

## Изучение посткриогенного регенерационного потенциала сортов картофеля в разных условиях культивирования

Е.С. Беспалова<sup>1</sup>, Ю.В. Ухатова<sup>1</sup>, Н.Н. Волкова<sup>1</sup>, Е.В. Овэс<sup>2</sup>, Н.А. Гаитова<sup>2</sup>, Т.А. Гавриленко<sup>1,3</sup> 

<sup>1</sup> Федеральное исследовательское учреждение Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха, Кусково, Москва, Россия

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия

 e-mail: tatjana9972@yandex.ru

Криоконсервация обеспечивает долгосрочное хранение генофонда селекционных сортов картофеля в криобанках при сверхнизких температурах. В настоящее время для криоконсервации сортов картофеля наиболее широко используется метод капель-витрификации, который постоянно совершенствуется с целью повышения регенерационной способности сохраняемого растительного материала. В ведущих мировых генбанках картофеля используются различные модификации этого метода. В данной работе представлены результаты изучения влияния условий культивирования после замораживания–оттаивания апексов побегов и пазушных почек *in vitro* растений на их способность к посткриогенному восстановлению. Для криоконсервации был использован метод капель-витрификации, модифицированный в ВИР. Фактор «длительная темновая инкубация эксплантов» не оказывал существенного влияния на частоту посткриогенной регенерации изученных сортов, за исключением одного сорта (Крепыш), для которого отмечено достоверное ( $p < 0.05$ ) увеличение частоты регенерации в варианте культивирования апексов микропобегов в темноте по сравнению с вариантом культивирования при фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота). Фактически у всех сортов частота посткриогенной регенерации апексов микропобегов была выше, чем у пазушных почек, однако достоверное превышение ( $p < 0.05$ ) данного показателя для апексов побегов отмечено только в двух случаях: для сорта Удача – культивирование эксплантов при фотопериоде 16/8 ч и для сорта Крепыш – культивирование в условиях темновой инкубации. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа указывают на отсутствие значимого эффекта совместного действия двух факторов (темновая инкубация и тип экспланта) на способность сортов к посткриогенному восстановлению. С учетом полученных результатов дальнейшую криоконсервацию расширенной выборки из девяти селекционных сортов проводили с использованием только одного типа эксплантов – апексов микропобегов, которые после замораживания–оттаивания культивировали при фотопериоде 16/8 ч. Частота посткриогенной регенерации этих сортов варьировала от 30 до 60 %. Установлено достоверное влияние генотипа на регенерационную способность сортов после замораживания–оттаивания. Способность сортов к посткриогенному восстановлению не связана со значениями морфогенетических показателей *in vitro* растений, которые используются в оригинальном семеноводстве картофеля. Возраст мериклона (2–4 года) не оказывал существенного влияния ни на показатели морфогенеза, ни на частоту посткриогенной регенерации сортов.

Ключевые слова: картофель; *Solanum tuberosum*; длительное хранение; криоконсервация; условия *in vitro* культивирования; морфогенез *in vitro* растений.

**Для цитирования:** Беспалова Е.С., Ухатова Ю.В., Волкова Н.Н., Овэс Е.В., Гаитова Н.А., Гавриленко Т.А. Изучение посткриогенного регенерационного потенциала сортов картофеля в разных условиях культивирования. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):281-286. DOI 10.18699/VJ19.500

## Investigation of the post-cryogenic regeneration ability of potato varieties under different cultivation conditions

E.S. Bespalova<sup>1</sup>, Yu.V. Ukhatova<sup>1</sup>, N.N. Volkova<sup>1</sup>, E.V. Oves<sup>2</sup>, N.A. Gaitova<sup>2</sup>, T.A. Gavrilenko<sup>1,3</sup> 

