

ДЛИТЕЛЬНОЕ СОХРАНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ РОССИЙСКИХ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ В КРИБАНКЕ ВИР

Ефремова О.С., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А.*

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44; *✉ tatjana9972@yandex.ru

Основой долгосрочного хранения селекционных сортов картофеля является криоконсервация апексов *in vitro* растений. Наиболее широко для создания криоколлекций картофеля применяется метод капель-витрификации (Panis et al., 2005), который, как и его многочисленные модификации, используется в крупнейших мировых генбанках. Для криоконсервации апексов *in vitro* растений разных образцов картофеля в ВИР используют модифицированный метод капель-витрификации. В настоящей статье приведены результаты криоконсервации современных сортов, выведенных в семи селекционных центрах Российской Федерации. В опытах по криоконсервации участвовали генотипированные с применением SSR маркеров клоны микрорастений, микросателлитные профили которых совпали с SSR-спектрами номенклатурных стандартов сортов и гербарных ваучеров селекционных клонов. Частота посткриогенной регенерации в контрольных экспериментах после краткосрочной криоконсервации варьировала от 23,3 до 53,3%. Пять из 16 образцов ('Варяг', 'Гусар', 'Евпатий', 'Солнечный', 'Танго') имели низкие показатели посткриогенной регенерационной способности – от 20 до 30%; у 11 образцов частота регенерации превышала 30%, из них у восьми сортов ('Гранд', 'Златка', 'Лина', 'Сафо', 'Сиверский', 'Сигнал', 'Утро', 'Юна') и у селекционного клона 'Алый Парус' отмечена частота регенерации выше 40%. Дисперсионный анализ не выявил достоверного влияния генотипа на проявление признака регенерационной способности в изученной выборке образцов ($p=0,711$). Регенерационная способность образцов в контрольном эксперименте при краткосрочном хранении апексов в жидком азоте достоверно коррелировала с жизнеспособностью эксплантов ($r=0,86$). Результаты проведенных экспериментов позволили пополнить криоколлекцию картофеля, сохраняемую в криобанке ВИР, эксплантами 14 современных российских сортов и двух селекционных клонов с известным уровнем посткриогенной регенерации. Четыре сорта ('Гранд', 'Гусар', 'Сигнал', 'Утро') участвовали в мониторинге регенерационной способности эксплантов, длительно сохраняемых в криобанке ВИР при сверхнизких температурах. У этих сортов детектированы регенеранты после размораживания единичных криопробирок, хранившихся в криобанке ВИР около 7 месяцев. В среднем регенерационная способность после семимесячного хранения составила 41,8%, что не отличается достоверно от регенерационной способности в контроле. Можно заключить, что применение модифицированного метода капель-витрификации остается актуальным для пополнения криоколлекции картофеля ВИР.

Ключевые слова: криоконсервация, *Solanum tuberosum*, селекционные сорта.

Прозрачность финансовой деятельности/Financial transparency

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. / The authors have no financial interest in the presented materials or methods.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация/Additional information

Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2020-3-01>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Все авторы одобрили рукопись / All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

LONG-TERM PRESERVATION OF MODERN RUSSIAN POTATO CULTIVARS IN THE VIR CRYOBANK

Efremova O.S., Volkova N.N., Gavrilenko T.A.*

N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia; *✉ tatjana9972@yandex.ru

Cryopreservation of shoot-tips (apexes) excised from *in vitro* plants is used for long-term preservation of potato cultivars. The most widely used method for creating potato cryo-collections is droplet-vitrification of shoot-tips which, together with its numerous modifications, is widely used in genebanks. A modified protocol of droplet vitrification method is used at VIR for cryopreservation of shoot tips from *in vitro* potato plants. This paper presents the results of cryopreservation of modern cultivars which were released by seven Russian breeding centers. *In vitro* clones used in the cryopreservation experiments were genetically identical to the cultivars' nomenclatural standards and herbarium vouchers. The frequency of post-thaw regeneration in control experiments after short-term cryopreservation varied from 23.3 to 53.3%, depending on the genotype. Five out of 16 accessions ('Varag', 'Gusar', 'Evpatij', 'Solnečnyj', 'Tango')* had low post-cryogenic regenerative capacity from 20 to 30%; the regeneration rate exceeded 30% in 11 accessions, and 8 cultivars ('Grand', 'Zlatka', 'Lina', 'Safo', 'Siverskij', 'Signal', 'Utro', 'Una') and 'Alyj Parus' breeding clone had regeneration rate above 40%. The regeneration rate in the studied subset was genotype independent according to the ANOVA results ($p=0.711$). Viability and regeneration rate were significantly correlated ($r=0.86$). As a result of the experiments, explants of 14 modern cultivars and two breeding clones with the known post-thaw regeneration rate were successfully cryopreserved in the VIR cryobank. Four cultivars ('Grand', 'Gusar', 'Signal', 'Utro') were monitored for their regeneration capacity after the long-term (seven months) preservation in the VIR cryobank. On an average, these four cultivars demonstrated a post-thaw regeneration capacity of 41.8%. It can be concluded that the use of the modified method of droplet vitrification is relevant for increasing the VIR potato cryo-collection.

Key words: cryopreservation, *Solanum tuberosum*, released cultivars.

