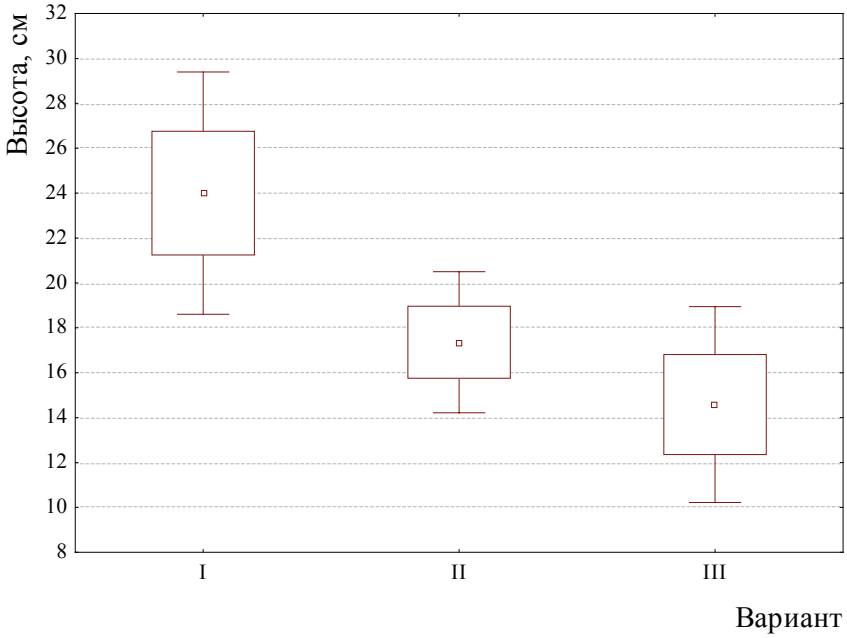
рактеризуется статистическими данными. К октябрю различия еще достоверны на уровне значимости 0,05 (рис. 6в), но уже значительно меньше по сравнению с апрелем.



а) март



б) апрель



в) октябрь

среднее; среднее ± ошибка среднего; среднее ±1,96 × ошибка среднего

I – разделение на две семядоли

II – разделение на две семядоли с уменьшением их в два раза

III – разделение на две семядоли, одна из них обрезана до 3 мм со стороны, противоположной корешку зародыша

Рис. 6. Различия между значениями высоты растений в зависимости от размеров семядолей

Для оценки влияния сроков хранения желудей на их всхожесть и энергию прорастания в течение 10 месяцев за партиями желудей, содержащихся на хранении в кондиционируемых условиях при температуре +2 ºС, были выполнены соответствующие наблюдения за их состоянием, определяемым по этим показателям (рис. 7).

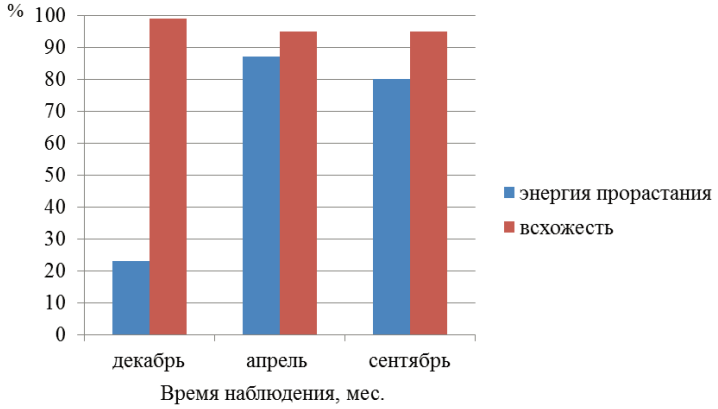


Рис. 7. Динамика энергии прорастания и всхожести желудей дуба черешчатого при хранении в кондиционируемых условиях

Как видим, за время хранения желудей их всхожесть немного понизилась – в пределах 5%, в то время как энергия прорастания увеличилась в 3,0-3,5 раза. Последнее, по-видимому, связано с естественными процессами подготовки желудей к периоду прорастания.

В ходе исследования возможностей долговременного хранения желудей дуба черешчатого при температуре ниже точки перекристаллизации воды и выведения из этого состояния, выполненных по 11 различным вариантам, в том числе с замораживанием семядолей различного размера, получен отрицательный результат: семена растрескиваются, погибают и в дальнейшем поражаются плесневыми грибами (рис. 8).