<sup>1</sup> Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Lorch Potato Research Institute, Kuskovo, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Saint Petersburg State University, Biological Faculty, St. Petersburg, Russia

 e-mail: tatjana9972@yandex.ru

Cryopreservation provides long-term storage of the gene pool of potato varieties in cryobanks at extremely low temperatures. Currently, droplet vitrification is the most widely used method for cryopreservation of potato varieties, which is constantly improving to increase the regeneration rates of the stored plant material. Different modifications of this method are used in the world's leading potato genebanks. This paper presents the results of studying the effect of cultivation conditions after plunging into liquid nitrogen and thawing of shoot tips and axillary buds of *in vitro* plants on their post-cryogenic recovery. The droplet-vitrification method modified at VIR was used for cryopreservation. The factor "prolonged dark incubation of explants" did not have a significant effect on the frequency of post-cryogenic regeneration of the studied varieties except for one variety (Krepysh), for which a significant increase in the regeneration rate was observed for the shoot tips cultivated in the darkness compared to the cultivation under the photoperiod 16/8 hours (light/darkness). The

frequency of post-cryogenic regeneration of shoot tips was higher than that of the axillary buds for all varieties; however, these differences were significant ( $p < 0.05$ ) only in two cases: for the variety Udacha (a photoperiod of 16/8 hours) and for the variety Krepysh (the dark incubation). The results of two-factor analysis of variance indicate that there is no effect of interaction of factor 1 (prolonged dark incubation) and factor 2 (explant type) on the ability of varieties to post-cryogenic recovery. Taking into account the obtained results, the further cryopreservation of an extended subset of 9 varieties was carried out using shoot tips, which, after freezing-thawing, were cultivated under the photoperiod of 16/8 hours. The frequency of post-cryogenic regeneration of these varieties varied from 30 to 60 %. A significant effect of genotype on post-cryogenic recovery has been established. The ability of varieties to regenerate shoots after freezing and thawing was not related to the values of morphogenic indices of *in vitro* plants. The age of the meriklons (2–4 years) did not significantly affect either the morphogenic indices or the frequency of post-cryogenic regeneration.

Key words: potato; *Solanum tuberosum*; long-term preservation; cryoconservation; *in vitro* cultivation conditions; *in vitro* morphogenesis.

**For citation:** Bespalova E.S., Ukhatova Yu.V., Volkova N.N., Oves E.V., Gaitova N.A., Gavrilenko T.A. Investigation of the post-cryogenic regeneration ability of potato varieties under different cultivation conditions. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(3):281–286. DOI 10.18699/VJ19.500 (in Russian)

## Введение

Важнейшей вегетативно размножаемой продовольственной культурой является возделываемый картофель *Solanum tuberosum*. Генофонд селекционных сортов картофеля сохраняется в полевых коллекциях, а также в дублетных – *in vitro* и криоколлекциях. Гарантированное сохранение обеспечивается при наличии в генбанке всех трех типов коллекций (Гавриленко и др., 2007; Филипенко, 2007; FAO, 2014; Niino, Valle Arizaga, 2015). Долгосрочное хранение генофонда селекционных сортов картофеля в контролируемых условиях проводят при сверхнизких температурах в криобанках.

Для криоконсервации картофеля используют различные методы: витрификации, дроблет-замораживания, сгуорлате, дроблет-витрификации (Kaczmarczyk et al., 2011; Niino, Valle Arizaga, 2015; Ухатова, Гавриленко, 2018). В настоящее время наиболее часто применяется метод дроблет-витрификации, разработанный Panis et al. (2005) для криоконсервации образцов банана. Данный метод был многократно модифицирован в разных лабораториях и используется в крупнейших мировых генбанках для создания криоколлекций картофеля (Kim et al., 2006; Panta et al., 2015; Vollmer et al., 2016, 2017; Ухатова и др., 2017; Jenderek, Reed, 2017; Гавриленко и др., 2019). Подробное сравнение различных модификаций метода дроблет-витрификации проведено в нашей другой работе (Гавриленко и др., 2019).

Наиболее крупная по численности (1 533 образца) криоколлекция находится в Международном центре картофеля (CIP) в Перу (Vollmer et al., 2017). Первая в России криоколлекция селекционных и аборигенных сортов картофеля, насчитывающая 230 образцов, сохраняется в криобанке ВИР. Эта коллекция создается с использованием модифицированного в 2011 г. метода дроблет-витрификации (Дунаева и др., 2011; Shvachko, Gavrilenko, 2011).

