

## Модифицированный метод капель-витрификации для криоконсервации апексов *in vitro* растений картофеля

Т.А. Гавриленко<sup>1, 2</sup>✉, Н.А. Швачко<sup>1</sup>, Н.Н. Волкова<sup>1</sup>, Ю.В. Ухатова<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия

✉ e-mail: tatjana9972@yandex.ru

Коллекции возделываемого картофеля *Solanum tuberosum*, сохраняемые в полевых генбанках, несут значительные потери из-за воздействия экстремальных факторов внешней среды, заболеваний и вредителей. Практическое решение проблемы надежного хранения генофонда возделываемого картофеля состоит в создании дублирных криоколлекций, сохраняемых при сверхнизких температурах в криобанках. Известно несколько методов криоконсервации картофеля, из них в настоящее время в мировых генбанках наиболее широко используется метод капель-витрификации, разработанный Б. Панисом с коллегами в 2005 г. В нашей статье представлено подробное описание модифицированного метода капель-витрификации, который применяется для криоконсервации апексов *in vitro* растений картофеля во Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР). Модифицированный в ВИР метод включает основные этапы оригинального метода капель-витрификации, разработанного Б. Панисом с коллегами: 1) подготовка растительного материала; 2) изоляция апексов микрорастений; 3) обработка эксплантов растворами с криопротекторами; 4) криоконсервация/погружение в жидкий азот; 5) оттаивание; 6) посткриогенное восстановление и учет регенерационной способности. Предложенные нами модификации этапов 1, 2 и 6 позволяют существенно сократить продолжительность экспериментов по криоконсервации в сравнении с оригинальным методом. В работе представлены результаты экспериментов по криоконсервации аборигенных южноамериканских сортов и современных селекционных сортов картофеля, которые были выполнены с использованием модифицированного в ВИР метода капель-витрификации. Большая часть (76.7 %) изученных образцов культурного картофеля характеризовалась высокими показателями посткриогенной регенерации (40–95 %), и у 23.3 % изученных образцов частота регенерации после замораживания–оттаивания варьировала от 20 до 39 %, что соответствует предельно допустимым минимальным значениям для закладки на длительное хранение в криобанк. В настоящее время модифицированный метод капель-витрификации используется для расширения криоколлекции культурных видов картофеля в ВИР.

Ключевые слова: картофель; криоконсервация; капель-витрификация; криобанк.

**Для цитирования:** Гавриленко Т.А., Швачко Н.А., Волкова Н.Н., Ухатова Ю.В. Модифицированный метод капель-витрификации для криоконсервации апексов *in vitro* растений картофеля. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(4):422-429. DOI 10.18699/VJ19.505

## A modified droplet vitrification method for cryopreservation of shoot tips from *in vitro* potato plants

T.A. Gavrilenko<sup>1, 2</sup>✉, N.A. Shvachko<sup>1</sup>, N.N. Volkova<sup>1</sup>, Yu.V. Ukhatova<sup>1</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> Saint Petersburg State University, Biological Faculty, St. Petersburg, Russia

✉ e-mail: tatjana9972@yandex.ru

Collections of common potato maintained in the field genebanks suffer significant losses due to the impact of extreme environmental factors, diseases and pests. The solution of the problem of safe long-term preservation of common potato accessions is to create doublet *in vitro* and *cryo*-collections. Cryogenic collections are stored at ultra-low temperatures in cryobanks. Several methods of potato cryoconservation are known, of which the droplet vitrification method developed by B. Panis with colleagues in 2005 is the most widely used in genebanks. This paper provides a detailed description of the modified method of droplet vitrification, which is used for cryopreservation of apices (shoot tips) of potato *in vitro* plants at the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR). The method modified at VIR includes the main steps of the original droplet-vitrification method developed by B. Panis and colleagues: 1) preparation of plant material, 2) isolation of shoot tips, 3) treatment of explants with cryoprotector solutions, 4) freezing/immersion in liquid nitrogen, 5) thawing, 6) post-cryogenic recovery and evaluation of viability and regeneration capacity. The modifications of stages 1, 2 and 6 proposed at VIR lead to a significant reduction in the duration of cryopreservation experiments in comparison with the original method of B. Panis. This paper presents the results of cryopreservation of modern potato cultivars and South American landraces which were obtained using the method of droplet vitrification as modified at VIR. The majority (76.7 %) of

the studied accessions of cultivated potato were characterized by high rates of postcryogenic recovery (40–95 %) and 23.3 % of the samples had the values of postcryogenic regeneration from 20 to 39 %, which corresponds to the minimal permissible values for long-term storage in a cryobank. Currently the modified droplet-vitrification method is used for further expanding of the VIR potato cryocollection.

Key words: potato; cryopreservation; droplet-vitrification; cryobank.

**For citation:** 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. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(4):422-429. DOI 10.18699/VJ19.505 (in Russian)

## Введение

Коллекции возделываемого картофеля *Solanum tuberosum*, сохраняемые в полевых генбанках, несут значительные потери из-за воздействия экстремальных факторов внешней среды, заболеваний и вредителей. Практическое решение проблемы надежного хранения генофонда возделываемого картофеля состоит в формировании дублетных *in vitro* коллекций и создании на их основе криоколлекций, которые долгосрочно сохраняют в криобанках при сверхнизких температурах (Keller et al., 2006; Гавриленко и др., 2007; Engelman, 2014; Niino, Valle Arizaga, 2015; Panis et al., 2016; Vollmer et al., 2016).