Для цитирования: Ефремова О.С., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А. Длительное сохранение современных российских сортов картофеля в криобанке ВИР. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(3):68-76. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-3-01

For citation: Efremova O.S., Volkova N.N., Gavrilenko T.A. Long-term preservation of modern Russian potato cultivars in the VIR cryobank. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(3):68-76. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-3-01

ORCID:

Efremova O.S. <https://orcid.org/0000-0001-9212-2117>
Gavrilenko T.A. <https://orcid.org/0000-0002-2605-6569>
Volkova N.N. <https://orcid.org/0000-0001-8034-9891>

УДК 635.21:57.043

Поступила в редакцию: 17.11.2020

Принята к публикации: 15.12.2020

*Транслитерация названий сортов здесь и далее дана в соответствии с рекомендацией 33А МКНKP (Brickell et al., 2016).

Введение

Криоконсервация позволяет осуществить долгосрочное хранение генофонда селекционных сортов картофеля. Для криоконсервации образцов применяют метод дроплет-витрификации (Niino, Arizaga, 2015; Panis et al., 2016; Ukhatoва, Gavrilenko, 2018; Muthoni et al., 2019), который был разработан ведущим специалистом по криобиологии растений Бартом Панисом с коллегами (Panis et al., 2005). Различные модификации данного метода нашли применение для криоконсервации в крупнейших мировых генбанках апексов *in vitro* растений картофеля (Kim et al., 2006; Panta et al., 2015; Vollmer et al., 2016; Jenderek, Reed, 2017; СIP, 2018; Muthoni et al., 2019), в том числе для криоконсервации образцов *in vitro* коллекции ВИР (Dunayeva et al., 2011, 2017; Ukhatoва et al., 2017; Gavrilenko et al., 2019).

В настоящее время криоколлекции картофеля, в состав которых входят образцы селекционных сортов, аборигенных южноамериканских сортов и гибридных образцов, имеются во многих генбанках мира: IPK/GLKS – Германия (Keller et al., 2014), International Potato Center (CIP) – Перу (Vollmer et al., 2017), NCGRP – США (Bamberg et al., 2016), NAC – Корея (Niino, Arizaga, 2015), CAES – Япония (Hirai, 2011), ВИР – Россия (Ukhatoва, Gavrilenko, 2018). Регламент закладки образцов картофеля на длительное хранение в разных криобанках несколько отличается. Так, например, для пополнения криобанка CIP (Перу) на криохранение закладывается 120 эксплантов на образец; при этом рекомендован минимальный уровень посткриогенной регенерации не ниже 30%, при более низких контрольных показателях – от 20 до 30% – число закладываемых на хранение эксплантов должно быть увеличено (Vollmer et al., 2016, 2017). Для пополнения криоколлекции сортов картофеля в ВИРе, в криобанк передается по 90 эксплантов на образец; в последние годы для закладки образца рекомендована частота регенерации после замораживания-оттаивания не ниже 30% (табл. 1).

В наиболее крупном криобанке картофеля в IPK/GLKS хранится около 1500 образцов (Muthoni et al., 2019; Stock et al., 2019), большая часть которых представлена стародавними европейскими сортами. В криобанке CIP хранится более 1000 образцов, в основном южноамериканских аборигенных сортов (Vollmer et al., 2017).

В ВИР плановые работы по закладке образцов картофеля в криобанк на длительное хранение начались относительно недавно (Ukhatoва et al., 2017; Ukhatoва, Gavrilenko, 2018), хотя методические исследования по криоконсервации ведутся с 2010 года (Shvachko, Gavrilenko, 2011; Dunayeva et al., 2011). Стратегия формирования *in vitro* и криоколлекций картофеля направлена на сохранение отечественного селекционного материала (сорта, доноры, источники ценных признаков), а также

образцов культурных южноамериканских видов, собранных в разные годы экспедициями ВИР (Gavrilenko et al., 2007).

Недавно в институте была инициирована новая комплексная программа по созданию номенклатурных стандартов российских сортов картофеля, их молекулярной паспортизации и дублированию таких образцов в *in vitro* и криоколлекциях (Gavrilenko, Chukhina, 2020, см. в этом же выпуске). В настоящей работе в криоконсервации участвовали генотипированные с применением SSR маркеров клоны микрорастений, генетически идентичные номенклатурным стандартам сортов и гербарным ваучерам селекционных клонов (Klimenko et al., 2020; Fomina et al., 2020 a, см. в этом же выпуске; Rybakov et al., 2020; Fomina et al., 2020 b, см. в следующем выпуске).

Материалы и методы

Материал для исследований включал 16 образцов картофеля (14 сортов и два селекционных клона – ‘Евпатий’ и ‘Алый Парус’), переданных в ВИР из семи селекционных центров, где они были созданы (табл. 2). Материал поступил в ВИР в 2018 г. из Ленинградского НИИСХ «Белогорка» и ООО Селекционной фирмы «ЛиГа», из СибНИИРС филиала ИЦиГ СО РАН, СибНИИСХиТ филиала СФНЦА РАН и в 2019 г. – из ВНИИКС им. А.Г. Лорха и ООО «Агроцентр «Коренево». При регистрации поступивших в ВИР образцов им присваивались интродукционные номера с префиксом «о» (см. табл. 2).