Метод дроблет-витрификации, модифицированный в CIP, включает этап длительного (в течение одной недели) культивирования в темноте апексов *in vitro* растений после их замораживания–оттаивания. В генбанке NAC, NAAS, Кореи для криоконсервации используются и пазушные почки микрорастений. В модифицированном в ВИР методе этап длительной темновой инкубации не применяется, культивирование эксплантов с момента замораживания–оттаивания до получения полностью сформированных

регенерантов проходит при фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота) (Дунаева и др., 2011; Гавриленко и др., 2019). Отметим, что работ по изучению влияния темновой инкубации на индукцию и эффективность посткриогенной регенерации картофеля в доступной нам литературе нет.

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния длительной темновой инкубации на эффективность посткриогенной регенерации различных типов эксплантов (апексов и пазушных почек *in vitro* растений). С учетом полученных результатов в дальнейшем проводились эксперименты по криоконсервации расширенной выборки селекционных сортов картофеля.

## Материалы и методы

В качестве материала были использованы *in vitro* растения 13 селекционных российских сортов картофеля, полученных из Банка здоровых сортов картофеля (БЗСК) Всероссийского НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха: Антонина, Василек, Гулливер, Ильинский, Ирбитский, Крепыш, Кузнечанка, Любава, Накра, Удача, Тулеевский, Фрителла, Югана. Исходные *in vitro* растения выращивали три-четыре недели на питательной среде MS без гормонов для получения выровненных по физиологическому состоянию микрорастений.

Для изучения влияния длительной темновой инкубации на посткриогенное восстановление эксплантов отобрали четыре сорта картофеля (Ильинский, Крепыш, Накра, Удача), контрастных по способности к посткриогенному восстановлению (Ухатова и др., 2017). У микрорастений этих четырех сортов вычленили как апексы микропобегов, так и пазушные почки (из верхних двух междоузлий).

Криоконсервацию сортов картофеля проводили в отделе биотехнологии ВИР с использованием модифицированного метода дроблет-витрификации (Дунаева и др., 2011), детальное описание которого приведено в работе (Гавриленко и др., 2019). Изолированные экспланты помещали в жидкую среду MS, затем переносили в жидкую среду LS (MS с 0.4M сахарозой и 2M глицеролом) на 20 мин, после чего экспланты помещали в раствор PVS2 с криопротекторами (MS с добавлением 3.26 M глицерола, 2.42 M этиленгликоля, 1.9 M ДМСО и 0.4 M сахарозы) и оставляли на 30 мин на льду. Экспланты, погруженные в капли раствора PVS2, переносили в заполненные жидким азотом криопробирки, которые помещали на один час в

сосуд Дьюара с жидким азотом. Оттаивание материала проводили при комнатной температуре в жидкой среде RS (MS с добавлением 1.2 М сахарозы) в течение 15 мин. Затем экспланты переносили в чашки Петри со средой MStO (MS с добавлением 0.5 мг/л зеатин рибозида, 0.5 мг/л ИУК, 0.2 мг/л ГК, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агар-агара) и культивировали при фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота) (Гавриленко и др., 2019).

В вариантах опыта с темновой инкубацией экспланты после замораживания–оттаивания переносили в чашки Петри со средой MStO, которые плотно заворачивали алюминиевой фольгой и оставляли на тех же светоустановках на 7 дней. Через одну неделю фольгу снимали и продолжали культивирование эксплантов при фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота).

В конце восьмой недели культивирования после замораживания–оттаивания учитывали регенерационную способность эксплантов в каждом варианте опыта (число эксплантов, сформировавших побеги). Данные представляли в процентах к общему числу криоконсервированных эксплантов. Эксперименты выполняли в трех повторностях.