В настоящее время разработаны международные стандарты генбанков для длительного хранения семян в условиях низких температур (FAO, 2014), согласно которым сохраняется и коллекция образцов семян в ВИР (Филипенко, 2007). Что касается стандартов хранения криоколлекций образцов вегетативно размножаемых культур, в частности картофеля, то до последнего времени они находятся на стадии активного обсуждения (Kaczmarczyk et al., 2011; Niino, Valle Arizaga, 2015; Vollmer et al., 2016, 2017; Ухатова, Гавриленко, 2018). Данная ситуация связана с тем, что ни один из способов криоконсервации не является унифицированным для определенного растительного объекта. Например, в мировой практике для криоконсервации апексов *in vitro* растений возделываемого картофеля *S. tuberosum* используют методы быстрого замораживания: дроплет-замораживания (Kaczmarczyk et al., 2011), витрификации (Kushnarenko et al., 2017), дроплет-витрификации (Kim et al., 2006; Bamberg et al., 2016; Vollmer et al., 2017). Перечисленные методы различаются техникой исполнения отдельных этапов и составом растворов с криопротекторами (Ухатова, Гавриленко, 2018). Так, при использовании метода витрификации экспланты обрабатывают раствором с криопротектором (чаще всего – PVS2) непосредственно в криопробирке, а в варианте метода дроплет-замораживания экспланты погружают в капли жидкой среды MS с криопротектором (10 % раствор DMSO), нанесенные на полоски фольги. Метод дроплет-витрификации сочетает особенности двух предыдущих методов: экспланты помещают в капли с раствором криопротектора (чаще всего – PVS2), нанесенные на полоски фольги.

В настоящее время для криоконсервации картофеля широко используется метод дроплет-витрификации, как наиболее воспроизводимый и простой в исполнении. Изначально метод был разработан Б. Панисом с коллегами для криоконсервации образцов банана (Panis et al., 2005). В дальнейшем оригинальный протокол Б. Паниса был многократно модифицирован для различных рас-

тительных объектов, в том числе картофеля (Kim et al., 2006; Bamberg et al., 2016; Vollmer et al., 2017) (Приложение 1)<sup>1</sup>. В ВИР криоконсервация апексов микрорастений картофеля с использованием метода дроплет-витрификации была начата в 2010 г., при этом протокол Б. Паниса также был существенно модифицирован (Дунаева и др., 2011; Shvachko, Gavrilenko, 2011; Ухатова и др., 2017). В Приложении 1 приведены четыре модификации оригинального метода дроплет-витрификации Б. Паниса (Panis et al., 2005), которые сегодня используют для криоконсервации образцов картофеля в ведущих мировых генбанках: CIP (Перу); USPG (США); NAC, NAAS, RDA (Южная Корея); ВИР (РФ) (протокол ИРК, Германия не приводится, поскольку в этом генбанке до сих пор используется дроплет-метод). Все модификации включают шесть общих этапов: 1) подготовка растительного материала; 2) изоляция апексов микрорастений; 3) обработка эксплантов раствором PVS2 с криопротекторами; 4) криоконсервация/погружение в жидкий азот полосок фольги с каплями раствора PVS2, в которых находятся экспланты; 5) оттаивание; 6) посткриогенное восстановление и учет регенерационной способности (см. Прил. 1 и рисунок). Сравнение оригинального и четырех модифицированных методов дроплет-витрификации позволяет заключить, что фактически каждая модификация отличается по продолжительности отдельных этапов, составу культуральных сред и условиям культивирования. По сравнению с оригинальным методом Б. Паниса предложенные в ВИР модификации этапов 1, 2 и 6 позволили существенно сократить продолжительность всего цикла криоконсервации (см. Прил. 1).

В данной статье приведено подробное описание модифицированного в ВИР метода дроплет-витрификации, а также представлены результаты его использования для криоконсервации апексов *in vitro* растений 43 образцов трех культурных видов картофеля.

## Материал исследования

В качестве материала исследования использованы 44 образца из *in vitro* коллекции ВИР, включая 43 образца культурного картофеля и один образец дикого вида *S. spegazzinii* (см. таблицу). Образцы культурного картофеля были представлены: 5 образцами тетраплоидных андийских аборигенных сортов – *S. tuberosum* ssp. *andigenum*; 7 образцами чилийских аборигенных сортов – *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*; 20 образцами андийских диплоидных культурных видов – *S. phureja* (8 образцов) и *S. stenotomum* (12 образцов); 10 селекционными сортами возделываемо-

<sup>1</sup> Приложения 1 и 2 см. по адресу:  
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2019-23/appx7.pdf>

го картофеля *S. tuberosum* и одним селекционным клоном NZ-32. Все образцы ранее были детально охарактеризованы по числу хромосом, генотипированы с использованием SSR-маркеров и маркеров разных типов цитоплазм (Gavrilenko et al., 2010; Antonova et al., 2017).

## Методы

### Питательные среды и растворы для криоконсервации

**Безгормональная среда Мурасиге и Скуга (MS)** твердая: макроэлементы, микроэлементы, витамины (Murashige, Skoog, 1962), сахара 30 г/л, агар 7 г/л, pH 5.8. После приготовления среду автоклавируют.

Безгормональная среда MS жидкая: макросоли, микро-соли, витамины (Murashige, Skoog, 1962), сахара 30 г/л, pH 5.8. Среду необходимо проавтоклавируют.

