

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ВСЕРОССИЙСКИЙ ИНСТИТУТ
ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ ИМЕНИ Н. И. ВАВИЛОВА» (ВИР)

УДК: 632.9: 632.934.3: 573.6.086.83

на правах рукописи

Ухатова Юлия Васильевна

Совершенствование методов криоконсервации и оздоровления от вирусных
болезней образцов вегетативно размножаемых культур

06.01.05. – селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Т. А. Гавриленко

Санкт-Петербург – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	8
1.1. Биологическая характеристика и хозяйственная значимость объектов исследования.....	8
1.2. Современные методы сохранения в контролируемых условиях среды генофонда вегетативно размножаемых культур на примере малины, ежевики, картофеля – <i>in vitro</i> и криоколлекции	11
1.2.1. Методы <i>in vitro</i> сохранения образцов вегетативно размножаемых культур.....	11
1.2.2. Методы криоконсервации растений	17
1.2.2.1. Факторы, влияющие на показатели посткриогенной регенерации	24
1.2.2.2. Криоколлекции представителей рода <i>Rubus</i> (малины, ежевики).....	33
1.2.2.3. Криоколлекции культурных видов картофеля.....	35
1.3. Оздоровление образцов <i>in vitro</i> коллекций от вирусных инфекций	38
1.3.1. Значение оздоровленного материала для развития семеноводства.....	38
1.3.2. Вирусы малины.....	40
1.3.3. Вирусы картофеля.....	40
1.3.4. Методы оздоровления <i>in vitro</i> образцов вегетативно размножаемых растений ..	41
1.3.5. Эффективность различных методов оздоровления растений малины и ежевики от RBDV в системе <i>in vitro</i>	45
1.3.6. Эффективность различных методов оздоровления микрорастений картофеля от основных вирусов, включая PLRV.....	47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	54
2.1. Растительный материал.....	54
2.2. Методы исследований.....	56
2.2.1. Оценка способности к «эффективному клональному микроразмножению» образцов малины и ежевики.....	56
2.2.2. Метод капель-витрификации для криоконсервации образцов малины, ежевики, картофеля.....	57
2.2.3. Оздоровление микрорастений малины и картофеля от вирусов	59
2.2.4. Статистическая обработка результатов.....	64
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	65
3.1. Изучение способности к «эффективному клональному микроразмножению» образцов малины и ежевики из <i>in vitro</i> коллекции ВИР.....	65

3.2.	Оптимизация протокола дроplet-витрификации (DV) для криоконсервации образцов малины – анализ литературных данных, выбор оптимального типа эксплантов и продолжительности их обработки раствором криопротекторов.....	68
3.3.	Изучение способности к посткриогенному восстановлению сортов малины и ежевики при использовании оптимизированного протокола дроplet-витрификации – «DV-biotech».....	77
3.4.	Изучение жизнеспособности и регенерационной способности после оттаивания у селекционных сортов и у коллекционных образцов культурных видов картофеля с использованием оптимизированного протокола «DV-biotech».....	79
3.5.	Оценка эффективности оздоровления микрорастений малины от вируса RBDV при использовании различных методов противовирусной терапии: химиотерапии, комплексной термо-химиотерапии и криотерапии на основе протокола «DV-biotech».....	87
3.6.	Изучение эффективности оздоровления микрорастений картофеля от вируса скручивания листьев картофеля (PLRV) методами комплексной термо-химиотерапии и криотерапии на основе оптимизированного протокола «DV-biotech».....	90
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	95
	ВЫВОДЫ.....	98
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	99
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	100
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	103
	ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	133

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Ряд вегетативно размножаемых культур имеет важное экономическое значение. Среди них – картофель и ягодные культуры – малина, ежевика. Так, по данным ФАО (FAOSTAT, 2014) Российская Федерация является ведущей страной в мире по производству свежих ягод малины и занимает третье место по объему производства картофеля. Современная селекция этих культур базируется на эффективном использовании генофонда культурных и родственных дикорастущих видов, являющихся основой для создания новых высокоурожайных сортов, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессорам. Поэтому надежное сохранение генетических ресурсов этих важнейших вегетативно размножаемых культур имеет первостепенное значение для развития отечественной селекции.