После получения результатов изучения влияния темновой инкубации и типа эксплантов на посткриогенное восстановление была проведена еще одна серия экспериментов по криоконсервации девяти дополнительных сортов (Антонина, Любава, Тулеевский, Фрителла, Югана, Ирбитский, Василек, Гулливер, Кузнечанка). В этой серии экспериментов в каждой повторности опыта изолировали по 20 эксплантов на сорт для контроля посткриогенной регенерации и дополнительно еще 30 эксплантов с последующей их закладкой на длительное криохранилище в биокриоконсерватории ВИР.

Данные посткриогенного восстановления девяти сортов сравнивали с четырьмя показателями морфогенеза растений в культуре *in vitro* (Овэс и др., 2018): 1) продолжительностью периода от черенкования до формирования микрорастениями двух-трех междоузлий; 2) продолжительностью периода от черенкования до формирования микрорастениями четырех-шести междоузлий; 3) продолжительностью периода активного роста микрорастениями; 4) продолжительностью всего вегетационного периода микрорастениями – от черенкования до формирования ими микроклубней. Кроме того, учитывали «возраст мериклона» – общую продолжительность пребывания данного клона в культуре *in vitro*.

Обработку полученных результатов и оценку достоверности различий между вариантами опытов проводили с помощью методов вариационной статистики (*t*-критерий Стьюдента, коэффициент корреляции), а также компьютерной программы STATISTICA 6.0 (модули одно- и двухфакторного анализа).

## Результаты

**Изучение влияния условий культивирования различных типов эксплантов на частоту их посткриогенной регенерации.** Уже на третьей неделе после замораживания–оттаивания наблюдали появление первых регенерантов и на апексах микропобегов, и на пазушных почках в двух вариантах опыта – культивирование эксплантов в темноте и при фотопериоде 16/8 ч (см. рисунок). К концу

восьмой недели культивирования, когда проводился учет частоты посткриогенного восстановления, число регенерирующих эксплантов, как правило, возрастало.

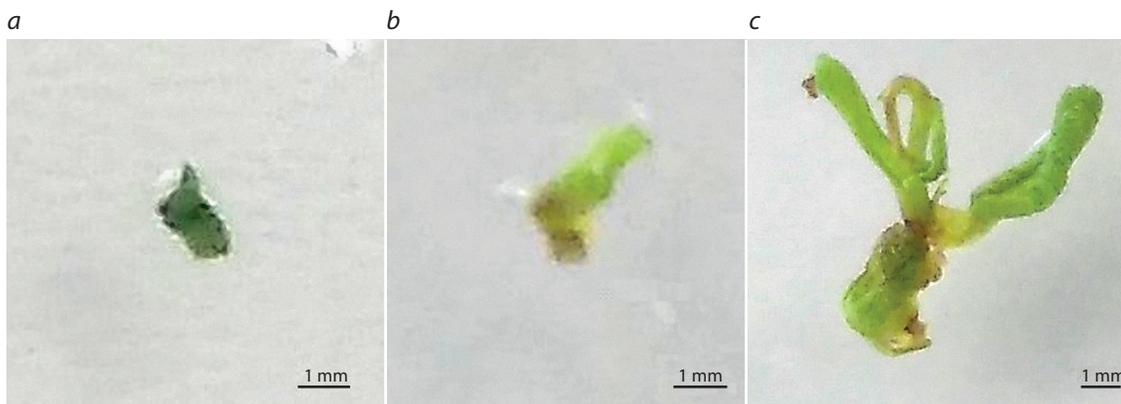
В табл. 1 представлены результаты изучения влияния условий культивирования после замораживания–оттаивания апексов микропобегов и пазушных почек *in vitro* растений на их способность к посткриогенному восстановлению. Длительная темновая инкубация эксплантов не оказывала существенного влияния на частоту посткриогенной регенерации изученных сортов, за исключением сорта Крепыш, для которого отмечено достоверное увеличение частоты регенерации в варианте культивирования апексов микропобегов в темноте по сравнению с вариантом культивирования при фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота) ( $t_{st} = 2.8, p < 0.05$ ) (см. табл. 1). В среднем по суммарным данным, полученным для всех четырех сортов, существенного влияния темновой инкубации на посткриогенное восстановление как апексов микропобегов, так и пазушных почек выявлено не было ( $t_{st} = 0.85, p > 0.05$ ). Результаты однофакторного анализа подтвердили отсутствие достоверного влияния фактора «темновая инкубация» на уровень посткриогенной регенерации изученных сортов ( $p = 0.154$ ).