**Раствор LS** (Loading solution): осмо- и криопротектор на основе MS с добавлением сахара 136.8 г/л, глицерола 184 г/л, pH 5.8. Приготовленную среду не автоклавируют и хранят в морозильнике при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Перед применением необходимое количество среды стерилизуют через стерильный мембранный фильтр (диаметр пор 0.45 мкм) (Panis et al., 2005).

**Раствор PVS2** (Plant Vitrification Solution – витрифицирующий раствор): макросоли, микро-соли, витамины и глицин по MS (Murashige, Skoog, 1962), сахара 136.8 г/л (0.4 M), глицерол 300 г/л, этиленгликоль 150 г/л, DMSO 150 г/л, pH 5.8. Среда не подлежит автоклавированию и стерилизуется с помощью стерильных мембранных фильтров с размером пор 0.45 мкм (Sakai et al., 1990). Хранится в морозильнике при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Раствор RS** (среда для размораживания): жидкая среда MS с добавлением 410.4 г/л сахара, pH в пределах 5.6–5.8. Среду можно автоклавируют.

**Среда MSTo** для посткриогенной регенерации: макросоли, микро-соли, витамины по MS, сахара 20 г/л, агар 7 г/л, зеатин рибозид 0.5 мг/л, ИУК 0.5 мг/л, ГК 0.2 мг/л (фитогормоны добавляют после автоклавирования), pH 5.8 (Towill, 1983). Для стерилизации безгормональную среду MS автоклавируют. Раствор фитогормонов стерилизуют через стерильный мембранный фильтр (размер пор 0.22 мкм) и добавляют в охлажденную до  $50^{\circ}\text{C}$  среду MS.

### Модифицированный в ВИР метод дроппет-витрификации для криоконсервации апексов *in vitro* растений картофеля

**Первый этап – подготовка микрорастений.** Основная задача первого этапа – микроразмножение и получение достаточного количества апексов для проведения трех повторностей эксперимента. С этой целью используют одноузловые микрочеренки *in vitro* растений картофеля, которые высаживают по 15–20 штук в стеклянные сосуды объемом 0.5 л, заполненные 45–50 мл питательной агаризованной среды MS без гормонов с 30 г/л сахара на 3–4 недели (см. рисунок, а). Культивирование проводят на светоустановке с освещенностью 3–4 клк при  $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$  с 16-часовым фотопериодом.

**Второй этап – изоляция эксплантов.** Направлен на получение достаточного числа эксплантов для криоконсер-

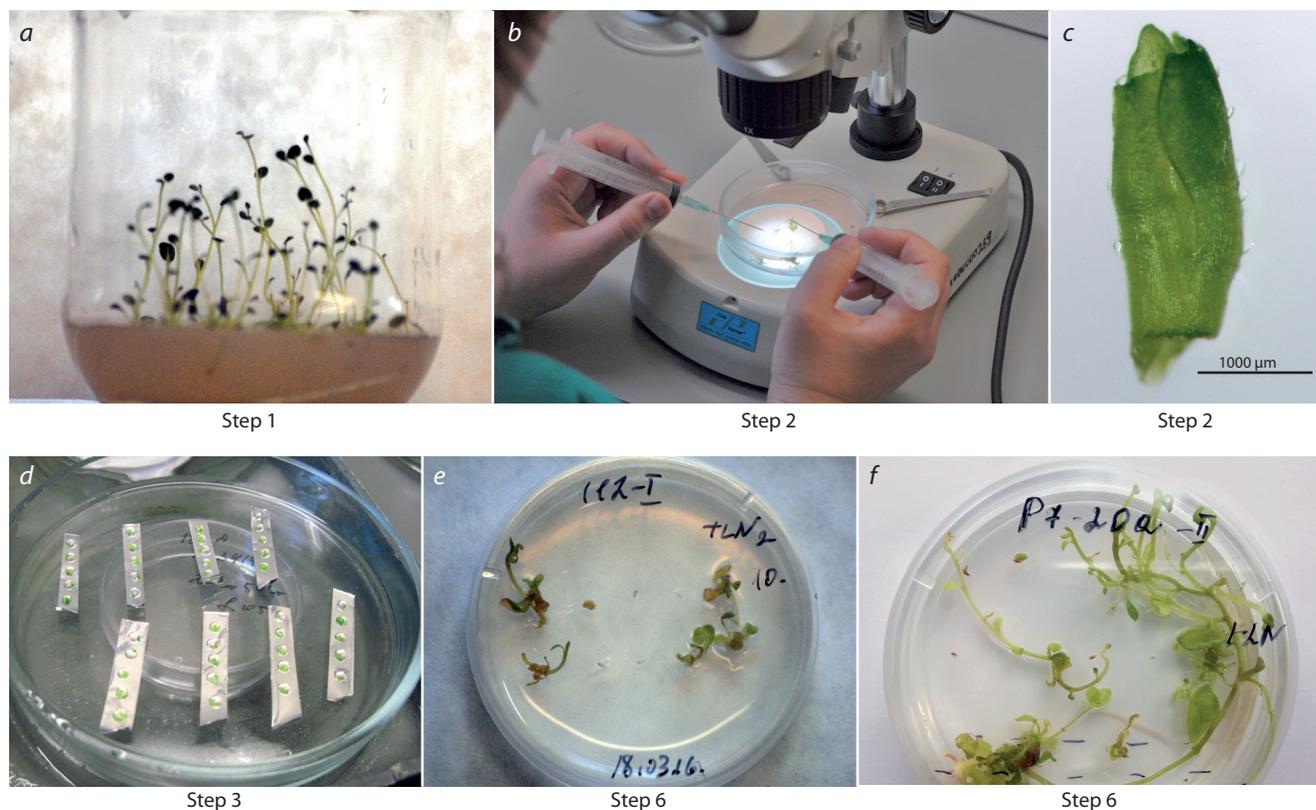
вации. В качестве эксплантов используют апексы побегов микрорастений. Для изоляции апексов выбирают хорошо развитые микрорастения картофеля. Все работы на данном этапе проводят со стереомикроскопом и со стерильными медицинскими иглами, надетыми на два одноразовых шприца – по одному для каждой руки.левой рукой оператор прижимает часть микропобега (микрочеренок), а правой рукой отсекает листья и стебель, оставляя апекс неповрежденным (см. рисунок, б, в). Верхушечные почки микрорастений размером 1.8–2.5 мм помещают в жидкую среду MS на время изоляции остальных эксплантов.