Коллекции вегетативно размножаемых культурных растений – наиболее уязвимы, сильно поражаются вирусами и другими патогенами в процессе длительного поддержания в полевых генбанках; образцы этих коллекций невозможно сохранять семенами (IPGRI/FAO, 1994, 1998; Гиричев и др., 2012; Высоцкий, 2015б; Молканова, 2017а, б). Для надежного хранения генофонда сортов, гибридов и селекционных клонов наряду с полевыми коллекциями создаются дублетные *in vitro* и криоколлекции, позволяющие сохранять оздоровленные от патогенов образцы вегетативно размножаемых культур в контролируемых условиях среды (IPGRI/FAO, 1998; Гавриленко и др., 2007; Reed, 2008, 2013; Дунаева и др., 2012; FAO, 2014; Филипенко и др., 2014; Vamberg et al., 2016; Vollmer et al., 2016; Овэс и др., 2016; Носов и др., 2017).

Современная стратегия длительного надежного хранения генетического разнообразия вегетативно размножаемых культур в контролируемых условиях среды включает следующие этапы: введение растительного материала в культуру *in vitro*, оздоровление от вирусных инфекций, индексацию микрорастений на наличие патогенов, клональное микроразмножение, криоконсервацию и депонирование образцов в криобанки для долгосрочного хранения при сверхнизких температурах (Reed, 2008, 2013; Гавриленко и др., 2007; Дунаева, Гавриленко, 2007; Дунаева и др., 2012; FAO, 2014). Использование методов криоконсервации позволяет решать одновременно две задачи: долгосрочного сохранения образцов в криоколлекциях и получение оздоровленных на основе метода криотерапии регенерантов. Необходимо отметить, что круг культур, для которых разработан весь комплекс перечисленных выше методов, ограничен.

Криоколлекции малины и ежевики создаются в генбанках: NCGR, США (210 сортов и клонов диких видов); MTT ARF, Финляндии (37 образцов); IPBB, Казахстан (30 образцов). Криоколлекции картофеля сохраняются в генбанках: IPK, Германия (1428 селекционных

сортов), в СР, Перу (1028 аборигенных сортов), в USPG, США (280 селекционных сортов); в ВИР, Россия (160 аборигенных сортов); в CAES, Япония (100 образцов). Несмотря на то, что для малин, ежевик, картофеля, накоплен большой объем экспериментальных данных в области оздоровления растений от вирусных инфекций, клонального микроразмножения и криоконсервации, эти методы нуждаются в дальнейшем совершенствовании с целью повышения их эффективности, расширения возможностей их использования для генетически разнообразного материала, сокращения длительности протоколов, а также снижения стоимости работ при создании больших криоколлекций.

Разработка новых технологий и совершенствование существующих методов оздоровления растений от вирусных инфекций и клонального микроразмножения важны и для развития современного семеноводства вегетативно размножаемых культур, которое основано на производстве высококачественного безвирусного посадочного материала.

Целью работы являлось совершенствование методов криоконсервации и оздоровления от вирусных болезней образцов малины, ежевики, картофеля из *in vitro* коллекции ВИР для долгосрочного сохранения вегетативно размножаемых культур в контролируемых условиях.

В соответствии с этой целью были поставлены следующие **экспериментальные задачи**:

1. Изучить способность к «эффективному микроразмножению» селекционных сортов и образцов культурных и дикорастущих видов малины и ежевики из *in vitro* коллекции ВИР. Отобрать генотипы с высокими показателями коэффициентов клонального микроразмножения для последующего их использования в экспериментах по криоконсервации.

2. Оптимизировать метод капель-витрификации (DV) для криоконсервации образцов малины - определить оптимальные тип экспланта и продолжительность обработки эксплантов раствором криопротекторов.

