

МОБИЛИЗАЦИЯ И СОХРАНЕНИЕ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ

Научная статья
УДК 635.21:57.043
DOI: 10.30901/2227-8834-2023-3-9-20



Расширение криоколлекции образцов картофеля, сохраняемой в криобанке ВИР

О. С. Ефремова, Н. Н. Волкова, Д. А. Рыбаков, О. В. Лисицына, П. В. Озерский, Т. А. Гавриленко

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

Автор, ответственный за переписку: Татьяна Андреевна Гавриленко, tatjana9972@yandex.ru

Актуальность. В настоящей статье приведены результаты реализации комплексной программы, направленной на долгосрочное сохранение в криобанке Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР) генотипированных образцов отечественных сортов картофеля, генетически идентичных номенклатурным стандартам.

Материалы и методы. В качестве материала для исследования выбраны экспланты 24 образцов сортов картофеля, выведенных в различных селекционных центрах РФ, сохраняющиеся в коллекции *in vitro* ВИР. Эти сорта имеют молекулярно-генетические паспорта и соответствуют номенклатурным стандартам сортов, хранящихся в гербарии ВИР (WIR). Криоконсервацию проводили с использованием метода дроблет-витрификации, несколько этапов которого были модифицированы в отделе биотехнологии ВИР.

Результаты и обсуждение. Частота посткриогенной регенерации у проанализированных 24 сортов в контрольных вариантах с краткосрочным погружением эксплантов в жидкий азот варьировала от 20,0 до 47,3% и у 9 образцов превышала 39% – современный уровень надежного долгосрочного сохранения образцов в криобанках. Данные статистического анализа не выявили достоверного влияния генотипа, а также календарных сроков проведения опытов на частоту регенерационной способности образцов. В результате проведенных экспериментов криоколлекция картофеля, сохраняемая в криобанке ВИР, была пополнена 24 образцами российских сортов. В статье анализируется состав и структура криоколлекции картофеля ВИР, которая в настоящее время включает 140 образцов.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, криоконсервация, криосохранение, селекционные сорта, генетические ресурсы картофеля

Благодарности: работа выполнена в рамках Государственного задания ЕГИСУ НИОКР: № FGEM-2022-0004 «Совершенствование подходов и методов *ex situ* сохранения идентифицированного генофонда вегетативно размножаемых культур и их диких родичей, разработка технологий их эффективного использования в селекции». Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: Ефремова О.С., Волкова Н.Н., Рыбаков Д.А., Лисицына О.В., Озерский П.В., Гавриленко Т.А. Расширение криоколлекции образцов картофеля, сохраняемой в криобанке ВИР. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2023;184(3):9-20. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-3-9-20

MOBILIZATION AND CONSERVATION OF THE GENETIC DIVERSITY OF CULTIVATED PLANTS AND THEIR WILD RELATIVES

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2023-3-9-20

Development of the potato cryocollection preserved in the VIR cryobank

Olga S. Efremova, Natalia N. Volkova, Daniil A. Rybakov, Olga V. Lisitsyna, Pavel V. Ozerski, Tatjana A. Gavrilenko

N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

Corresponding author: Tatjana A. Gavrilenko, tatjana9972@yandex.ru

Background. The article presents the results of the studies carried out within the framework of a complex program for the long-term conservation of genotyped accessions of advanced potato cultivars in the cryobank of the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR). These accessions are genetically identical to the nomenclature standards of the corresponding cultivars.

Materials and methods. The research material included 24 accessions from the *in vitro* collection of VIR, corresponding to the nomenclature standards of Russian potato cultivars developed in different breeding centers of the Russian Federation. Cryopreservation was carried out using the droplet vitrification method, several stages of which were modified in the Department of Biotechnology of VIR.

Results and discussion. The frequency of post-cryogenic regeneration for the analyzed 24 cultivars in control variants with short-term immersion of explants in liquid nitrogen varied from 20 to 47.3%, and in 9 accessions it exceeded 39% – the current level of reliable long-term preservation of samples in cryobanks. The data of the statistical analysis failed to reveal a significant effect of the genotype or the calendar dates of different experiment replications on the regeneration ability. These 24 accessions were added to the potato cryocollection stored in the VIR cryobank. An analysis of the composition and structure of VIR's potato cryocollection, which currently includes 140 accessions, is presented.

Keywords: *Solanum tuberosum*, cryoconservation, cryopreservation, released cultivars, potato genetic resources

Acknowledgements: the research was performed within the framework of the state task according to the theme plan of VIR, Project No. FGEM-2022-0004 "Improving the approaches and methods for *ex situ* conservation of the identified genetic diversity of vegetatively propagated crops and their wild relatives, and development of technologies for their effective utilization in plant breeding".

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Efremova O.S., Volkova N.N., Rybakov D.A., Lisitsyna O.V., Ozerski P.V., Gavrilenko T.A. Development of the potato cryocollection preserved in the VIR cryobank. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2023;184(3):9-20. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-3-9-20

Список сокращений

CIP – International Potato Center, Peru (Международный центр картофеля, Перу);

IPGRI – International Plant Genetic Resources Institute (Международный институт генетических ресурсов растений);

IPK – Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Germany (Институт генетики растений и исследований сельскохозяйственных культур имени Лейбница, Германия);

NAC – National Agrobiodiversity Center, Republic of Korea (Национальный центр агробиоразнообразия, Республика Корея);

NARO – National Agriculture and Food Research Organization, Japan (Национальная организация сельскохозяйственных и продовольственных исследований, Япония);

USPG – U.S. Potato Genebank, USA (Генный банк картофеля США);

VÚB Havlíčkův Brod – Potato Research Institute Havlíčkův Brod, Czech Republic (Научно-исследовательский институт картофеля в Гавличкув-Броде, Чехия);

ВИР – Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Россия;

ГРП – генетические ресурсы растений.

Методы криоконсервации, питательные среды, растворы и варианты использования этих методов:

Dr – Droplet;

DV – Droplet-Vitrification;

EV – Encapsulation-Vitrification;

‘-LN’ – контрольный вариант – без погружения в жидкий азот;

‘+LN’ – контрольный вариант – краткосрочное погружение в жидкий азот на 1 час;

LS – Loading Solution (Panis et al., 2005);

MS – Питательная среда Мурасиге – Скуга (Murashige, Skoog, 1962);

MSTo – Питательная среда для посткриогенной регенерации (Towill, 1983);

PVS2 – Plant Vitrification Solution (Sakai et al., 1990);

RS – Rewarming Solution (Sakai, 1997).