Отдельно остановимся на числе эксплантов, необходимым для надежного криохранения образца. Для каждого образца криоконсервация выполняется в трех независимых повторностях. В каждой повторности опыта изолируют 60 эксплантов: 10 из них используют в качестве контроля для проверки влияния питательных сред, осмо- и криопротекторов на жизнеспособность эксплантов (без обработки жидким азотом); 20 – погружают в жидкий азот на 1 ч для учета регенерационной способности после оттаивания; 30 эксплантов (без оттаивания) передают на длительное криохранение в биокриокомплекс ВИР. Согласно литературным данным, одного часа экспозиции эксплантов в жидком азоте достаточно для адекватной оценки эффективности посткриогенной регенерации (Panis et al., 2005; Kim et al., 2006; Yoon et al., 2006; Kaczmarczyk et al., 2011; Bamberg et al., 2016).

**Третий этап – обработка эксплантов криопротектором,** проводят для осмо- и криопротекции эксплантов. На этом этапе применяют двухступенчатую инкубацию изолированных эксплантов: сразу после изоляции апексы в чашке Петри помещают на 20 мин при комнатной температуре в раствор LS, после чего их переносят на 30 мин на лед в заранее охлажденный раствор PVS2. Растворы LS и PVS2 содержат смесь осмо- и криопротекторов (LS – сахара и глицерола, PVS2 – сахара, глицерола, этиленгликоля и DMSO).

**Четвертый этап – замораживание эксплантов в жидком азоте,** заключается в непосредственном воздействии жидкого азота на апексы побегов. Перед погружением в жидкий азот подготавливают полоски алюминиевой фольги размером  $25 \times 5$  мм. Стерильным наконечником наносят по 5 капель среды PVS2 на каждую полоску. Переносят по одному апексу в каждую каплю (см. рисунок, г). Затем полоски фольги с эксплантами погружают в криопробирку, заполненные жидким азотом (по 2 полоски на пробирку), плотно их закрывают и опускают в переносной сосуд Дьюара с жидким азотом. Криопробирку перед началом эксперимента маркируют, обозначив название сорта, номер в каталоге ВИР и год закладки на длительное криохранение. Сосуд Дьюара с маркированными криопробирками, содержащими апексы побегов, передают в биокриокомплекс на длительное криохранение. Для оценки частоты посткриогенной регенерации образцов достаточно погрузить криопробирку в жидкий азот на один час. Одного часа экспозиции в жидком азоте достаточно для адекватной оценки эффективности регенерации (Panis et al., 2005; Kaczmarczyk et al., 2011).

**Пятый этап – оттаивание.** Этот этап необходим для оценки частоты посткриогенной регенерации образцов.



Stages of cryopreservation of potato accessions by the droplet vitrification method modified at VIR:

(a) *In vitro* micropropagation of plants (step 1); (b) Isolation of shoot tips of *in vitro* of plants; (c) An isolated explant (step 2); (d) Incubation of the explants in drops of the PVS2 cryoprotectant solution immediately before immersion into liquid nitrogen (step 3); (e) Post-cryogenic regeneration of a sample of *S. stenotomum*, k-11053 (112) on the 6th week of cultivation after freezing–thawing; (f) Post-cryogenic regeneration of a sample of *S. phureja* k-99 (P7-20a) on the 8th week after freezing–thawing (step 6).

Полоски фольги с эксплантами извлекают пинцетом из жидкого азота и быстро погружают их в раствор RS на 15 мин. Затем экспланты переносят в чашки Петри со средой MSTo.

**Шестой этап – изучение способности образцов к посткриогенному восстановлению (оценка частоты посткриогенной регенерации).** Чашки Петри с эксплантами на среде MSTo помещают на светоустановку с освещенностью 3–4 клк, температурой 20–25 °C и 16-часовым фотопериодом. Эффективность восстановления после криоконсервации для каждого образца оценивают на 8-й неделе беспересадочного культивирования по показателям: 1) жизнеспособности эксплантов (число, % зеленых почек на питательной среде MSTo; параллельно учитывают и процентное содержание некротизировавшихся эксплантов) и 2) регенерационной способности (число, % эксплантов, сформировавших микропобеги) (см. рисунок, e). Эти показатели вносят в таблицу рекомендуемого образца (Прил. 2), вычисляя средние значения по трем независимым повторностям опыта с подсчетом ошибки среднего. Статистическую обработку данных проводят с использованием методов описательной статистики. Влияние фактора «генотип» оценивали методом однофакторного анализа.