Данный материал был передан в гербарий ВИР авторами сортов в виде побегов и клубней для оформления номенклатурных стандартов и ваучерных образцов. Кроме того, из трех институтов материал параллельно передавался и в виде *in vitro* растений: четыре сорта – из СибНИИРС филиала ИЦиГ СО РАН (‘Златка’, и-0161536; ‘Лина’, и-0161537; ‘Сафо’, и-0161538; ‘Юна’, и-0161539); шесть образцов – из ВНИИКС им. А.Г. Лорха (‘Варяг’, и-0161511; ‘Гранд’, и-0161515; ‘Краса Мещеры’, и-0161520; ‘Утро’, и-0161530; ‘Сигнал’ и ‘Евпатий’); один – из СибНИИКСиТ филиала СФНЦА РАН (‘Солнечный’, и-0161540). Образцы из Ленинградского НИИСХ «Белогорка» и ООО Селекционной фирмы «ЛиГа» (‘Алый парус’, и-0161644; ‘Гусар’, и-0161647; ‘Даная’, и-0161648; ‘Сиверский’, и-01616604) были введены в культуру *in vitro* в отделе биотехнологии ВИР. Материалом для получения микрорастений этих сортов послужили меристемы, вычлененные у световых ростков клубней, переданных авторами в гербарий ВИР. Сорт ‘Танго’, селекции ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН также был введен в культуру *in vitro* в ВИР. Все 16 образцов картофеля, изученные в данной работе, поддерживаются в *in vitro* коллекции ВИР.

В опытах по криоконсервации участвовали генотипированные с использованием маркеров SSR клоны микрорастений. Для 12 из них (‘Варяг’, ‘Гранд’, ‘Гусар’,

‘Даная’, ‘Златка’, ‘Краса Мещеры’, ‘Лина’, ‘Сафо’, ‘Сиверский’, ‘Солнечный’, ‘Утро’, ‘Юна’) подтверждено соответствие SSR спектрам номенклатурных стандартов сортов и для двух (‘Алый Парус’, ‘Танго’) – соответствие SSR спектрам гербарных ваучеров селекционных клонов (Klimenko et al., 2020; Fomina et al., 2020 a, см. в этом же выпуске; Rybakov et al., 2020; Fomina et al., 2020 b, см. в следующем выпуске). Молекулярно-генетическое изучение оставшихся двух образцов – ‘Сигнал’ и ‘Евпатий’ – еще не закончено.

Методы. Криоконсервацию проводили в 2018-2020 гг. с использованием метода дроплет-витрификации (Panis et al., 2005), несколько этапов которого были модифицированы в отделе биотехнологии ВИР. В статье (Gavrilenko et al., 2019) приведено подробное описание модифицированного протокола криоконсервации, а также состава питательной среды MS для культивирования микрорастений, состава растворов с осмо- и криопротекторами для замораживания (LS и PVS2), раствора RS для оттаивания эксплантов и среды MSTo для посткриогенной регенерации. Ниже приведено краткое описание модифицированного метода дроплет-витрификации.

Исходные *in vitro* растения культивировали 3-4 неде-

ли на питательной среде MS без гормонов. Вычленимые апексы микрорастений помещали в стерильные чашки Петри с жидкой средой MS; после набора 60 апексов среду MS заменяли жидкой средой LS. По истечении 20 минутного культивирования среду LS отбирали пипеткой и к эксплантам добавляли охлажденный раствор PVS2. Далее, на полоски алюминиевой фольги наносили капли раствора PVS2, и в каждую каплю переносили по одному апексу. Затем полоски с эксплантами погружали в криопробирки, заполненные жидким азотом.

Эксперименты выполняли в трех независимых повторностях (см. табл. 1). В каждой повторности изолировали по 60 эксплантов, из них 10 эксплантов использовали для контроля качества сред (без погружения в жидкий азот – вариант ‘-LN’), 20 – погружали в жидкий азот на 1 час для контроля посткриогенной регенерационной способности после оттаивания (вариант ‘+LN’), оставшиеся 30 эксплантов оставляли в сосуде Дьюара и впоследствии передавали на длительное криохранилище в криобанк ВИР. В итоге, в криобанк закладывали по 90 апексов (3×30 шт.) каждого образца. В отдельных случаях число эксплантов определенного образца было больше или меньше на 1-2 шт.

Таблица 1. Регламент закладки образцов картофеля на длительное хранение в криобанк ВИР (Ukhatova, Gavrilenko, 2018, с модификациями)

Table 1. Regulations for potato accessions long-term storage in the VIR cryobank (Ukhatova, Gavrilenko, 2018, with modifications)

Для криоконсервации и криохранения одного коллекционного образца необходимо 180 эксплантов (апексов микрорастений):			
КОНТРОЛЬ ‘-LN’: (без погружения эксплантов в азот)	КОНТРОЛЬ ‘+LN’: ПОСТКРИОГЕННОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ДО ЗАКЛАДКИ В КРИОБАНК (краткосрочная криоконсервация – погружение эксплантов в жидкий азот на 1 час)	ДЛИТЕЛЬНАЯ КРИОКОНСЕРВАЦИЯ: (закладка эксплантов в криобанк на долгосрочное хранение)	МОНИТОРИНГ посткриогенной регенерации после 0,5 и более лет хранения в криобанке
30 эксплантов (10x3)	60 эксплантов (20x3)	90 эксплантов (30x3)	10 эксплантов (одна криопробирка 10x1)
Оценка регенерационной способности эксплантов без замораживания в трех повторностях по 10 эксплантов в каждой	Оценка регенерационной способности после оттаивания - в трех повторностях по 20 эксплантов в каждой	Пополнение криоколлекции ВИР: в трех повторностях, в каждой по 30 эксплантов (3 криопробирки по 10 эксплантов в каждой)	В зависимости от результата могут быть повторные выемки криопробирок
Криоконсервация проводится в трех независимых повторностях в каждой по 60 эксплантов (10 – для контроля ‘-LN’, 20 – для контроля ‘+LN’ и 30 эксплантов для передачи в криобанк ВИР)			