Введение

Генетические ресурсы растений вегетативно размножаемых культур сохраняются *ex situ* в полевых коллекциях и в контролируемых условиях в дублетных коллекциях *in vitro* и криоколлекциях, а также *in situ*. Криоконсервация является наиболее эффективным подходом к долгосрочному хранению коллекций генетических ресурсов растений вегетативно размножаемых культур и минимизации рисков их потерь (Panis et al., 2020). В то же время в ведущих генбанках мира объем криоколлекций меньше объема коллекций *in vitro* и значительно меньше объема полевых коллекций, поскольку методы криоконсервации требуют наличия дорогостоящих инфраструктуры и оборудования, а также обученного персонала.

Картофель является наиболее важной вегетативно размножаемой культурой умеренного климата, генетические ресурсы которой сохраняются в полевых коллекциях, коллекциях *in vitro* и криоколлекциях. Долгосрочное хранение образцов картофеля обеспечивается на основе криоконсервации апексов растений *in vitro*, которые хранятся в криобанках при сверхнизкой температуре в жидком азоте (–196°C) или в парах жидкого азота (–140°C) (Engelmann, Takagi, 2000; Forsline et al., 1999; Dussert et al., 2003; Panis et al., 2016; <https://cipotato.org>; <https://www.genesys-pgr.org>). Крупнейшие криоколлекции картофеля сохраняются в генбанках: CIP, Перу (Vollmer et al., 2017, 2022; Muthoni et al., 2019); IPK, Германия (Stock et al., 2019; Muthoni et al., 2019); USPG, США (Bamberg et al., 2016; Muthoni et al., 2019); NAC – Ю. Корея (Niino, Arizaga, 2015); NARO, Япония (Nagel et al., 2022) (табл. 1).

Для криоконсервации образцов картофеля используют разные методы (см. табл. 1), но наиболее часто приме-

Таблица 1. Наиболее крупные криоколлекции картофеля, сохраняемые в генбанках разных стран, и используемые методы криоконсервации

Table 1. The largest potato cryocollections and methods of cryoconservation used in genebanks of different countries

Генбанк, страна / Genebank, country	Большая часть хранящихся в криобанке образцов представлена: / Most of the accessions stored in the cryobank are represented by:	Число образцов <i>in cryo</i> / Number of <i>in cryo</i> accessions	Метод / Method	Ссылка / Reference
CIP, Перу	андийскими аборигенными сортами, чилийскими сортами и гибридами	4100	DV	Vollmer et al., 2017, 2022; Muthoni, 2019; https://cipotato.org
IPK, Германия	селекционными сортами	1456	Dr	https://www.genesys-pgr.org ; Stock et al., 2019; Muthoni et al., 2019
NARO, Япония	сортами и гибридами	640	EV	Nagel et al., 2022
USPG, США	селекционными сортами	247	DV	Bamberg et al., 2016; Muthoni et al., 2019
NAC, Ю. Корея	селекционными сортами	130	DV	Niino, Arizaga, 2015; Muthoni et al., 2019
VÚB Havlíčkův Brod, Чехия	сортами и гибридами	100	no data	https://www.genesys-pgr.org

няют метод капель-витрификации (DV), разработанный ведущим специалистом по криобиологии растений Б. Панисом (Panis et al., 2005). Этот метод основан на двухступенчатой инкубации апексов растений *in vitro* в растворах LS и PVS2, содержащих смесь осмо- и криопротекторов, и последующем быстром погружении эксплантов в капли раствора PVS2, нанесенных на полоски фольги, в жидкий азот. В настоящее время в разных криобанках для криоконсервации образцов картофеля используют различные модификации DV-метода (Hirai, 2011; Niino, Arizaga, 2015; Köpnick et al., 2018; Ukhatova, Gavrilenko, 2018; Muthoni et al., 2019).

В состав криоколлекций картофеля входят образцы селекционных сортов, аборигенных южноамериканских сортов, а также гибридов. В наиболее крупном криобанке картофеля СР (Перу) хранится 4100 образцов (см. табл. 1), что составляет 84% от общего числа образцов, поддерживаемых в этом генбанке (Vollmer et al., 2022; Nagel et al., 2022). Из более чем 4000 образцов картофеля, сохраняемых в криобанке СР, 88,9% образцов представлены южноамериканскими аборигенными сортами, 3% – чилийскими аборигенными сортами, и 8,1% – селекционными сортами и гибридами (Vollmer et al., 2022; <https://cipotato.org>). Во втором по величине криобанке картофеля ИРК сохраняется около 1500 образцов (Muthoni et al., 2019; Stock et al., 2019; <https://www.genesys-pgr.org>), большая часть которых представлена старыми европейскими сортами (см. табл. 1).

В настоящее время суммарно в условиях *in cryo* в различных генбанках мира хранится лишь около 4% от общего числа образцов, сохраняемых в полевых коллекциях картофеля и *in vitro* (Köpnick et al., 2018). По данным перуанских коллег, стоимость криоконсервации одного образца составляет ~400 долларов США в год, тогда как стоимость его дальнейшего хранения в криобанке составляет ~7 долларов США в год. При этом чем больше криоколлекция, тем дешевле стоимость ее хранения, рассчитанная на один образец (Vollmer et al., 2022).

В начале 2000-х годов IPGRI рекомендовал считать надежным уровень посткриогенной регенерации эксплантов не менее 20%, который рассчитывается по данным трех повторностей по 30 эксплантов в каждой. Суммарно в криобанк на длительное хранение закладываются 90 эксплантов на образец, размещенных в 9 криопробирках, что дает возможность проводить мониторинг жизнеспособности эксплантов в процессе длительного хранения (Engelmann, Takagi, 2000). Частота посткриогенной регенерации определяется в контрольных экспериментах с кратковременным погружением эксплантов в жидкий азот ('+LN'), проводимых в трехкратной повторности. Позднее S. Dussert et al. (2003) показали, что вероятность получения как минимум одного регенеранта из каждой криопробирки составит 0,95 при уровне посткриогенной регенерации образца не менее 39%.