Минимальные значения частоты посткриогенной регенерации образца, передаваемого на длительное хранение

в криобанк, четко не регламентированы; этот вопрос, с подробным анализом подходов к расчетам значений данного показателя в зависимости от числа сохраняемых эксплантов, подробно обсуждается в обзоре (Ухатова, Гавриленко, 2018). Ранее международные организации, занимающиеся вопросами сохранения биоразнообразия, рекомендовали включать в криоколлекции образцы, частота посткриогенной регенерации которых составляет не менее 20 % (IPGRI, 2000). В настоящее время в отдельных генбанках принят более жесткий регламент: для закладки образца в криобанк рекомендуется минимально допустимая частота посткриогенной регенерации эксплантов не ниже 39 % (Panis et al., 2016).

В ВИР криоколлекция картофеля формируется согласно следующим требованиям: для определения частоты посткриогенной регенерации каждого образца необходимо проведение трех независимых повторностей криоконсервации. В соответствии с полученными результатами посткриогенного восстановления образцы дифференцируются на три группы: А) образцы с высокой частотой посткриогенной регенерации – выше 40 %; Б) образцы со средними показателями частоты регенерации – от 21 до 39 %; В) образцы с низкой регенерационной способностью – ниже 20 %. Образцы из первых двух групп (А и Б) считаются надежно сохраняемыми в криобанке, образцы из группы В требуют индивидуального подхода –

либо увеличения числа повторностей, либо дальнейшей модификации метода капель-витрификации (Ухатова, Гавриленко, 2018).

#### Пошаговый протокол

1. Одноузловые микрочеренки *in vitro* растений картофеля высадить по 15–20 штук в стеклянные сосуды объемом 0.5 л, заполненные 45–50 мл питательной агаризованной среды MS без гормонов с 30 г/л сахарозы, и культивировать в течение 3–4 недель при  $22 \pm 2$  °C, фотопериоде 16/8 (см. рисунок, а).
2. В ламинаре с использованием стереомикроскопа для каждой повторности изолировать стерильными иглами, закрепленными на шприцах, 60 апексов микро-растений картофеля размером 1.8–2.5 мм (см. рисунок, б, в).
3. Изолированные апексы поместить в стерильную одноразовую пластиковую чашку Петри (диаметром 6 см) с 5 мл жидкой среды MS до окончания изоляции всех остальных эксплантов.
4. Дозатором со стерильным наконечником объемом 1 мл или стерильной пипеткой Пастера объемом 2–3 мл удалить жидкую среду MS из чашки Петри. Следить за тем, чтобы апексы не попали внутрь наконечника. Наконечник сменить.
5. Дозатором со стерильным наконечником объемом 1 мл или стерильной пипеткой Пастера объемом 2–3 мл добавить в чашку Петри 5–10 мл раствора LS так, чтобы все апексы были им полностью покрыты. Оставить в ламинаре на 20 мин при комнатной температуре.
6. Дозатором со стерильным наконечником объемом 1 мл или стерильной пипеткой Пастера объемом 2–3 мл удалить раствор LS из чашки Петри. Следить за тем, чтобы апексы не попали внутрь наконечника. Наконечник сменить.
7. Дозатором со стерильным наконечником объемом 1 мл или стерильной пипеткой Пастера объемом 2–3 мл внести в чашку Петри 5–10 мл заранее охлажденного раствора PVS2 так, чтобы все апексы были им полностью покрыты. Оставить чашку Петри с апексами в ламинаре на 30 мин на хладоэлементе.
8. Спустя 20 мин инкубации апексов в растворе PVS2 начать подготовку полосок алюминиевой фольги: в стеклянную чашку Петри диаметром 10 см пинцетом поместить 10 полосок стерильной фольги.
9. Дозатором со стерильным наконечником объемом 10 мкл или диспенсером нанести на каждую полосу по 5 капель раствора PVS2 объемом 2.5 мкл каждая.
10. Глазным пинцетом переместить по одному апексу из пластиковой чашки Петри в каждую каплю на полоске фольги. Десять апексов оставить в исходной чашке Петри (см. рисунок, з).
11. Провести маркировку пяти криопробирок, указав название и номер каталога образца, а также год проведения криоконсервации.
12. Поставить в ламинар пенопластовый штатив для криопробирок.
13. Налить в штатив жидкий азот.
14. Открытые маркированные криопробирки по одной ставить в штатив, заполненный жидким азотом; крышки складывать в пустую стеклянную чашку Петри.
15. Все криопробирки полностью залить жидким азотом.
16. После 30-минутной инкубации в растворе PVS2 полоски фольги с апексами быстро погрузить по одной в каждую криопробирку, долить жидкий азот до краев и поместить в каждую криопробирку вторую полосу фольги с апексами.
17. Криопробирки закрыть, перенести их из штатива в заполненный жидким азотом сосуд Дьюара и поставить в морозильник на один час.
18. Поставить в ламинар стерильную одноразовую пластиковую чашку Петри (диаметром 6 см).
19. Налить в чашку Петри 15–25 мл раствора RS при помощи стерильной пипетки Пастера объемом 3–5 мл.
20. Апексы, оставленные в исходной чашке Петри с раствором PVS2, глазным пинцетом перенести в чашку Петри с раствором RS и оставить на 15 мин при комнатной температуре (вариант контроля «–LN»).
21. Через 15 мин контрольные апексы извлечь пинцетом из раствора RS и поместить их в чашку Петри со средой MSTo для посткриогенного восстановления.
22. Чашку Петри закрыть парафилмом, подписать название образца, номер повторности опыта, дату и слово «контроль» или «–LN», обозначая отсутствие этапа погружения эксплантов в жидкий азот.
23. Чашку Петри поставить на светоустановку.
24. По прошествии одного часа криоконсервации в жидком азоте достать из морозильника сосуд Дьюара с криопробирками.
25. Поставить в ламинар пенопластовый штатив для криопробирок.
26. Налить в штатив жидкий азот.
27. Пинцетом достать две криопробирки из сосуда Дьюара и поместить их в штатив, аккуратно открыть криопробирки и долить в них жидкий азот.
28. Быстрым и точным движением пинцета перенести полоски фольги с эксплантами из криопробирки в чашку Петри с раствором RS и оставить на 15 мин при комнатной температуре (вариант «опыт» или «+LN»).
29. Через 15 мин «криоконсервированные» апексы извлечь пинцетом из раствора RS и поместить их в чашку Петри со средой MSTo для посткриогенного восстановления.
30. Чашки Петри закрыть парафилмом, подписать название образца, номер повторности опыта, дату и слово «опыт» или «+LN», обозначая этап погружения эксплантов в жидкий азот.
31. Чашки Петри поставить на светоустановку.