Влияние типа экспланта на уровень регенерации после оттаивания четырех сортов было статистически значимым ( $p = 0.002$ ). Частота посткриогенной регенерации апексов микропобегов была достоверно выше ( $p < 0.05$ ), чем у пазушных почек, у сорта Удача (культивирование при фотопериоде 16/8 ч) и у сорта Крепыш (культивирование в условиях темновой инкубации) (см. табл. 1). Результаты двухфакторного дисперсионного анализа указывают на отсутствие значимого эффекта совместного действия двух факторов на способность сортов к посткриогенному восстановлению. Отмечено статистически значимое влияние генотипа ( $p = 0.039$ ) на частоту посткриогенной регенерации.

С учетом полученных результатов дальнейшую криоконсервацию расширенной выборки из девяти селекционных сортов проводили с использованием апексов микропобегов, которые после замораживания–оттаивания культивировали при фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота).

**Изучение показателей морфогенеза *in vitro* и способности к посткриогенному восстановлению у селекционных сортов картофеля.** В табл. 2 представлены данные по регенерационной способности апексов микропобегов девяти сортов картофеля после замораживания–оттаивания. По уровню посткриогенной регенерации изученные сорта можно разделить на две группы: образцы с регенерационной способностью менее 40 % (сорта Любава, Тулеевский, Фрителла), и сорта, регенерационная способность которых была выше 40 % (Антонина, Ирбитский, Василек, Гулливер, Кузнечанка). Полученные результаты указывают на существенное ( $p < 0.05$ ) влияние генотипа на показатель посткриогенной регенерации, что отмечается и в большинстве работ по криоконсервации разных видов растений, включая картофель (Vamberg et al., 2016; Volk et al., 2016; Ухатова и др., 2017; Vollmer et al., 2017).

В нашей работе была изучена связь между различными морфогенетическими признаками – способностью сортов к посткриогенному восстановлению и показателями фаз



Formation of postcryogenic regenerants in Krepysh variety during the cultivation of shoot tips on MSTo nutrient medium, lighting schedule 16L:8D.

(a) Explant in the first week after thawing; (b) emergence of a regenerant in the third week; (c) regenerant development in the eighth week of cultivation.

**Table 1.** Frequencies of postcryogenic regeneration in different conditions of cultivation of two types of explants (shoot tips and axillary buds) of potato varieties

| Variety     | Variants of experiments |                |                               |                |
|-------------|-------------------------|----------------|-------------------------------|----------------|
|             | 16L:8D                  |                | Long dark incubation (1 week) |                |
|             | Shoot tips              | Axillary buds  | Shoot tips                    | Axillary buds  |
| Il'inskiy   | 33.3 ± 22.0 b           | 16.7 ± 11.0 bc | 40.8 ± 15.8 ab                | 12.5 ± 7.2 bc  |
| Krepysh     | 43.3 ± 6.7 b            | 36.7 ± 12.0 b  | 62.5 ± 1.4 a                  | 30.0 ± 11.5 bc |
| Nakra       | 20.0 ± 10.0 bc          | 20.0 ± 10.0 bc | 35.0 ± 5.0 b                  | 17.5 ± 7.5 bc  |
| Udacha      | 30.0 ± 5.8 b            | 14.2 ± 3.0 c   | 46.7 ± 16.7 ab                | 17.5 ± 6.3 bc  |
| $X \pm m_x$ | 31.7 ± 4.8 b            | 21.9 ± 5.9 bc  | 46.3 ± 5.9 b                  | 19.4 ± 3.7 bc  |

Note: Differences between values marked with different letters are significant at  $p < 0.05$ .