В настоящее время в ведущих криобанках мира именно этот уровень посткриогенной регенерации считают достаточным для надежного долгосрочного хранения образцов. При более низких значениях этого показателя число закладываемых на хранение эксплантов должно быть увеличено (Vollmer et al., 2016, 2017).

В ВИР работы по криоконсервации апексов растений картофеля *in vitro* были инициированы в 2012 г. (Shvachko, 2012) с использованием Dr-метода, а с 2014 г. начались исследования по модификации и оптимизации DV-метода (Dunaeva et al., 2017; Ukhatova, 2017; Ukhatova,

Gavrilenko, 2018; Gavrilenko et al., 2019). С 2016 г. проводится плановая закладка образцов на длительное хранение в криобанк ВИР. Принятыми на длительное хранение считаются образцы, содержащие не менее 90 эксплантов (три повторности, в каждой по 30 апексов растений *in vitro*). Подробный регламент закладки эксплантов на длительное хранение в криобанк ВИР приведен в статье О. С. Ефремовой с коллегами (Efremova et al., 2020).

Поначалу основное внимание при создании криоколлекции картофеля в ВИР уделялось наиболее ценным образцам коллекции *in vitro* ВИР – генотипированным и фенотипированным по многим признакам образцам культурных видов (Gavrilenko et al., 2010, 2013). В последнее время криоколлекция картофеля активно пополняется генотипированными образцами отечественных сортов, генетически идентичными номенклатурным стандартам (Efremova et al., 2020). Данная стратегия была разработана в ВИР (Gavrilenko, Chukhina, 2020) и реализуется в сотрудничестве с авторами сортов – селекционерами из различных регионов РФ (Fomina et al., 2020; Klimenko et al., 2020; Rybakov et al., 2022).

Задачи настоящей работы состояли в продолжении этих исследований – криоконсервации новых образцов российских сортов, генетически идентичных номенклатурным стандартам, и изучении их посткриогенной регенерации, а также в проведении инвентаризации криоколлекции картофеля, заложенной на длительное хранение в криобанк ВИР.

Материалы и методы

Материал для исследований включал образцы 24 сортов картофеля, которые были выведены в следующих селекционных центрах: ЛенНИИСХ «Белогорка» и ООО Селекционной фирме «ЛиГа», Татарском НИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН и в Омском АНЦ. Согласно комплексной стратегии регистрации и сохранения идентифицированного сортового генофонда, разработанной в ВИР (Gavrilenko, Chukhina, 2020), эти образцы были введены в культуру *in vitro* из растительного материала, переданного авторами сортов в гербарий ВИР для создания номенклатурных стандартов и разработки их генетических паспортов (Klimenko et al., 2020; Fomina et al., 2020; Rybakov et al., 2022).

Методы. Криоконсервацию проводили в 2021–2022 гг. с использованием метода DV (Panis et al., 2005), некоторые этапы которого были модифицированы в отделе биотехнологии ВИР (Dunaeva et al., 2017; Gavrilenko et al., 2019) так же, как и регламент закладки эксплантов на длительное хранение в криобанк ВИР (Efremova et al., 2020). На рисунке 1 приведена общая схема криоконсервации образцов апексов картофеля в ВИР, включающая их оценку по регенерационной способности перед закладкой на криохранение в двух вариантах контрольных экспериментов: (а) без погружения эксплантов в жидкий азот ('-LN') – для проверки качества приготовленных растворов и сред; (б) с погружением эксплантов на один час в жидкий азот ('+LN') – для суммарной оценки влияния обработки растворами криопротекторов и процедур замораживания/оттаивания на посткриогенную регенерацию.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы PAST (версия 4.11) (Hammer et al., 2001). Средние значения и значения ошибок для показателей регенерационной