В контрольных экспериментах по оценке посткриогенной регенерационной способности через час после замораживания апексов микрорастений в жидком азоте проводили оттаивание эксплантов, для чего из сосуда Дьюара извлекали по две криопробирки (20 апексов) на повторность и помещали их на 15 минут в среду RS для размораживания при комнатной температуре. Затем экспланты переносили в чашки Петри со средой MSTo и культивировали в световой комнате. Эффективность восстановления после криоконсервации для каждого образца оценивали по двум показателям: (1) жизнеспособности эксплантов (% зеленых почек на питательной среде MSTo) и (2) регенерационной способности (% эксплантов, сформировавших микропобеги). Жизнеспособность и регенерационную способность эксплантов учитывали через 3, 6, 8 недель.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы STATISTICA 13.3. Достоверность различия генотипов по жизнеспособности и регенерационной способности эксплантов исследована с использованием дисперсионного анализа, достоверность различий вариантов опыта – с использованием *t*-критерия Стьюдента для зависимых выборок.

Результаты и обсуждение

Криоконсервация сортов картофеля. На рисунке 1 и в таблице 2 представлены результаты контрольных экспериментов по криоконсервации апексов микрорастений 16 образцов картофеля. В контрольном варианте без погружения в жидкий азот ('-LN') жизнеспособность эксплантов варьировала от 36,7 до 80,0%, и в среднем по 16 образцам составила 57,2%. Все жизнеспособные экспланты в контроле '-LN' регенерировали. Регенерационная способность генотипов в варианте контроля '-LN' достоверно не различалась (ANOVA $p=0,367$).

В контрольных экспериментах с краткосрочным погружением в жидкий азот на 1 час ('+LN') у всех сортов зафиксирована способность к посткриогенному восстановлению. Жизнеспособность после оттаивания в этом контрольном варианте варьировала от 26,7 до 75,0%, и в среднем по 16 образцам составила 46,0%, т.е. краткосрочная криоконсервация снизила жизнеспособность сорта в среднем на 11,2% (достоверность различий по *t*-критерию – $p=0,017$). В контрольном варианте '+LN' дисперсионный анализ не выявил существенного влияния генотипа ни на жизнеспособность

($p=0,325$), ни на регенерационную способность эксплантов ($p=0,501$).

У проанализированных сортов в варианте '+LN' (краткосрочное погружение в жидкий азот на 1 час) частота посткриогенной регенерации варьировала от 23,3 до 53,3% (табл. 2), и в среднем составила 39,5%, т.е. процент регенерировавших апексов снизился по сравнению с процентом жизнеспособных эксплантов на 6,5% ($p=0,001$). По сравнению с контрольным вариантом без погружения в жидкий азот '-LN', процент регенерировавших эксплантов в контрольном варианте '+LN' снизился на 17,7% (с 57,2 до 39,5%, $p<0,001$) (табл. 2). У 11 из 16 образцов частота регенерации превышала 30%, а у девяти образцов была выше 40% (8 сортов: 'Гранд', 'Златка', 'Лина', 'Сафо', 'Сиверский', 'Сигнал', 'Утро', 'Юна' и селекционный клон 'Алый Парус'); в ряде случаев отмечены существенные различия между повторностями опытов. Пять образцов (сорта 'Варяг', 'Гусар', 'Солнечный', 'Танго' и селекционный клон 'Евпатий') имели низкие показатели регенерационной способности – от 20 до 30% (см. табл. 2). Дисперсионный анализ не выявил достоверных различий между регенерационной способностью генотипов ($p=0,711$) для изученной выборки. Регенерационная способность и жизнеспособность образцов в контрольном варианте '+LN' достоверно коррелировали ($r=0,86$); также выявлена корреляция ($r=0,59$) регенерационной способности образцов в контрольных вариантах '+LN' и '-LN'.

В результате проведенных экспериментов, криоколлекция картофеля, сохраняемая в криобанке ВИР, пополнилась 16 образцами – по 90 апексов каждого образца передано на длительное хранение.

Для долгосрочного сохранения образцов коллекций в криобанках наиболее важным показателем является частота посткриогенной регенерации в контрольных экспериментах '+LN' (краткосрочное погружение в жидкий азот на 1 час) перед закладкой образца на длительное криохранилище. Первоначально минимально допустимым уровнем при закладке образцов на криохранилище считалась частота 20% (IPGRI, 2000). В последние годы данный уровень был повышен на основании статистических подсчетов вероятности посткриогенного восстановления образцов с учетом числа сохраняемых эксплантов каждого образца. По мнению Б. Паниса, частота регенерации после оттаивания закладываемого на хранение в криобанк образца должна быть не ниже 39% (Panis et al., 2016).