Рис. 8. Общий вид желудей по результатам выполнения замораживания-размораживания ниже точки перекристаллизации воды

Выводы

По результатам выполненных исследований можно сделать следующие выводы:

– для успешного формирования проростка дуба из желудей достаточно семядолей даже сравнительно небольшого размера (примерно 3 мм): в дальнейшем у растения формируются нормальный корешок и побег с листьями;

– размер семядолей влияет на рост растений в теплице в первый вегетационный период, хотя к его окончанию разница между крайними вариантами существенно сократилась;

– при отсутствии семядолей при любом варианте подготовки к хранению желудей дуба черешчатого наблюдается гибель зародыша;

– несмотря на различную подготовку желудей к криозамораживанию (быстрое высушивание, использование различных криопротекторов), при использовании для хранения температур ниже точки перекристаллизации воды все опытные образцы желудей погибают;

– в конце первого года хранения посевного материала в кондиционируемых условиях (+2°С) наблюдается значительное повышение энергии прорастания. Показатели всхожести за указанный период изменяются незначительно.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Бутенко, О.Ю. Влияние режимов замораживания и оттаивания на всхожесть семян сосны и ели / О.Ю. Бутенко, А.С. Бондаренко, Н.Н. Пелевина // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства / ФБУ «СПбНИИЛХ». – СПб: СПбНИИЛХ, 2014. – № 1. – С. 38–46.
2. Мамонов, Н.И. Разработка технических условий по способам длительного хранения семян кедра сибирского и желудей дуба черешчатого / Н.И. Мамонов // Научно-исследовательские работы за 1981-1985 гг. – М.: Лесная пром-сть, 1986. – С. 212–216.
3. Якимов, Н.И. Продление срока хранения желудей дуба черешчатого в желудехранилищах / Н.И. Якимов, А.А. Домасевич, Д.И. Филон // Лесное и охотничье хозяйство. – 2012. – № 4. – С. 17–21.
4. Ana, M.V. Application of biotechnological tools to *Quercus* improvement / M.V. Ana [et al.] // European Journal of Forest Research. – 2012. – V. 131, I. 3. – P. 519–539.
5. Berjak, P. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos / P. Berjak [et al.] // Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm-Current Research Progress and Applications / F. Engelman, H. Tajagi (eds). – Rome : IPGRI, 2000. – P. 140–155.
6. Berjak, P. Recalcitrant Seeds / P. Berjak, N.W. Pammenter // Handbook of seed physiology: applications to agriculture / R.L. Benech-Arnold, R.A. Sánchez (eds). – New York-London-Oxford: The Haworth Press, 2004. – P. 305–345.
7. Chmielarz, P. Cryopreservation of genetic resources of forest tree species / P. Chmielarz, M. Michalak // Наука о лесе XXI века: материалы междунар. научно-практ. конф., посвящ. 80-летию Института леса НАН Беларуси. – Гомель: Институт леса НАН Беларуси. – 2010. – С. 109–112.
8. Chmielarz, P. Successful cryopreservation of *Quercus robur* plumules / P. Chmielarz, M. Michalak, V. Pałucka, U. Wasileńczyk // Plant Cell Repts. – 2011. – Vol. 30. – № 8. – P. 1405–1414.
9. Engelmann, F. Germplasm collection, storage and preservation / F. Engelmann // Plant Biotechnology and Agriculture. Prospects for the 21st Century / A. Altman, P.M. Hazegawa (eds.). – Oxford: Academic Press, 2011. – P. 255–268.
10. González-Benito, M.E. Cryopreservation of *Quercus suber* and *Quercus ilex* embryonic axes: *in vitro* culture, desiccation and cooling factors / M.E. González-Benito [et al.] // CryoLetters. – 2002. – Vol. 23(5). – P. 283–290.
11. Häggman, H.M. Cryopreservation of *in vitro* tissues of deciduous forest trees / H.M. Häggman, M. Rusanen, S. Jokippi // Plant cryopreservation: a practical guide / B.M. Reed (ed). – New York, 2008. – P. 365–386.
12. Touchell, D. Recovery of embryos of Zizania palustris following exposure to liquid nitrogen / D. Touchell, C. Walters // Cryo Letters. – 2000. – Vol. 21(5). – P. 261–270.
13. Reed, B.M. Cryopreservation-Practical Considerations / B.M. Reed // Plant cryopreservation: a practical guide / B.M. Reed (ed). – New York, 2008. – P. 3–13.
14. Varghese, B. Differential drying rates of recalcitrant *Trichilia dregeana* embryonic axes: a study of survival and oxidative stress metabolism / B. Varghese // Physiologia Plantarum. – 2011. – Vol. 142, I. 4. – P. 326–338.
15. Walters, C. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation-tolerant and sensitive seeds / C. Walters [et al.] // Seed Science Research. – 2001. – Vol. 11, I. 2. – P. 135–148.