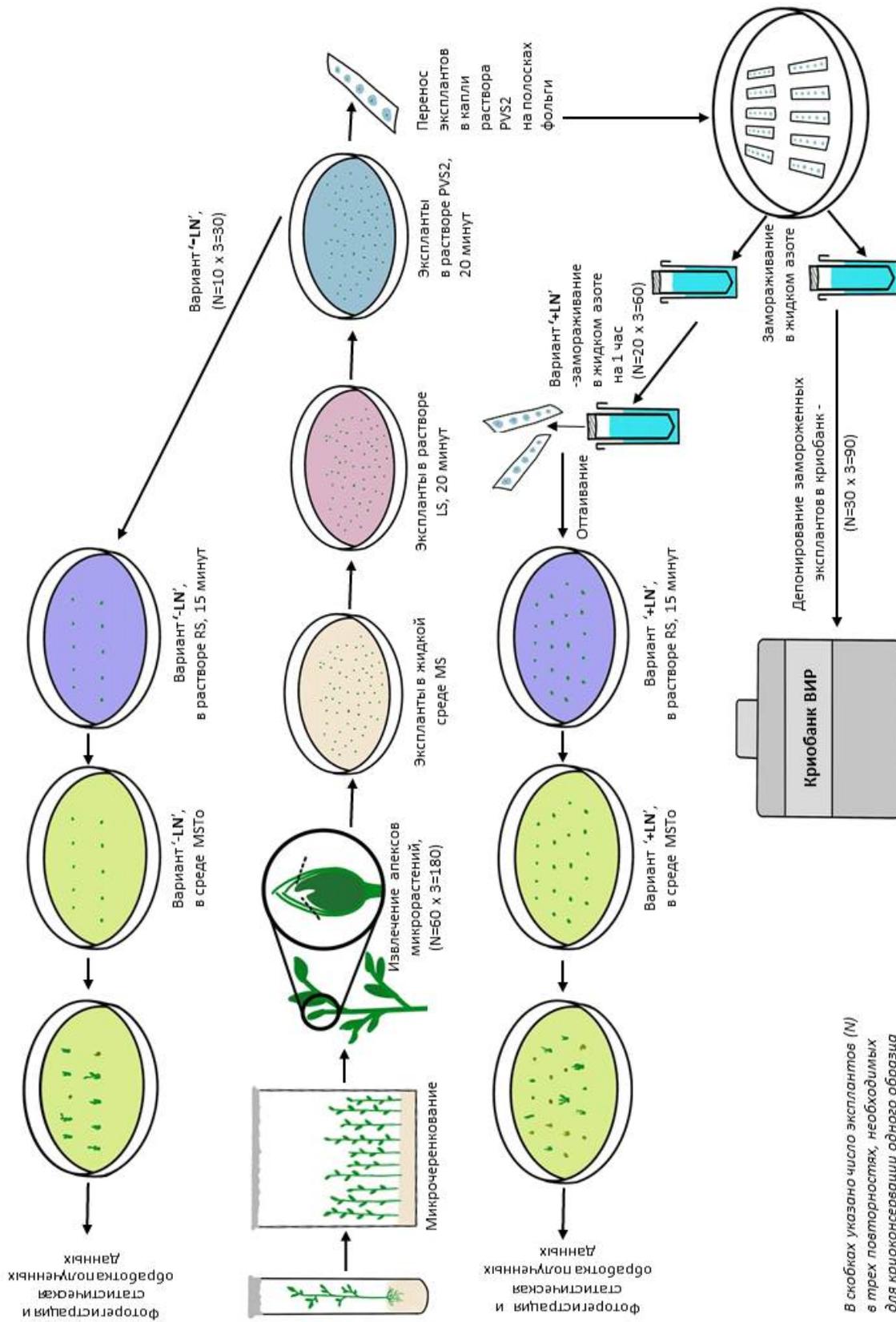


Рис. 1. Схема криоконсервации апексов микрорастений картофеля при помощи модифицированного метода дроблет-витрификации (Dunaeva et al., 2017; Gavrilenko et al., 2019); приведено число эксплантов (N) для криоконсервации одного коллекционного образца (Dunaeva et al., 2017; Gavrilenko et al., 2019); the number of explants (N) is indicated for cryoconservation of one accession

способности образцов рассчитывались в программе LibreOffice CALC (версия 7.2.3).

Различия между двумя вариантами экспериментов ('-LN' и '+LN') оценивали с использованием U-критерия Манна – Уитни (Kobzar, 2006). Достоверность различий по показателям регенерационной способности эксплантов разных сортов (влияние генотипа) оценивали с использованием критерия Краскела – Уоллиса (Kobzar, 2006). Поскольку у ряда образцов первые повторности опытов по криоконсервации были выполнены в зимний период, а последняя повторность – в весенний период, мы провели оценку влияния на уровень регенерации сортов разных сроков проведения опытов с использованием критерия Краскела – Уоллиса. Для этого результаты оценки регенерационной способности сортов были сгруппированы по календарным срокам проведения разных повторностей с интервалом в 10 дней.

Результаты и обсуждение

1. Изучение способности к посткриогенному восстановлению 24 образцов сортов картофеля

В таблице 2 и на рисунке 2 представлены результаты экспериментов по криоконсервации апексов микро-растений 24 образцов сортов картофеля. Как и ожидалось, различия по регенерационной способности образцов между вариантами '-LN' (без погружения эксплантов в жидкий азот) и '+LN' (с краткосрочным погружением в жидкий азот на 1 час) были статистически значимыми, что подтверждено с использованием U-критерия Манна – Уитни ($z = 4,60$; $p < 0,001$).

В контрольных экспериментах с краткосрочным погружением в жидкий азот на 1 час ('+LN') у всех сортов зафиксирована способность к посткриогенному восстановлению. Показатели регенерационной способности образцов в этом варианте опытов варьировали от 20,0 до 47,3% (см. табл. 2). Таким образом, у всех 24 образцов сортов частота посткриогенной регенерации превышала 20%, при этом у девяти образцов уровень регенерационной способности был выше 39% ('Сударыня', 'Чароит', 'Триумф', 'Сказка', 'Сальса', 'Вдохновение', 'Весна Белая', 'Майский Цветок', 'Вечерний Омск') (см. табл. 2).

У ряда образцов сортов было выявлено варьирование значений регенерационной способности между повторностями опыта (см. табл. 2), поэтому мы оценили влияние календарных сроков проведения разных повторностей опытов на уровень этого показателя для всех 24 образцов выборки. Результаты статистического анализа, проведенного с помощью критерия Краскела – Уоллиса, не выявили достоверного влияния календарных сроков проведения опытов на регенерационную способность эксплантов как в варианте '-LN' ($H = 18,38$; $H_{\text{коррект}} = 18,46$; $p = 0,49$), так и в варианте '+LN' ($H = 17,23$; $H_{\text{коррект}} = 17,46$; $p = 0,62$).

Следующая задача состояла в изучении влияния генотипа на показатели регенерационной способности образцов. Согласно результатам статистического анализа, выполненного с помощью критерия Краскела – Уоллиса, в анализируемой выборке 24 сортов не обнаружено достоверного влияния генотипа на показатели регенерационной способности в варианте '-LN' ($H = 24,04$; $H_{\text{коррект}} = 24,15$; $p = 0,40$) и в варианте '+LN' ($H = 27,00$; $H_{\text{коррект}} = 27,37$; $p = 0,24$), что согласуется с нашими предыдущими исследованиями (Efremova et al., 2020).

Таблица 2. Регенерационная способность апексов микро-растений сортов картофеля после замораживания/оттаивания

Table 2. Regeneration ability of *in vitro* shoot tips of potato cultivars after freezing/thawing

Сорт / Cultivar	№ интродукции / Introduction No.	№ по каталогу ВИР / VIR catalogue No.	Регенерационная способность* / Regeneration ability (%)	
			'-LN'	'+LN'
Сорта селекции Ленинградского НИИСХ «Белогорка» – филиала ФГБНУ «ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха» и ООО Селекционной фирмы «ЛиГа»:				
Вдохновение	o161645	12192p	49,7 ± 18,8	40,0 ± 2,6
Весна Белая	o161646	11895p	43,3 ± 3,7	40,0 ± 2,9
Жемчужина	o161650	-	36,0 ± 12,5	32,3 ± 8,7
Калибр	633317	25519p	46,3 ± 1,9	30,7 ± 2,3
Майский Цветок	o161653	-	48,3 ± 10,9	40,3 ± 2,6
Наяда	o161654	12157p	59,0 ± 16,7	24,7 ± 5,2
Невский	o161655	10736p	44,7 ± 11,3	35,0 ± 2,9