**Table 2.** Frequencies of postcryogenic regeneration of potato varieties and their morphogenetic indicators in micropropagation

| Variety     | Frequency of postcryogenic regeneration, % | Morphogenetic parameters of microplants (the timing of development phases, days) |       |       |       | Age of the original mericlone |
|-------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------------------------------|
|             |                                            | Phase of intense growth of microplants                                           |       | 3     | 4     |                               |
|             |                                            | 1                                                                                | 2     |       |       |                               |
| Lyubava     | 30.0 ± 15.3                                | 12–15                                                                            | 30–35 | 30–45 | 45–85 | 3                             |
| Tuleevskiy  | 35.0 ± 5.0                                 | 12–15                                                                            | 30–35 | 30–45 | 45–75 | 4                             |
| Fritella    | 35.0 ± 5.0                                 | 20–23                                                                            | 38–45 | 45–55 | 55–80 | 3                             |
| Yugana      | 40.0 ± 10.0                                | 12–15                                                                            | 25–30 | 25–45 | 45–80 | 4                             |
| Antonina    | 41.7 ± 8.4                                 | 12–15                                                                            | 25–30 | 25–45 | 45–80 | 4                             |
| Irbitskiy   | 45.0 ± 5.0                                 | 20–23                                                                            | 38–45 | 45–55 | 55–80 | 4                             |
| Vasilek     | 45.0 ± 5.0                                 | 12–15                                                                            | 30–35 | 30–45 | 45–65 | 3                             |
| Гулливер    | 50.0 ± 16.7                                | 12–15                                                                            | 25–30 | 25–45 | 45–80 | 2                             |
| Kuznechanka | 60.0 ± 10.0                                | 15–20                                                                            | 30–35 | 30–65 | 65–90 | 4                             |

Notes: Designations of morphogenetic parameters: 1, time from grafting to the formation of two or three internodes in the plants; 2, time from grafting to the formation of four to six internodes; 3, time of intense growth; 4, duration of the whole vegetation period of microplants, from grafting to microtuber formation.

роста и развития *in vitro* растений в процессе их микро-размножения (см. табл. 2). Данные морфогенетические показатели применяются при выращивании микро-растений с целью дальнейшего получения мини-клубней и в настоящее время начинают использоваться в коммерческих компаниях, производящих микро-растения картофеля в больших объемах (Овэс и др., 2018).

Три сорта из девяти (Гулливер, Югана, Антонина) характеризовались ускоренным протеканием фаз интенсивного роста микро-растений (показатели 1 и 2), поэтому период достижения микро-растениями этих сортов стандартных размеров (4–6 междоузлий) не превышал одного календарного месяца (см. табл. 2). Эти три сорта выделялись также наиболее короткой продолжительностью периода активного роста *in vitro* растений (показатель 3). Поздний срок наступления фазы интенсивного роста микро-растений отмечен для сортов Ирбитский и Фри-телла. Наибольшая продолжительность всего вегетационного периода в культуре *in vitro* отмечена для микро-растений сорта Кузнечанка (см. табл. 2). Наличие статистически значимой положительной корреляции отмечено для морфогенетических показателей 1 и 2 ( $r = 0.90$ ), 1 и 3 ( $r = 0.96$ ), 2 и 3 ( $r = 0.88$ ), 3 и 4 ( $r = 0.93$ ). В то же время статистически достоверной корреляции между способностью изученных девяти сортов к ускоренному морфогенезу в условиях *in vitro* и частотой их посткриогенной регенерации не выявлено. Возраст мериклона не оказывал существенного влияния ни на показатели морфогенеза, ни на частоту посткриогенной регенерации сортов (см. табл. 2).