Таблица 2. Жизнеспособность и регенерационная способность апексов микрорастений образцов картофеля после краткосрочного (1 час) и длительного (около семи месяцев) хранения в жидком азоте

Table 2. Viability and regenerative capacity of apices from *in vitro* plants of potato accessions after short-term (1 hour) and long-term (about seven months) storage in liquid nitrogen

№ п/п	Образец	№ интродукционный «и»»	Краткосрочное (1 час) хранение в жидком азоте:				Регенерационная способность после длительного (7 месяцев) хранения, %
			Жизнеспособность, %		Регенерационная способность, %		
			-LN	+LN	-LN	+LN	
Сорта селекции ВНИИКХ им. А.Г. Лорха и ООО «Агроцентра «Коренево»							
1	‘Варяг’	o161511	46,7±17,6	26,7±8,3	46,7±17,6	23,3±7,3	
2	‘Гранд’	o161515	56,7±6,7	50,0±10,0	56,7±6,7	41,7±6,0	27,0±13,4
3	‘Евпатий’*		36,7±12,0	35,0±7,6	36,7±12,0	25,0±5,8	
4	‘Краса Мещеры’	o161520	36,7±8,8	45,0±13,2	36,7±8,8	36,7±10,9	
5	‘Сигнал’		63,3±17,6	48,8±4,7	63,3±17,6	48,8±4,7	70,0±14,5
6	‘Утро’	o161530	60,0±5,8	53,3±16,4	60,0±5,8	45,0±8,7	40,0±15,5
Сорта сибирской селекции							
7	‘Златка’	o161536	55,0±15,0	75,0±5,0	55,0±15,0	50,0±30,0	
8	‘Лина’	o161537	80,0±10,0	50,0±20,0	80,0±10,0	50,0±20,0	
9	‘Сафо’	o161538	73,3±12,0	53,3±8,8	73,3±12,0	46,7±12,0	
10	‘Солнечный’	o161540	66,7±8,8	33,3±8,8	66,7±8,8	30,0±10,0	
11	‘Юна’	o161539	76,7±6,7	53,3±14,5	76,7±6,7	53,3±14,5	
Сорта селекции Ленинградского НИИСХ «Белогорка» и ООО Селекционной фирмы «ЛиГа»							
12	‘Алый парус’*	o161644	49,7±10,1	52,5±14,7	49,7±10,1	40,7±5,8	
13	‘Гусар’	o161647	46,7±3,3	35,0±5,0	46,7±3,3	28,3±4,4	30,0±14,5
14	‘Даная’	o161648	46,2±3,8	40,4±11,9	46,2±3,8	36,9±11,8	
15	‘Сиверский’	o161660	55,0±5,0	55,0±15,0	55,0±5,0	45,0±15,0	
Сорта селекции ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН							
16	‘Танго’		66,7±28,5	30,0±5,8	66,7±28,5	30,0±5,8	

Примечание: *отмечены селекционные клоны.