Таблица 2. Окончание

Table 2. The end

Сорт / Cultivar	№ интродукции / Introduction No.	№ по каталогу ВИР / VIR catalogue No.	Регенерационная способность* / Regeneration ability (%)	
			'-LN'	'+LN'
Сорта селекции Ленинградского НИИСХ «Белогорка» – филиала ФГБНУ «ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха» и ООО Селекционной фирмы «ЛиГа»:				
Очарование	o161656	12214p	58,0 ± 4,9	33,3 ± 6,7
Памяти Осиповой	o161657	12105p	45,0 ± 2,9	38,3 ± 1,7
Русская Красавица	o161659	25142p	30,3 ± 5,5	35,0 ± 0
Сказка	o161662	11987p	67,7 ± 16,2	46,7 ± 8,3
Снегирь	o161663	11984p	41,7 ± 15,9	39,3 ± 5,8
Сударыня	o161664	12206p	28,0 ± 6,4	41,3 ± 10,4
Холмогорский	o161665	12111p	51,7 ± 20,5	34,7 ± 10,5
Чародей	o161666	11908p	66,0 ± 17,3	32,3 ± 4,3
Чароит	o161667	25221p	57,3 ± 11,6	46,7 ± 1,7
Сорта селекции Татарского НИИСХ ФИЦ КазНИЦ РАН:				
Зумба	633211	25511p	51,7 ± 13,0	25,0 ± 5,8
Регги	633213	25313p	48,7 ± 11,0	37,3 ± 3,9
Сальса	633215	25512p	50,0 ± 16,2	47,3 ± 11,1
Сорта селекции Омского АНЦ:				
Алена	638065	12145p	63,3 ± 8,8	33,3 ± 3,3
Былина Сибири	638066	-	50,7 ± 4,7	20,0 ± 0
Вечерний Омск	638067	-	61,0 ± 11,0	40,0 ± 7,6
Триумф	638068	-	34,3 ± 4,7	41,7 ± 4,4
Хозяюшка	638069	24755p	70,0 ± 17,3	35,0 ± 2,9

Примечание: * Mean ± Se – среднее с доверительным интервалом (± стандартная ошибка) варианта опыта

Note: * Mean ± Se is the mean with a confidence interval (± standard error) of the experiment replication