## Заключение

Результаты изучения посткриогенного регенерационного потенциала сортов картофеля в разных условиях культивирования указывают на отсутствие существенного влияния длительной темновой инкубации эксплантов и значительный эффект типа экспланта: фактически у всех сортов частота посткриогенной регенерации апексов микро-побегов была выше, чем у пазушных почек. Установлено достоверное влияние генотипа на регенерационную способность сортов после замораживания–оттаивания. Способность сортов к посткриогенному восстановлению не связана со значениями морфогенетических показателей *in vitro* растений; возраст мериклона также не оказывал существенного влияния ни на показатели морфогенеза, ни на частоту посткриогенной регенерации сортов. В практическом плане для дальнейшего пополнения криоколлекции сортов картофеля можно рекомендовать модифицированный в ВИР метод дроблет-витрификации. При его применении следует использовать апексы микро-побегов, регенерация которых проводится при стандартных для этого метода условиях (Гавриленко и др., 2019). Данный метод эффективен для криоконсервации сортов различного происхождения, контрастных по морфогенетическому потенциалу в культуре *in vitro*.

## Список литературы / References

Гавриленко Т.А., Дунаева С.Е., Трускинов Э.В., Антонова О.Ю., Пендинен Г.И., Лупышева Ю.В., Роговая В.В., Швачко Н.А. Стратегия долгосрочного сохранения генофонда вегетативно

размножаемых сельскохозяйственных растений в контролируемых условиях среды. Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции. СПб., 2007;164:273-283.

[Gavrilenko T.A., Dunaeva S.E., Truskinov E.V., Antonova O.Yu., Pendinen G.I., Lupysheva Yu.V., Rogovaya V.V., Shvachko N.A. A strategy of long-term conservation of vegetatively propagated crops under controlled conditions. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektcii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. St. Petersburg, 2007;164:273-283. (in Russian)]

Гавриленко Т.А., Швачко Н.А., Волкова Н.Н., Ухатова Ю.В. Модифицированный метод дроблет-витрификации для криоконсервации апексов *in vitro* растений картофеля. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23. DOI 10.18699/VJ19.505.

[Gavrilenko T.A., Shvachko N.A., Volkova N.N., Ukhatoeva Yu.V. A modified droplet vitrification method for cryopreservation of shoot tips from the potato *in vitro* plants. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23. DOI 10.18699/VJ19.505. (in Russian)]

Дунаева С.Е., Пендинен Г.И., Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А. Сохранение вегетативно размножаемых культур в *in vitro* и криоколлекциях. СПб.: ВИР, 2011.

[Dunaeva S.E., Pendinen G.I., Antonova O.Yu., Shvachko N.A., Volkova N.N., Gavrilenko T.A. Preservation of Vegetatively Propagated Crops *in vitro* and in Cryocollections. St. Petersburg: VIR Publ., 2011. (in Russian)]

Овэс Е.В., Анисимов Б.В., Симаков Е.А., Жевора С.В., Гаитова Н.А. Особенности морфогенеза *in vitro* и оценка фенотипической идентичности сортовых признаков картофеля. Картофель и овощи. 2018;7:33-36. DOI 10.25630/PAV.2018.7.18246.

[Oves E.V., Anisimov B.V., Simakov E.A., Zhevora C.V., Gaitova N.A. Peculiarities of morphogenesis *in vitro* and evaluation of potato cultivars for compliance. Kartofel i Ovoshchi = Potato and Vegetables. 2018;7:33-36. DOI 10.25630/PAV.2018.7.18246. (in Russian)]

Ухатова Ю.В., Гавриленко Т.А. Методы криоконсервации вегетативно размножаемых культурных растений. Биотехнология и селекция растений. 2018;1(1):52-63. DOI 10.30901/2658-6266-2018-1-52-63.

[Ukhatoeva Yu.V., Gavrilenko T.A. Cryoconservation methods for vegetatively propagated crops (review). Biotechnologiya i Selektciya Rasteniy = Plant Biotechnology and Breeding. 2018;1(1):52-63. DOI 10.30901/2658-6266-2018-1-52-63 (in Russian)]

Ухатова Ю.В., Овэс Е.В., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А. Криоконсервация селекционных сортов картофеля в ВИРе. Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции. СПб., 2017;178(3):13-20. DOI 10.30901/2227-8834-2017-3-13-20.