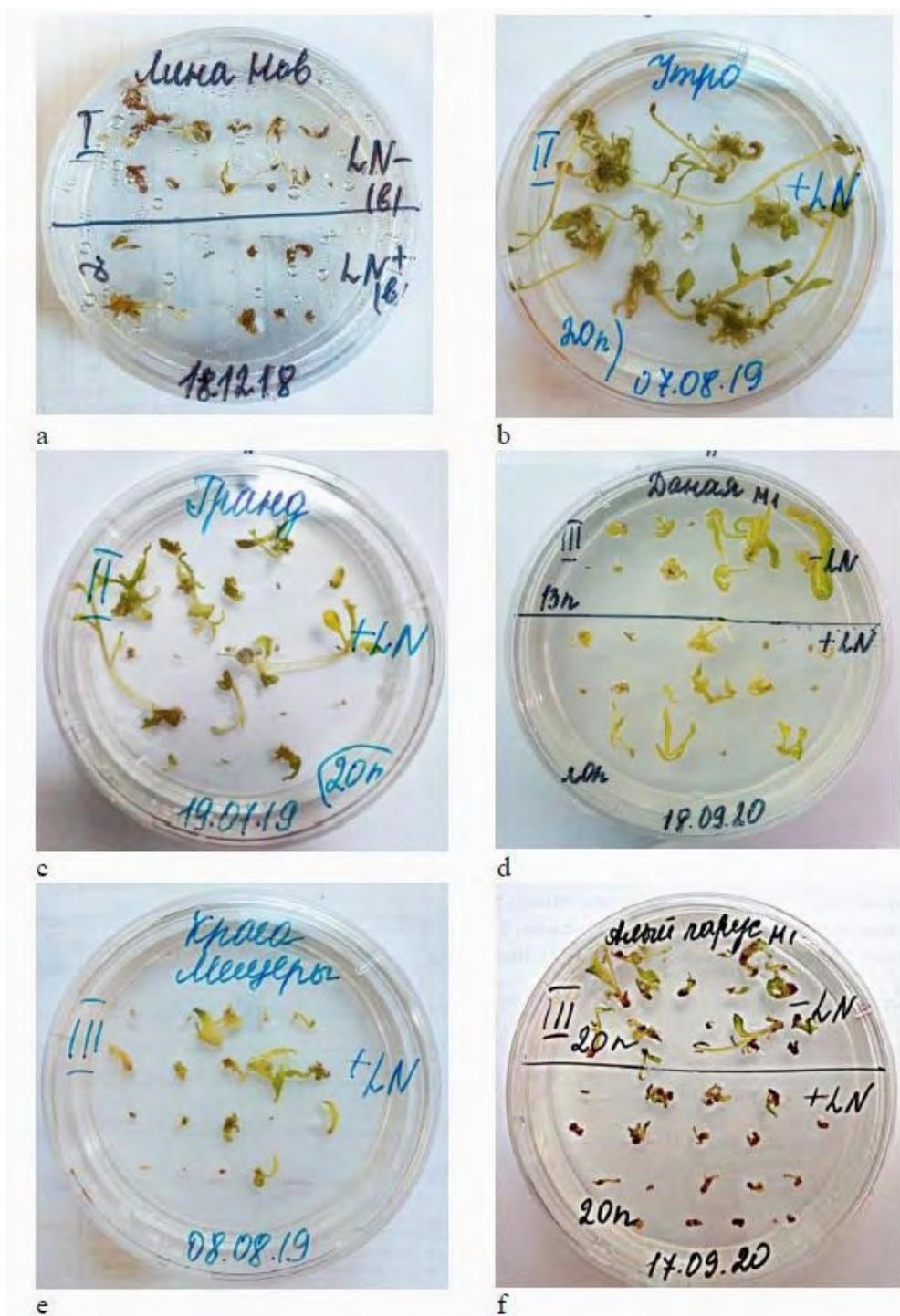


Рис. 1. Посткриогенная регенерация эксплантов после замораживания-оттаивания в контрольных экспериментах у шести образцов:
a- сорт 'Лина', и-0161537; *b-* 'Утро', и-0161530; *c-* 'Гранд', и-0161515;
d- 'Даная', и-0161648; *e-* 'Краса Мещеры', и-0161520; *f-* 'Алый парус', и-0161644.

Fig. 1. Post-cryogenic regeneration of isolated explants after freezing and thawing in control experiments in six potato accessions:
a- 'Lina', i-0161537; *b-* 'Utro', i-0161530; *c-* 'Grand', i-0161515;
d- 'Danaja', i-0161648; *e-* 'Krasa Meşery*', i-0161520; *f-* 'Alyj Parus', i-0161644.

Для пополнения криобанка СР (Перу), при закладке на криохранилище 120 эксплантов на образец рекомендован минимальный уровень посткриогенной регенерации не ниже 30%. При более низких контрольных показателях – от 20 до 30% – число закладываемых на хранение эксплантов должно быть увеличено (Vollmer et al., 2016, 2017). Ориентируясь на минимальные уровни посткриогенной регенерации, рекомендованные зарубежными коллегами, мы продолжим в дальнейшем осуществлять криоконсервацию пяти из 16 образцов, имеющих низкий уровень частоты посткриогенной регенерации (от 20 до 30%) (см. табл. 2), чтобы заложить на длительное хранение в криобанк большее число эксплантов.

Мониторинг посткриогенного восстановления образцов, длительно сохраняемых в криобанке ВИР. Как указывалось выше, после проведения трех независимых повторностей в криобанк ВИР закладывают на длительное хранение по 9 криопробирок каждого образца, в каждой – по 10 замороженных апексов микрорастений (итого – 90 эксплантов на образец с установленным в контрольных экспериментах уровнем посткриогенной регенерации) (см. табл. 1). Поэтому изъятие из криобан-

ка единичной криопробирки для проведения мониторинга посткриогенной регенерации не критично для сохранности образца. Четыре сорта из изученной выборки участвовали в программе по мониторингу регенерационной способности эксплантов, длительно (более полугодом) сохраняемых в криобанке ВИР (см. табл. 2; рис. 2).

У сортов ‘Гранд’, ‘Гусар’, ‘Сигнал’, ‘Утро’ после размораживания образцов из единичных криопробирок, которые хранились около семи месяцев в криобанке ВИР, было получено от 27 до 70% эксплантов с регенерантами. В среднем регенерационная способность после семи-месячного хранения составила 41,8%, что не отличается достоверно ($p=0,921$) от контроля ‘+LN’ после краткосрочного погружения (у этих сортов в среднем 40,9%). Отметим, что у сортов ‘Гусар’ и ‘Утро’ показатели частоты регенерации в контрольных экспериментах и в мониторинге были близки, у сорта ‘Сигнал’ частота регенерации в мониторинге была выше контрольных значений, тогда как у сорта ‘Гранд’ – ниже контроля (см. рис. 2, табл. 2), хотя различия были статистически недостоверны. При этом следует учитывать, что в мониторинге участвовало только 10 эксплантов на сорт (у сорта ‘Гранд’ – 11).