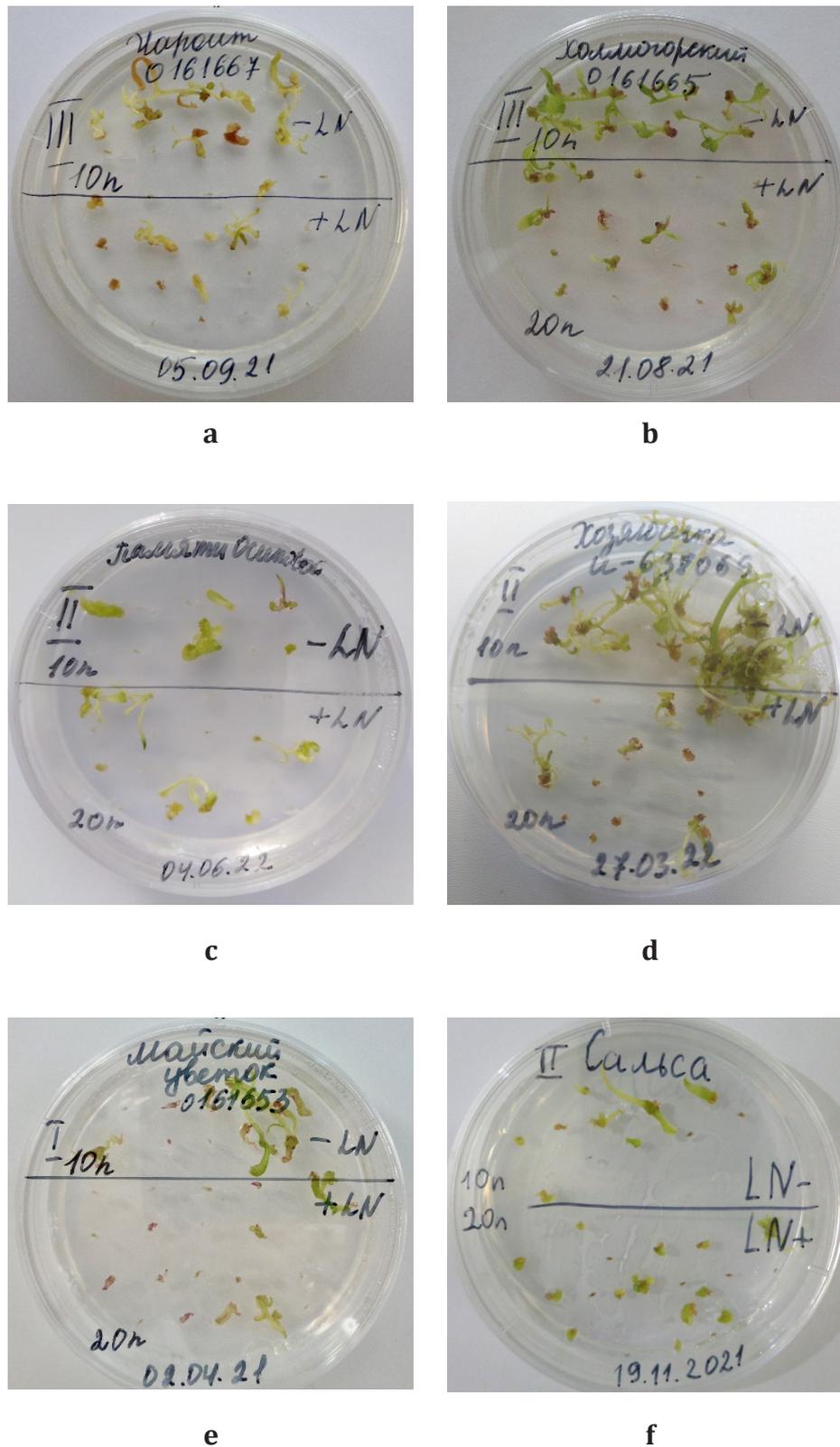


Рис. 2. Посткриогенная регенерация эксплантов после замораживания/оттаивания в контрольных экспериментах у шести сортов:
a – ‘Чароит’ (i-o161667); **b** – ‘Холмогорский’ (i-o161665); **c** – ‘Памяти Осиповой’ (i-o161657);
d – ‘Хозяюшка’ (i-638069); **e** – ‘Майский Цветок’ (i-o161653); **f** – ‘Сальса’ (i-633215)
Fig. 2. Post-cryogenic regeneration of isolated explants after freezing/thawing in control experiments for six potato cultivars:
a – ‘Charoit’ (i-o161667); **b** – ‘Kholmogorsky’ (i-o161665); **c** – ‘Pamyati Osipovoy’ (i-o161657);
d – ‘Khozyayushka’ (i-638069); **e** – ‘Maysky Tsvetok’ (i-o161653); **f** – ‘Salsa’ (i-633215)

В ряде других работ авторы выявили существенное влияние генотипа на посткриогенную регенерацию после оттаивания (Kaczmarczyk et al., 2010; Panta et al., 2006; Ukhatova, 2017; Gavrilenko et al., 2019).

Не исключено, что различия между образцами, наблюдаемые в ряде работ, а также между разными повторностями опытов, могут быть связаны с различиями в размерах вычлененных апексов, что было показано в недавней работе R. Vollmer et al. (2022). В дальнейшем мы также планируем учитывать данный показатель в наших исследованиях.

2. Инвентаризации криоколлекции картофеля ВИР

Следующая задача состояла в инвентаризации криоколлекции картофеля, сохраняемой в криобанке ВИР. При проведении инвентаризации учитывались образцы, для которых были выполнены все три повторности контрольных экспериментов ('+LN') с соблюдением регламента закладки в криобанк – 90 эксплантов на образец. Инвентаризация показала, что на настоящий момент эта криоколлекция картофеля включает 140 образцов,

из них: 68 селекционных сортов (56 отечественных и 12 зарубежных), 65 образцов шести южноамериканских культурных видов, а также единичные гибридные клоны и клоны образцов нескольких диких видов. Состав и структура криоколлекции картофеля ВИР представлены на диаграмме (рис. 3) и в Приложении (Supplementary Materials, Table)¹.

Из 56 отечественных сортов, сохраняемых в Криобанке ВИР, 46 сортов генетически идентичны номенклатурным стандартам, из них: 3 сорта селекции Татарского НИИСХ, 19 сортов селекции ЛенНИИСХ «Белогорка» и ООО Селекционной фирмы «ЛиГа», 14 сортов – ФГБНУ «ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха» и 10 сортов, выведенных в различных сибирских институтах (см. Приложение). В коллекции *in vitro* ВИР поддерживается еще 25 образцов российских сортов картофеля, генетически идентичных номенклатурным стандартам; в дальнейшем мы планируем заложить все эти образцы на долгосрочное хранение в криобанк ВИР.

Большая часть образцов (74,2%) в криоколлекции обладает уровнем регенерации выше 39%, что соответствует современным стандартам криобанков (рис. 4; см.

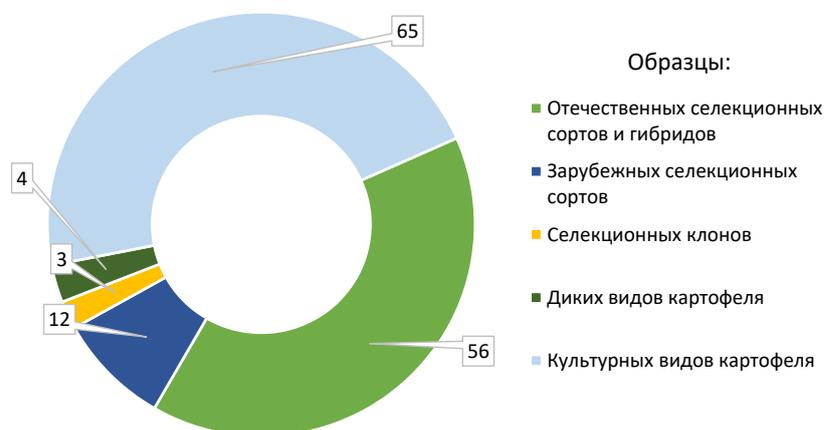


Рис. 3. Структура и состав криоколлекции ВИР (N = 140)

Fig. 3. Structure and composition of the VIR cryocollection (N = 140)

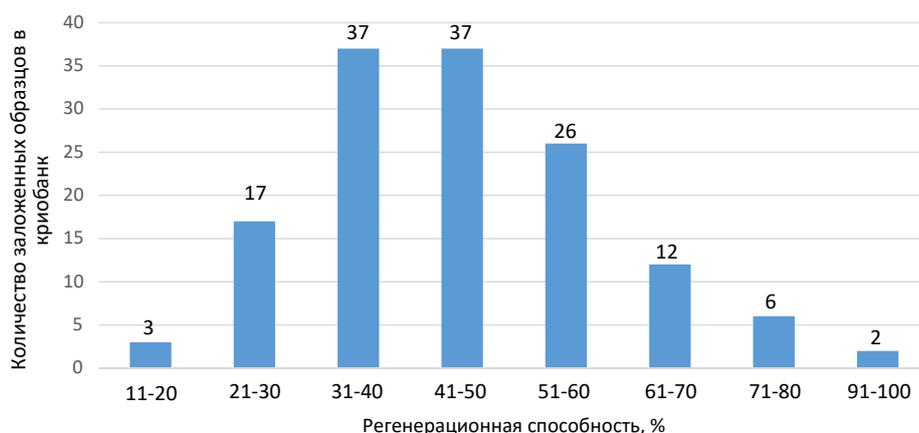


Рис. 4. Уровень посткриогенной регенерации образцов картофеля, сохраняемых в криоколлекции ВИР (N = 140); приведены средние значения в контрольных вариантах опытов '+LN'

Fig. 4. Post-cryogenic regeneration rate of potato accessions preserved in the VIR cryobank (N = 140); mean values for the control experiments '+LN' are given

¹ Приложение, таблица, представлено в онлайн-формате. Электронная версия статьи: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2023-3-9-20>
Electronic supplementary material. The online version of this article: <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2023-3-9-20>.