REFERENCES

1. Butenko, O.Yu. Vliyanie rezhimov zamorazhivaniya i ottaivaniya na vskhozhest' semyan sosny i eli / O.Yu. Butenko, A.S. Bondarenko, N.N. Pelevina // Trudy Sankt-Peterburgskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta lesnogo khozyajstva / FBU «SPbNIILKH». – SPb: SPbNIILKH, 2014. – № 1. – S. 38–46.
2. Mamonov, N.I. Razrabotka tekhnicheskikh uslovij po sposobam dlitel'nogo khraneniya semyan kedra sibirskogo i zheludej duba chereshchatogo / N.I. Mamonov // Nauchno-issledovatel'skie raboty za 1981-1985 gg. – M.: Lesn. prom-st', 1986. – S. 212–216.
3. Yakimov, N.I. Prodlenie sroka khraneniya zheludej duba chereshchatogo v zheludekhranilishhakh / N.I. Yakimov, A.A. Domasevich, D.I. Filon // Lesnoe i okhotnich'e khozyajstvo. – 2012. – № 4. – S. 17–21.
4. Ana, M.V. Application of biotechnological tools to *Quercus* improvement / M.V. Ana [et al.] // European Journal of Forest Research. – 2012. – V. 131, I. 3. – P. 519–539.
5. Berjak, P. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos / P. Berjak [et al.] // Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm-Current Research Progress and Applications / F. Engelman, H. Tajagi (eds). – Rome: IPGRI, 2000. – P. 140–155.
6. Berjak, P. Recalcitrant Seeds / P. Berjak, N.W. Pammenter // Handbook of seed physiology: applications to agriculture / R.L. Benech-Arnold, R.A. Sánchez (eds). – New York-London-Oxford: The Haworth Press, 2004. – P. 305–345.
7. Chmielarz, P. Cryopreservation of genetic resources of forest tree species / P. Chmielarz, M. Michalak // Nauka o lese XXI veka: materialy mezhdunar. nauchno-prakt. konf., posvyashh. 80-letiyu Instituta lesa NAN Belarusi. – Gomel': Institut lesa NAN Belarusi. – 2010. – S. 109–112.
8. Chmielarz, P. Successful cryopreservation of *Quercus robur* plumules / P. Chmielarz, M. Michalak, M. Pałucka, U. Wasileńczyk // Plant Cell Repts. – 2011. – Vol. 30 – № 8. – P. 1405–1414.
9. Engelmann, F. Germplasm collection, storage and preservation / F. Engelmann // Plant Biotechnology and Agriculture. Prospects for the 21st Century / A. Altman, P.M. Hazegawa (eds.). – Oxford: Academic Press, 2011. – P. 255–268.
10. González-Benito, M.E. Cryopreservation of *Quercus suber* and *Quercus ilex* embryonic axes: *in vitro* culture, desiccation and cooling factors / M.E. González-Benito [et al.] // CryoLetters. – 2002. – Vol. 23(5). – P. 283–290.
11. Häggman, H.M. Cryopreservation of *in vitro* tissues of deciduous forest trees / H.M. Häggman, M. Rusanen, S. Jokippi // Plant cryopreservation: a practical guide / B.M. Reed (ed). – New York, 2008. – P. 365–386.
12. Touchell, D. Recovery of embryos of Zizania palustris following exposure to liquid nitrogen / D. Touchell, C. Walters // Cryo Letters. – 2000. – Vol. 21(5). – P. 261–270.
13. Reed, B.M. Cryopreservation-Practical Considerations / B.M. Reed // Plant cryopreservation: a practical guide / B.M. Reed (ed). – New York, 2008. – P. 3–13.
14. Varghese, B. Differential drying rates of recalcitrant *Trichilia dregeana* embryonic axes: a study of survival and oxidative stress metabolism / B. Varghese // Physiologia Plantarum. – 2011. – Vol. 142, I. 4. – P. 326–338.
15. Walters, C. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation-tolerant and sensitive seeds / C. Walters [et al.] // Seed Science Research. – 2001. – Vol. 11, I. 2. – P. 135–148.