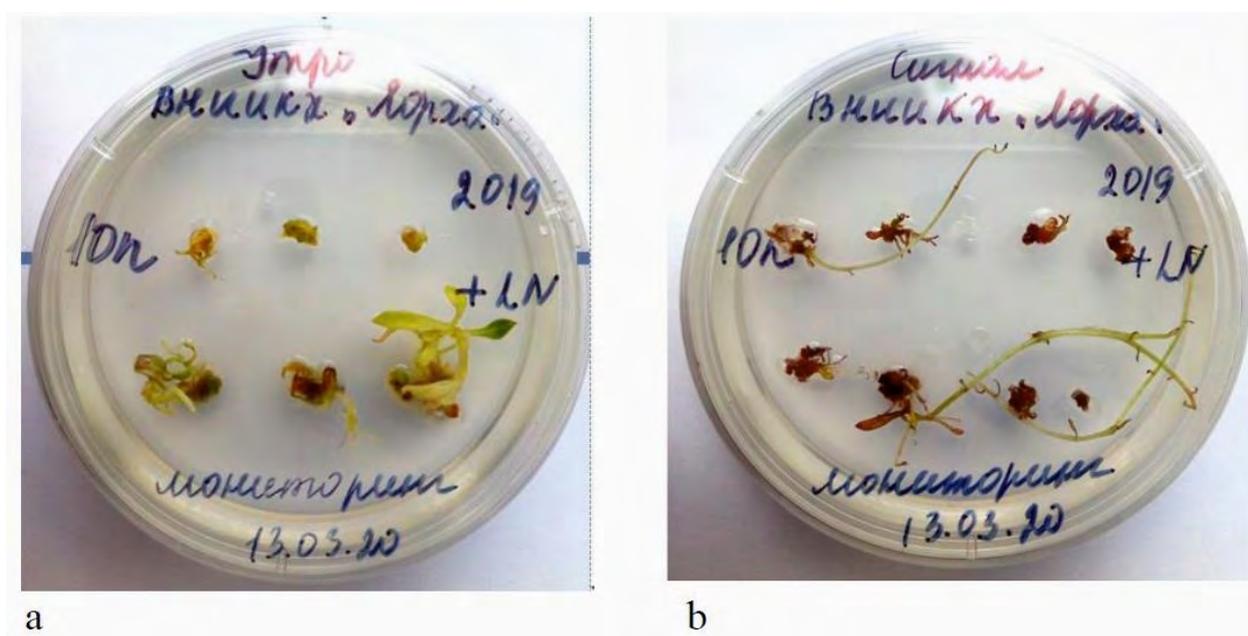


Рис. 2. Посткриогенная регенерация апексов микрорастений двух сортов картофеля после длительного (семь месяцев) хранения в криобанке ВИР: а- ‘Утро’, i-0161530 и б-‘Сигнал’.

Fig. 2. Post-cryogenic regeneration of apices of *in vitro* plants of two potato cultivars after long-term (seven months) preservation in the VIR cryobank: а- ‘Utro’, i-0161530 and б- ‘Signal’.

Заключение

В ВИР инициирована комплексная программа по созданию номенклатурных стандартов российских сортов картофеля, их молекулярно-генетической паспортизации и сохранению исходных образцов в живом виде – в *in vitro* коллекции и в криобанке института. В рамках этой программы проведена криоконсервация современных российских сортов картофеля, выведенных в семи различных селекцентрах, с использованием модифицированного в ВИР протокола дроблет-витрификации. У изученных в настоящей работе 16 образцов частота посткриогенной регенерации апексов микрорастений в контрольных экспериментах ('+LN') варьировала от 23,3 до 53,3%. У 11 из 16 образцов частота регенерации превышала 30% и у девяти из них была выше 40%. Пять образцов имели низкие показатели регенерационной способности от 20 до 30%. У всех четырех сортов, для которых был проведен мониторинг регенерационной способности апексов микрорастений после семимесячного хранения в криобанке ВИР, детектированы регенерировавшие экспланты. Можно заключить, что применение модифицированного метода дроблет-витрификации остается актуальным для пополнения криоколлекции картофеля ВИР.

Благодарности / Acknowledgments

Работа по криоконсервации выполнена в рамках государственного задания ЕГИСУ НИОКР: АААА-А19-119013090158-8, тема № 0662-2019-0004 «Коллекции ВИР вегетативно размножаемых культур и их диких родичей – изучение и рациональное использование». Авторы выражают благодарность: участникам Комплексного плана научных исследований (КПНИ) подпрограммы «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации» – сотрудникам селекционных центров (включая авторов сортов): ВНИИКС им. А.Г. Лорха, Ленинградского НИИСХ «Белогорка» и ООО Селекционной фирме «ЛиГа», сотрудникам СибНИИРС филиала ИЦиГ СО РАН, СибНИИСХиТ

филиала СФНЦА РАН, ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН, которые передали в 2018 и 2019 гг. свои сорта в ВИР для реализации задачи КПНИ «Создание национального криобанка картофеля с целью долгосрочного сохранения генофонда генотипированных отечественных сортов, ... и ваучеризации сортов....». Авторы благодарят д.с.-х.н., вед.н.с. ВИР Л.Ю. Новикову за помощь в проведении статистической обработки данных, и вед. специалиста ЦКП ВИР «Лаборатория оздоровления генофонда растений» Беспалову Е.С., которая принимала участие в криоконсервации сортов 'Златка' и 'Юна' / The cryoconservation was carried out within the framework of the State Assignment registered in the Unified State Information System for Accounting for Research and Development Work (USISA R&DW) under the State Number АААА-А19-119013090158-8, Topic No. 0662-2019-0004 "VIR collections of vegetatively propagated crops and their wild relatives, their study and rational use". The authors express their gratitude to participants of the Complex Plan for Scientific Research (CPSR) subprogram "Development of potato breeding and seed production in the Russian Federation" for 2018 and 2019, namely to employees of breeding centers (including authors of cultivars): A.G. Lorkh All-Russian Research Institute of Potato Farming; "Belogorka" Leningrad Agricultural Research Institute; "LiGa" Breeding LLC; Siberian Research Institute of Plant Industry and Breeding, a branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Tatar Agricultural Research Institute of the Kazan Research Center of the Russian Academy of Sciences, which provided VIR with their own varieties in 2018 and 2019 for the implementation of the CPSR task "Creation of a national cryobank of potatoes with the aim of long-term preservation of the gene pool of genotyped domestic varieties, ... and voucherization of varieties ...". The authors are grateful to L.Yu. Novikova, Dr.Agric.Sci., Leading Researcher at VIR, for her help with statistical data processing, and to E.S. Bespalova, Leading Researcher at the Center for Collective Use of VIR "Laboratory of Plant Germplasm Sanitation", who took part in the cryopreservation of cultivars 'Zlatka' and 'Una'.