Приложение). В группу с повышенным уровнем регенерации преимущественно входили образцы южноамериканских культурных видов картофеля (см. Приложение).

Для единичных образцов, заложенных в криобанк с уровнем посткриогенной регенерации ниже 20%, планируются дополнительные эксперименты по криоконсервации для закладки в криобанк большего числа эксплантов.

Заключение

Проведена криоконсервация 24 генотипированных образцов российских сортов из коллекции *in vitro* ВИР. Показатели посткриогенной регенерации этих образцов варьировали от 20,0 до 47,3%, и у девяти образцов уровень регенерационной способности был выше 39%. Результаты статистического анализа изученной выборки из 24 сортов не выявили достоверного влияния генотипа и календарных сроков проведения экспериментов на регенерационную способность эксплантов.

В результате проведенных экспериментов криоколлекция картофеля, сохраняемая в криобанке ВИР, пополнилась 24 генотипированными образцами российских сортов. Проведена инвентаризация криоколлекции картофеля ВИР, которая в настоящее время включает 140 образцов, заложенных на хранение в трех повторностях по 30 апексов микрорастений в каждой. В настоящее время в состав криоколлекции входят 46 образцов российских сортов, генетически идентичных номенклатурным стандартам.

References / Литература

Bamberg J.B., Martin M.W., Abad J., Jenderek M.M., Tanner J.D., Donnelly D. et al. *In vitro* technology at the US Potato Genebank. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2016;52(3):213-225. DOI: 10.1007/s11627-016-9753-x

CIP Genebank: [website]. Available from: <https://cipotato.org> [accessed Sept. 20, 2022].

Dunaeva S.E., Pendinen G.I., Antonova O.Yu., Shvachko N.A., Ukhatova Yu.V., Shuvalova L.E., Volkova N.N., Gavrilenko T.A. Preservation of vegetatively propagated crops *in vitro* and cryo collections: methodological guidelines (Sokhraneniye vegetativno razmnzhayemykh kultur v in-vitro- i kriokollekttsiyakh: metodicheskiye ukazaniya). T.A. Gavrilenko (ed.). 2nd 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 криоколлекциях: методические указания / под ред. Т.А. Гавриленко. 2-е изд. Санкт-Петербург: ВИР; 2017).

Dussert S., Engelmann F., Noirot M. Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. *CryoLetters*. 2003;24(3):149-160.

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 Russian] (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

Engelmann F., Takagi H. (eds). Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and applica-

tion. Tsukuba: JIRCAS; Roma: IPGRI; 2000. Available from: https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/2021-08/010023387.pdf [accessed Sept. 12, 2022].

Fomina N.A., Antonova O.Yu., Chukhina I.G., Gimaeva E.A., Stashevski Z., Gavrilenko T.A. Nomenclatural standards and genetic passports of potato cultivars bred by the Tatar Research Institute of Agriculture "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences". *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(3):55-67. [in Russian] (Фомина Н.А., Антонова О.Ю., Чухина И.Г., Гимаева Е.А., Сташевски З., Гавриленко Т.А. Номенклатурные стандарты и генетические паспорта сортов картофеля селекции Татарского НИИСХ «Казанский научный центр РАН». *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(3):55-67). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-3-04

Forsline P.L., McFerson J.R., Lamboy W.F., Towill L.E. Development of base and active collections of *Malus* germplasm with cryopreserved dormant buds. *Acta Horticulturae*. 1999;484:75-78. DOI: 10.17660/ActaHortic.1998.484.8

Gavrilenko T., Antonova O., Ovchinnikova A., Novikova L., Krylova E., Mironenko N. et al. A microsatellite and morphological assessment of the Russian National Potato Collection. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2010;57(8):1151-1164. DOI: 10.1007/s10722-010-9554-8

Gavrilenko T., Antonova O., Shuvalova A., Krylova E., Alpatyeva N., Spooner D.M. et al. Genetic diversity and origin of cultivated potatoes based on plastid microsatellite polymorphism. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2013;60(7):1997-2015. DOI: 10.1007/s10722-013-9968-1

Gavrilenko T.A., Chukhina I.G. Nomenclatural standards of modern Russian potato cultivars preserved at the VIR herbarium (WIR): A new approach to cultivar gene-pool registration in a genebank. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(3):6-17. [in Russian] (Гавриленко Т.А., Чухина И.Г. Номенклатурные стандарты современных российских сортов картофеля, хранящиеся в гербарии ВИР (WIR): новые подходы к регистрации сортового генофонда в генбанках. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(3):6-17). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-3-02

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 дроблет-витрификации для криоконсервации апексов *in vitro* растений картофеля. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(4):422-429). DOI: 10.18699/VJ19.505

Genesys PGR: [website]. Available from: <https://www.genesys-pgr.org> [accessed Sept. 20, 2022].

Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: paleontological statistics software. Package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001;4(1):4. Available from: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf [accessed Sept. 06, 2022].

Hirai D. Gelled droplet vitrification improves recovery of cryopreserved potato germplasm. *CryoLetters*. 2011;32(4):287-296.

Kaczmarczyk A., Rokka V.M., Keller E.R.J. Potato shoot tip cryopreservation. A review. *Potato Research*. 2010;54(1):45-79. DOI: 10.1007/s11540-010-9169-7

Klimenko N.S., Gavrilenko T.A., Chukhina I.G., Gadzhiev N.M., Evdokimova Z.Z., Lebedeva V.A. Nomenclatural standards and genetic passports of potato cultivars bred at the Leningrad Research Institute for Agriculture "Belogorka".

- Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(3):18-54. [in Russian] [Клименко Н.С., Гавриленко Т.А., Чухина И.Г., Гаджиев Н.М., Евдокимова З.З., Лебедева В.А. Номенклатурные стандарты и генетические паспорта сортов картофеля, выведенные селекционерами Ленинградского НИИСХ «Белогорка». *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(3):18-54]. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-3-03
- Kobzar A.I. Applied mathematical statistics (Prikladnaya matematicheskaya statistika). Moscow: Fizmatlit; 2006. [in Russian] [Кобзарь А.И. Прикладная математическая статистика. Москва: Физматлит, 2006].
- Körnig C., Grube M., Stock J., Senula A., Mock H.P., Nagel M. Changes of soluble sugars and ATP content during DMSO droplet freezing and PVS3 droplet vitrification of potato shoot tips. *Cryobiology*. 2018;85:79-86. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2018.09.005
- Murashige T., Skoog F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- 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(5):717-725. DOI: 10.21475/ajcs.19.13.05.p1400
- Nagel M., Dulloo M.E., Bissessur P., Gavrilenko T., Bamberg J., Ellis D., Giovannini P. A global strategy for the conservation of potato. Bonn: Global Crop Diversity Trust; 2022. DOI: 10.5447/ipk/2022/29
- 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., Nagel M., Van den Houwe I. Challenges and prospects for the conservation of crop genetic resources in field genebanks, in *in vitro* collections and/or in liquid nitrogen. *Plants*. 2020;9(12):1634. DOI: 10.3390/plants9121634
- Panis B., Piette V., Swennen R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Science*. 2005;168(1):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., Ynoue C., Criel B., Swennen R., Roca W. 78. Improvement of potato cryopreservation for the long-term conservation of Andean landraces at the International Potato Center (CIP). *Cryobiology*. 2006;53(3):401. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.908.45
- Rybakov D.A., Cheremisina A.I., Antonova O.Yu., Chukhina I.G., Gavrilenko T.A. Nomenclatural standards and genetic passports of potato cultivars bred by the Omsk Agrarian Research Center. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2022;5(4):6-23. [in Russian] [Рыбаков Д.А., Черемисина А.И., Антонова О.Ю., Чухина И.Г., Гавриленко Т.А. Номенклатурные стандарты и генетические паспорта сортов картофеля селекции Омского Аграрного научного центра. *Биотехнология и селекция растений*. 2022;5(4):6-23]. DOI: 10.30901/2658-6266-2022-4-04
- Sakai A. Potentially valuable cryogenic procedures for cryopreservation of cultured plant meristems. In: M.K. Razdan, E.C. Cocking (eds). *Conservation of Plant Genetic Resources in Vitro. Volume 1: General Aspects*. Enfield, NC: Science Publishers Inc.; 1997. p.53-66.
- Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*. 1990;9(1):30-33. DOI: 10.1007/bf00232130
- Shvachko N.A. Genetic diversity of potato cultivars in the VIR collection identified by the SSR analysis (Geneticheskoye raznoobraziye selektsionnykh sortov kartofelya kollektzii VIR, vyuyavlennoye SSR analizom) [dissertation]. St. Petersburg: VIR; 2012. [in Russian] [Швачко Н.А. Генетическое разнообразие селекционных сортов картофеля коллекции ВИР, выявленное SSR анализом: дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург: ВИР; 2012]. URL: http://vir.nw.ru/biot/pdf/autoreferat_shvachko_2012.pdf [дата обращения: 05.09.2022].
- 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
- Towill L.E. Improved survival after cryogenic exposure of shoot tips derived from *in vitro* plantlet cultures of potato. *Cryobiology*. 1983;20(5):567-573. DOI: 10.1016/0011-2240(83)90045-7
- Ukhatova Yu.V. Improving the methods of cryopreservation and recovery from viral diseases of vegetatively propagated crop accessions (Sovershenstvovaniye metodov kriokonservatsii i ozdorovleniya ot virusnykh bolezney obraztsov vegetativno razmnnozhayemykh kultur) [dissertation]. St. Petersburg: VIR; 2017. [in Russian] [Ухатова Ю.В. Совершенствование методов криоконсервации и оздоровления от вирусных болезней образцов вегетативно размножаемых культур: дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург: ВИР; 2017]. URL: http://vir.nw.ru/desert/yhatova/diss_ukhatova.pdf [дата обращения: 06.09.2022].
- Ukhatova Yu.V., Gavrilenko T.A. Cryoconservation methods for vegetatively propagated crops. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2018;1(1):52-63. [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
- VIR Databases: [website]. [in Russian] [Базы данных ВИР: [сайт]]. URL: <http://db.vir.nw.ru/virdb/maindb> [дата обращения: 20.09.2022].
- Vollmer R., Villagaray R., Cárdenas J., Castro M., Chávez O., Anglin N.L. et al. 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
- Vollmer R., Villagaray R., Castro M., Cárdenas J., Pineda S., Espirilla J. et al. The world's largest potato cryobank at the International Potato Center (CIP) – Status quo, protocol improvement through large-scale experiments and long-term viability monitoring. *Frontiers in Plant Science*. 2022;13:1059817. DOI: 10.3389/fpls.2022.1059817
- Vollmer R., Villagaray R., Egusquiza V., Espirilla J., García M., Torres A. et al. 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.

Информация об авторах

Ольга Сергеевна Ефремова, кандидат сельскохозяйственных наук, научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, efremo.olga2010@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9212-2117>

Наталья Николаевна Волкова, ведущий специалист, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, nata.volckova@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8034-9891>

Даниил Александрович Рыбаков, младший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, da-rybakov@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1520-0219>

Ольга Владимировна Лисицына, ведущий специалист, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, olgalis86@ya.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6632-3465>

Павел Викторович Озерский, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, ozerski@list.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7627-5412>

Татьяна Андреевна Гавриленко, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующая отделом, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, tatjana9972@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2605-6569>

Information about the authors

Olga S. Efremova, Cand. Sci. (Agriculture), Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, efremo.olga2010@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9212-2117>

Natalia N. Volkova, Leading Specialist, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, nata.volckova@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8034-9891>

Daniil A. Rybakov, Associate Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, da-rybakov@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1520-0219>

Olga V. Lisitsyna, Leading Specialist, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, olgalis86@ya.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6632-3465>

Pavel V. Ozerski, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, ozerski@list.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7627-5412>

Tatjana A. Gavrilenko, Dr. Sci. (Biology), Chief Researcher, Head of a Department, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, tatjana9972@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2605-6569>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 30.12.2022; одобрена после рецензирования 25.04.2023; принята к публикации 04.09.2023. The article was submitted on 30.12.2022; approved after reviewing on 25.04.2023; accepted for publication on 04.09.2023.