[Ukhatoeva Yu.V., Oves E.V., Volkova N.N., Gavrilenko T.A. Cryoconservation of potato breeding cultivars at VIR. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektcii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. St. Petersburg, 2017;178(3):13-20. DOI 10.30901/2227-8834-2017-3-13-20 (in Russian)]

Филипенко Г.И. Развитие системы низкотемпературного хранения и криоконсервации генофонда растений в ВИР имени Н.И. Вавилова. Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции. 2007;164:263-272.

[Filipenko G.I. Development of the system of low-temperature storage and cryopreservation of plant genetic resources at VIR. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektcii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. St. Petersburg, 2007;164:263-272. (in Russian)]

Bamberg J.B., Martin M.W., Abad J., Jenderek M.M., Tanner J., Donnelly D.J., Nassar M.K., Veilleux R.E., Novy R.G. *In vitro* technology at the US Potato Genebank. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2016;52:213-225. DOI 10.1007/s11627-016-9753-x.

FAO. Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rev. ed. Rome. 2014;182.

Jenderek M.M., Reed B.M. Cryopreserved storage of clonal germplasm in the USDA National Plant Germplasm System. In Vitro Cell.

- Dev. Biol. Plant. 2017;53(4):299-308. DOI 10.1007/s11627-017-9828-3.
- Kaczmarczyk A., Rokka V.M., Keller E.R.J. Potato shoot tip cryopreservation. A review. Potato Res. 2011;54:45-79. DOI 10.1007/s11540-010-9169-7.
- Kim H.H., Yoon J.W., Park Y.E., Cho E.G., Sohn J.K., Kim T.S., Engelmann F. Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species: critical factors in droplet vitrification. CryoLetters. 2006; 27(4):223-234.
- Niino T., Valle Arizaga M. Cryopreservation for preservation of potato genetic resources. Breed. Sci. 2015;65(1):41-52. DOI 10.1270/jsbbs.65.41.
- Panis B., Piette B., Swennen R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. Plant Sci. 2005;168:45-55. DOI 10.1016/j.plantsci.2004.07.022.
- Panta A., Panis B., Ynouye C., Swennen R., Roca W., Tay D., Ellis D. Improved cryopreservation method for the long-term conservation of the world potato germplasm collection. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2015;120:117-125. DOI 10.1007/s11240-014-0585-2.
- Shvachko N., Gavrilenko T. Cryopreservation of potato landraces using droplet-vitrification method. In: Grapin A., Keller J., Lynch P., Panis B., Revilla A., Engelmann F. (Eds.). Cryopreservation of Crop Species in Europe: Proc. of COST Action 871 Final meeting. Angers, France, 2011;135-137.
- Volk G.M., Henk A.D., Jenderek M.M., Richards C.M. Probabilistic viability calculations for cryopreserving vegetatively propagated collections in genebanks. Genet. Resour. Crop Evol. 2016;64(7): 1613-1622. DOI 10.1007/s10722-016-0460-6.
- Vollmer R., Villagaray R., Cárdenas J., Castro M., Chávez O., Anglin N.L., Ellis D. A large-scale viability assessment of the potato cryobank at the International Potato Center (CIP). In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2017;53(4):309-317. DOI 10.1007/s11627-017-9846-1.
- Vollmer R., Villagaray R., Egusquiza V., Espirilla J., Garcia M., Torres A., Rojas E., Panta A., Barkley N.A., Ellis D. The potato cryobank at the International Potato Center (CIP): a model for long term conservation of clonal plant genetic resources collections of the future. CryoLetters. 2016;37(5):318-329.

---

**ORCID ID**

T.A. Gavrilenko orcid.org/0000-0002-2605-6569

**Acknowledgements.** The authors are grateful to Cand. Sci. (Tech) L.Yu. Novikova for assistance in the statistical analysis of the results. This work was supported by the program Comprehensive Plans of Research, subproject 0481-2018-0023 "Potato breeding and seed industry in the Russian Federation", project "Federal R&D program of farming industry development in 2017-2025". The maintenance of the *in vitro* potato collection kept in the Shared Access Center "VIR Collection", whose material was used in cryopreservation, was supported by Project 0662-2019-0004.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received November 30, 2018. Revised March 6, 2019. Accepted March 10, 2019.