#### Необходимые материалы и оборудование

- Весы аналитические с точностью до 0.01 г;
- рН-метр;
- электроплитка с водяной баней или микроволновая печь для растворения агара;
- холодильный шкаф для хранения рабочих растворов и реактивов;
- автоклав;
- сушильные шкафы для сушки и стерилизации посуды;

Indicators of post-cryogenic recovery of potato accessions cryopreserved  
by the droplet vitrification method modified at VIR

No.	Potato variety	Ploidy level*	Accession no. in the VIR catalogue	Control (without freezing) (-LN)		Indicators of post-cryogenic recovery after freezing-thawing (+LN)	
				Viability, %	Regeneration rate, %	Viability after thawing, %	Regeneration rate after thawing, %
Group A. Regeneration rate after thawing above 40 %							
1	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigenum</i>	4x	1741	100±0.0	100±0.0	96.7±0.8	94.9±0.1
2	<i>S. phureja</i>	2x	15845	86.7±8.9	86.7±8.9	80.1±10.0	75.0±13.3
3	<i>S. phureja</i>	2x	1678	100±0.0	100±0.0	75.0±1.6	73.3±1.6
4	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	4x	2117	71.1±1.5	60.3±8.4	71.1±1.9	71.1±1.9
5	<i>S. stenotomum</i>	2x	9303	100±0.0	100±0.0	81.7±7.5	71.7±1.4
6	<i>S. phureja</i>	2x	9393	80.0±5.8	80.0±5.8	70.0±10.0	70.0±10.0
7	<i>S. stenotomum</i>	2x	10194	83.3±3.3	83.3±3.3	73.9±2.6	69.0±5.5
8	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigenum</i>	4x	8931	83.3±8.8	83.3±8.8	68.3±3.6	66.7±2.8
9	<i>S. phureja</i>	2x	16530	93.3±3.3	93.3±3.3	68.3±2.0	63.3±1.0
10	<i>S. phureja</i>	2x	15843	100±0.0	100±0.0	61.7±1.0	61.7±1.0
11	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigenum</i>	4x	3041	100±0.0	100±0.0	63.3±2.1	61.7±2.1
12	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigenum</i>	4x	12892	100±0.0	100±0.0	60.0±2.0	60.0±2.0
13	<i>S. phureja</i>	2x	22210	90.0±5.8	90.0±5.8	60.0±10.0	60.0±10.0
14	<i>S. stenotomum</i>	2x	9889	80.0±0.0	80.0±0.0	60.2±13.3	60.0±13.3
15	<i>S. tuberosum</i> , cv. <i>Sudarynya</i>			93.3±3.3	93.3±3.3	60.0±15.3	60.0±15.3
16	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	4x	7523	96.7±3.3	96.7±3.3	60.0±15.5	60.0±15.5
17	<i>S. stenotomum</i>	2x	9039	86.7±3.3	86.7±3.3	60.0±2.9	58.0±5.8
18	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	4x	7530	70.0±5.8	70.0±5.8	56.7±2.1	56.7±2.1
19	<i>S. stenotomum</i>	2x	7037	73.3±3.3	73.3±3.3	59.7±4.6	56.5±2.3
20	<i>S. phureja</i>	2x	99	86.7±13.3	86.7±13.3	62.2±12.2	53.3±3.3
21	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	4x	7586	90.0±0.0	90.0±0.0	55.0±5.8	53.3±3.3
22	<i>S. tuberosum</i> , cv. <i>Amado</i>			73.3±3.3	73.3±3.3	50.0±10.0	50.0±10.0
23	<i>S. phureja</i>	2x	16530	96.7±3.3	96.7±3.3	50.0±12.3	50.0±12.3
24	<i>S. stenotomum</i>	2x	8880	80.0±0.0	80.0±0.0	48.5±5.5	48.5±5.5
25	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	4x	7580	83.3±3.3	83.3±3.3	50.0±3.8	48.0±3.3
26	NZ-32, elite clone			83.3±3.3	83.3±3.3	52.0±5.8	47.5±2.4
27	<i>S. stenotomum</i>	2x	8865	73.3±3.3	73.3±3.3	48.1±3.8	46.7±3.3
28	<i>S. stenotomum</i>	2x	11053	73.3±3.3	73.3±3.3	48.0±10.8	46.7±12.0
29	<i>S. tuberosum</i> , cv. <i>Delikat</i>			81.7±4.4	81.7±4.4	50.0±5.8	45.0±5.0
30	<i>S. tuberosum</i> , cv. <i>Forelle</i>			76.7±3.3	76.7±3.3	45.1±13.8	42.8±12.8
31	<i>S. tuberosum</i> , cv. <i>Baltica</i>			80.0±5.8	80.0±5.8	50.0±5.8	42.7±2.7
32	<i>S. tuberosum</i> , cv. <i>Atlantic</i>			73.3±3.3	73.3±3.3	45.0±5.5	42.5±2.5
33	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	4x	7529	80.0±5.8	80.0±5.8	40.0±16.0	40.0±16.0
Group B. Regeneration rate after thawing within 21–39 %							
1	<i>S. tuberosum</i> , сорт <i>Rasant</i>			80.0±5.8	80.0±5.8	35.5±5.0	35.5±5.0
2	<i>S. stenotomum</i>	2x	8935	73.3±3.3	73.3±3.3	33.3±1.0	33.3±1.0
3	<i>S. stenotomum</i>	2x	7126	73.3±3.3	73.3±3.3	40.0±5.5	33.3±13.3
4	<i>S. stenotomum</i> ( <i>S. yabari</i> )	2x	3640	80.0±0.0	80.0±0.0	61.7±6.4	30.9±10.9
5	<i>S. tuberosum</i> , cv. <i>Solara</i>			78.3±1.7	78.3±1.7	54.0±5.4	30.0±0.1
6	<i>S. stenotomum</i>	2x	10433	80.0±5.8	80.0±5.8	40.0±15.5	30.0±15.3
7	<i>S. tuberosum</i> , cv. <i>Sonate</i>			73.3±3.3	73.3±3.3	35.0±5.3	29.7±0.7
8	<i>S. tuberosum</i> , cv. <i>Maxi</i>			76.7±8.8	76.7±8.8	35.0±5.8	25.0±5.0
9	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	4x	3385	86.7±6.7	86.7±6.7	36.7±3.3	21.1±6.7
10	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigenum</i>	4x	1763	80.0±11.5	80.0±11.5	52.3±2.3	20.0±5.7
Group C. Regeneration rate after thawing below 20 %							
1	<i>S. spgazzinii</i>	2x	23061	53.3±6.7	53.3±6.7	36.7±8.8	13.3±3.3