References/Литература

- 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 Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2016;52(3):213-225. DOI: 10.1007/s11627-016-9753-x
- Brickell C.D., Alexander C., Cubey J.J., David J.C., Hoffman M.H.A., Leslie A.C., Malécot V., Xiaobai Jin (eds). International code of nomenclature for cultivated plants. Ed. 9. *Scripta Horticulturae*. 2016;18:1–XVII+1190.
- CIP. The genebank of the International Potato Center conserves potato and sweet potato diversity. Centro Internacional de la Papa. Available at <https://genebanks.org/genebanks/international-potato-center>. [accessed Jan. 22, 2018].
- Dunayeva S.Y., Pendinen G.I., Antonova O.Y., Shvachko N.A., Volkova N.N., Gavrilenko T.A. Preservation of vegetatively propagated crops in *in vitro* and cryo-collections: methodological guidelines. (Sokhraneniye vegetativno razmnzhayemykh kultur v *in vitro* i kriokollektsiyakh: metodicheskiye ukazaniya). T.A. Gavrilenko (ed.). St. Petersburg: VIR; 2011. [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: методические указания / под ред. Т.А. Гавриленко. Санкт-Петербург: ВИР; 2011).
- Dunayeva S.E., Pendinen G.I., Antonova O.Yu., Shvachko N.A., Ukhatoeva Yu.V., Shuvalova L.E., Volkova N.N., Gavrilenko T.A. Preservation of vegetatively propagated crops in *in vitro* and cryo collections: methodological guidelines (Sokhraneniye vegetativno razmnzhayemykh kultur v *in vitro* i kriokollektsiyakh: metodi-

- cheskiye ukazaniya). T.A. Gavrilenko (ed.). St. Petersburg: VIR, 2017. [in Russian] (Дунаева С.Е., Пендинен Г.И., Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Ухатова Ю.В., Шувалова Л.Е., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А. Сохранение вегетативно размножаемых культур в *in vitro* и крио коллекциях: методические указания / под ред. Т.А. Гавриленко. Санкт-Петербург: ВИР, 2017).
- Gavrilenko T., Dunayeva S., Truskinov E., Antonova O., Pendinen G., Lupysheva Y., Rogovaja V., Shvachko N. Strategy of long-term conservation of germplasm of vegetatively propagated crops under controlled conditions. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Plant Breeding*. 2007;164:273-285 [in Russian] (Гавриленко Т., Дунаева С., Трускинов Э., Антонова О., Пендинен Г., Лупышева Ю., Роговая В., Швачко Н. Стратегия долгосрочного сохранения генофонда вегетативно размножаемых сельскохозяйственных растений в контролируемых условиях среды. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2007;164:273-285).
- Gavrilenko T.A., Shvachko N.A., Volkova N.N., Ukhatova Yu.V. A modified droplet vitrification method for cryopreservation of shoot tips from *in vitro* potato plants. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(4):422-429. [in Russian] (Гавриленко Т.А., Швачко Н.А., Волкова Н.Н., Ухатова Ю.В. Модифицированный метод дроплет-витрификации для криоконсервации апексов *in vitro* растений картофеля. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(4):422-429. DOI: 10.18699/VJ19.505).
- Hirai D. Gelled droplet vitrification improves recovery of cryopreserved potato germplasm. *CryoLetters*. 2011;32(4):287-296.
- Jenderek M. M., Reed B.M. Cryopreserved storage of clonal germplasm in the USDA National Plant Germplasm System. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2017;53(4):299-308. DOI: 10.1007/s11627-017-9828-3
- IPGRI. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and applications. Engelmann F., Takagi H. (eds.). 2000.
- Keller E.R.J., Senula A., Grübe M., Diekmann K., Dehmer K.J. Fifteen years of cryopreservation in the IPK Genebank – experience, conclusions and outlook. *Acta Horticulturae*. 2014;1039:249-263. DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1039.32
- 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.
- Muthoni J., Shimelis H., Melis R. Long-term conservation of potato genetic resources: methods and status of conservation. *Australian Journal of Crop Science*. 2019;13(05):717-725. DOI: 10.21475/ajcs.19.13.05.p1400
- Niino T., Arizaga M.V. Cryopreservation for preservation of potato genetic resources. *Breeding Science*. 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 Science*. 2005;168:45-55. DOI: 10.1016/j.plantsci.2004.07.022
- Panis B., Van den Houwe I., Swennen R., Rhee J., Roux N. Securing plant genetic resources for perpetuity through cryopreservation. *Indian Journal of Plant Genetic Resources*. 2016;29(3):300-302. DOI: 10.5958/0976-1926.2016.00051.6
- 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 and Organ Culture*. 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: Proceedings of COST Action 871 Final meeting*. Angers, France, 2011; 135137.
- Stock J., Mock H.P., Senula A., Nagel M. *Arabidopsis* – a model to elucidate complex stress response mechanism during cryopreservation. *Acta Horticulturae*. 2019;1234:85-96. DOI: 10.17660/ActaHortic.2019.1234.11
- Ukhatova Y.V., Oves E.V., Volkova N.N., Gavrilenko T.A. Cryoconservation of potato breeding cultivars at VIR. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2017;178(3):13-20 [In Russian] (Ухатова Ю.В., Овэс Е.В., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А. Криоконсервация селекционных сортов картофеля в ВИРе. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2017;178(3):13-20). DOI: 10.30901/2227-8834-2017-3-13-20
- Ukhatova Y.V., Gavrilenko T.A. Cryoconservation methods for vegetatively propagated crops (review). *Plant Biotechnology and Breeding*. 2018;1(1):5263 [In Russian] (Ухатова Ю.В., Гавриленко Т.А. Методы криоконсервации вегетативно размножаемых культурных растений. *Биотехнология и селекция растений*. 2018;1(1):5263). DOI: 10.30901/26586266201815263
- 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.
- 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 Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2017;53(4):309-317. DOI: 10.1007/s11627-0179846-1