\* (Gavrilenko et al., 2010)

- ламинарный бокс с горизонтальным потоком воздуха;
- стереомикроскоп;
- светоустановки в комнатах с терморегуляцией или климатические камеры;
- сосуд Дьюара объемом 25 л для хранения жидкого азота;
- сосуд Дьюара или термос объемом 0.5–1 л для проведения криоконсервации и переноса криоконсервированного материала в криобанк;
- инструменты и расходные материалы: пинцеты различного размера, препаравальные иглы, скальпели, ножницы, криопробирки объемом 1.8 мл, стерильные мембранные фильтры, жидкий азот.

## Результаты

Результаты криоконсервации 44 образцов картофеля, выполненной с использованием модифицированного в ВИР метода дроблет-витрификации, представлены в таблице и на рисунке.

В варианте контроля «–LN» (без погружения апексов в жидкий азот) число жизнеспособных и регенерировавших эксплантов совпадало: фактически все выжившие экспланты были способны к регенерации. Частота регенерации в контроле варьировала от 60.3 до 100 % и существенно не зависела от генотипа. Только у одного образца *S. spagazzinii* отмечен сравнительно низкий уровень регенерации в контроле (53.3 %) (см. таблицу).

Большая часть (76.7 %) изученных образцов культурного картофеля проявила высокую частоту посткриогенной регенерации (40.0–94.9 %) и вошла в группу А (см. таблицу). Группу Б составили 23.3 % образцов культурного картофеля, у которых средняя частота посткриогенного восстановления варьировала от 20 до 35.5 %, что соответствует предельно допустимым минимальным значениям закладки на длительное хранение в криобанк. Наиболее низкая частота регенерации после оттаивания (13.3 %) зафиксирована у образца дикого вида *S. spagazzinii*. Вероятно, для данного образца необходимы дополнительные эксперименты по подбору оптимальных условий криоконсервации. Отметим, что модифицированный в ВИР метод дроблет-витрификации разрабатывался для криоконсервации культурных видов картофеля – аборигенных и селекционных сортов.

Отмечена достоверная положительная корреляция ( $0.99$ ;  $p < 0.05$ ) между показателями жизнеспособности и регенерационной способности эксплантов в контроле (–LN), а также статистически значимая положительная корреляция ( $0.88$ ) между уровнями посткриогенной жизнеспособности и регенерационной способности эксплантов после замораживания–оттаивания (+LN). Показатели жизнеспособности эксплантов в контроле (–LN) и в варианте криоконсервации (+LN) не коррелировали ( $0.55$ ;  $p > 0.05$ ), как и показатели регенерационной способности ( $0.53$ ;  $p > 0.05$ ).

Уровень ploидности и видовая принадлежность образцов культурных видов картофеля не оказывали значимого влияния на частоту посткриогенной регенерации. Существенное ( $p < 0.05$ ) влияние на частоту посткриогенной регенерации после оттаивания оказывал генотип. Группы А и Б сформировались вне зависимости от видовой принадлежности образцов и их уровня ploидности.

## Заключение

Существующие методы криоконсервации сортов картофеля не являются универсальными и требуют постоянного совершенствования, что особенно актуально при работе с большими коллекциями, включающими широкое генетическое разнообразие. На сегодняшний день в мировых генбанках для криоконсервации картофеля наиболее широко используется метод дроблет-витрификации, разработанный Б. Панисом (Panis et al., 2005). По сравнению с оригинальным методом предложенные в ВИР модификации позволяют существенно сократить продолжительность экспериментов по криоконсервации, при этом большая часть (76.7 %) изученных образцов культурного картофеля имела высокие показатели посткриогенного восстановления (40–95 %) и у 23.3 % образцов средняя частота посткриогенного восстановления варьировала от 20 до 39 %. В настоящее время модифицированный метод дроблет-витрификации используется в ВИР для расширения криокolleкции культурных видов картофеля.

## 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;164:273-285.
- [Gavrilenko T.A., Dunaeva S.E., Truskinov E.V., Antonova O.Y., Pendinen G.I., Lupysheva J.V., Rogovaja 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;164:273-285. (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 криокolleкция. 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 Cultures *in vitro* and in Cryocollections. St. Petersburg: VIR Publ., 2011. (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.
- [Ukhatoва Yu.V., Gavrilenko T.A. Cryoconservation methods for vegetatively propagated crops (review). Biotekhnologiya i Seletsiya 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.
- [Ukhatoва Yu.V., Oves E.V., Volkova N.N., Gavrilenko T.A. Cryoconservation of potato breeding cultivars in 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. СПб., 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)]

- Antonova O.Y., Shvachko N.A., Novikova L.Y., Shuvalov O.Y., Kostina L.I., Klimenko N.S., Shuvalova A.R., Gavrilenko T.A. Genetic diversity of potato varieties bred in Russia and its neighboring countries based on the polymorphism of SSR-loci and markers associated with resistance *R*-genes. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2017;7(5):489-500. DOI 10.1134/S2079059717050021.
- 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.
- Engelmann F. Cryopreservation of clonal crops: a review of key parameters. *Acta Hort.* 2014;1039:31-39.
- FAO. Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rev. ed. Rome, 2014.
- Gavrilenko T., Antonova O., Ovchinnikova A., Novikova L., Krylova E., Mironenko N., Pendinen G., Islamshina A., Shvachko N., Kiru S., Kostina L., Afanasenko O., Spooner D. A microsatellite and morphological assessment of the Russian National Potato Collection. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2010;57(8):1151-1164. DOI 10.1007/s10722-010-9554-8.
- IPGRI. Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current research progress and applications. Engelmann F., Takagi H. (Eds.). 2000.
- 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.
- Keller E.R.J., Sunura A., Leunufna S., Grübe M. Slow growth storage and cryopreservation – tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *J. Refrigeration.* 2006;29:411-417.
- 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.
- Kushnarenko S., Romadanova N., Aralbayeva M., Zholamanova S., Alexandrova A., Karpova O. Combined ribavirin treatment and cryotherapy for efficient Potato virus M and Potato virus S eradication in potato (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* shoots. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2017;53(4):425-432. DOI 10.1007/s11627-017-9839-0.
- Murashige T., Skoog F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962;15:473-497.
- 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.
- Panis B., Van den Houwe I., Swennen R., Rhee J., Roux N. Securing plant genetic resources for perpetuity through cryopreservation. *Indian J. Plant. Genet. Resour.* 2016;29(3):300-302.
- Panta A., Panis B., Ynouye C., Swennen R., Roca W. Development of a PVS2 droplet vitrification method for potato cryopreservation. *CryoLetters.* 2014;35(3):255-266.
- 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.
- Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 1990;9(1):30-33. DOI 10.1007/bf00232130.
- 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.
- Towill L.E. Improved survival after cryogenic exposure of shoot tips derived from *in vitro* plantlet cultures of potato. *Cryobiology.* 1983;20:567-573.
- 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.
- Yoon J.W., Kim H.H., Ko H.C., Hwang H.S., Hong E.S., Cho E.G., Engelmann F. Cryopreservation of cultivated and wild potato varieties by droplet vitrification: effect of subculture of mother-plants and of preculture of shoot tips. *CryoLetters.* 2006;27(4):211-222.

#### ORCID ID

T.A. Gavrilenko [orcid.org/0000-0002-2605-6569](https://orcid.org/0000-0002-2605-6569)  
Yu.V. Ukhatova [orcid.org/0000-0001-9366-0216](https://orcid.org/0000-0001-9366-0216)

**Acknowledgements.** The test of the capability for postcryogenic repair in 44 potato accessions was supported by the Russian Science Foundation, project 16-16-04125. The maintenance of the *in vitro* potato collection whose accessions were chosen for cryopreservation was supported by budgeted project 0662-2019-0004. The photograph of the isolated explant (Figure, c) was taken with the equipment of the Shared Access Center "Cellular and Molecular Technologies for Studying Plants and Fungi", Komarov Botanical Institute, St. Petersburg.

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

Received December 13, 2018. Revised February 24, 2019. Accepted February 24, 2019.