3. Определить способность к посткриогенному восстановлению у сортов малины и ежевики из *in vitro* коллекции ВИР с использованием оптимизированного протокола «DV-biotech».

4. Оценить регенерационную способность после замораживания-оттаивания у образцов различных культурных видов картофеля из *in vitro* коллекции ВИР с использованием протокола «DV-biotech».

5. Оценить эффективность оздоровления микрорастений малины от вируса RBDV с использованием различных методов противовирусной терапии – химиотерапии, комплексной термо-химиотерапии, а также криотерапии на основе оптимизированного протокола «DV-biotech».

б. Изучить эффективность оздоровления микрорастений картофеля от вируса PLRV с использованием методов комплексной термо-химиотерапии и криотерапии на основе протокола «DV-biotech».

Научная новизна и практическая значимость работы:

Впервые в одной работе проведены исследования по оптимизации и апробации метода криоконсервации на основе капель-витрификации для различных вегетативно размножаемых культур (малина, ежевика, картофель); для каждой культуры были использованы представительные выборки образцов.

Впервые проведены комплексные исследования по оптимизации методов криоконсервации и методов оздоровления микрорастений от вирусных инфекций для представительных выборок различных вегетативно размножаемых культур (малины и картофеля).

Разработан оптимизированный протокол капель-витрификации «DV-biotech» для криоконсервации образцов малины и ежевики, позволяющий получить высокие показатели посткриогенной регенерации эксплантов; определены оптимальные тип экспланта и продолжительность обработки раствором криопротекторов.

Предложен усовершенствованный регламент закладки на длительное хранение в криобанке ВИР коллекционных образцов вегетативно размножаемых культур на примере малины, ежевики и картофеля с использованием протокола «DV-biotech».

Рекомендованы усовершенствованные методы для практического использования в программах по оздоровлению образцов малины от RBDV и картофеля от PLRV. Получены оздоровленные от вируса RBDV клоны *in vitro* растений малины на основе метода комплексной термо- химиотерапии. Получены оздоровленные от вируса PLRV микрорастения картофеля с использованием метода криотерапии на основе протокола «DV-biotech», а также метода комплексной термо- химиотерапии.

Впервые на одном и том же материале (образец, генотип, клон) проведено сравнение эффективности разных методов противовирусной терапии, включающих метод комплексной термо- химиотерапии, используемый в ведущих генбанках и метод криотерапии, основанный на оптимизированном протоколе капель-витрификации. Для криотерапии в отношении PLRV метод капель-витрификации был применен впервые.

Практическое применение полученных результатов перспективно для дальнейшего расширения криоколлекций.

Апробация результатов работы.

Результаты работы были представлены на международных и всероссийских конференциях, конгрессах и совещаниях, в том числе: II Вавиловской Международной

конференции «Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке: состояние, проблемы, перспективы» (Санкт-Петербург, 2007), Международной научной конференции «Генетические ресурсы растений – основа продовольственной безопасности и повышения качества жизни» (Санкт-Петербург, 2014); Международной научно-практической конференции «Методы и технологии в селекции растений и растениеводстве» (Киров, 2015); Международной научно-практической конференции «Развитие новых технологий селекции и создание отечественного конкурентоспособного семенного фонда картофеля» (Коренево, 2016); Международной научной конференции, посвященная 125-летию со дня рождения С.М. Букасова. «Проблемы систематики и селекции картофеля» (Санкт-Петербург, 2016), а также на Выставке-конференции «Биоиндустрия 2016» (Санкт-Петербург, 2016); Международной научно-практической конференции «Пути повышения эффективности садоводства» (Республика Крым, 2017).

По материалам диссертации опубликованы 6 научных статей в изданиях, рекомендованных ВАК, и 16 тезисов.

Личный вклад автора. Основные результаты, изложенные в диссертации, получены автором самостоятельно в отделе биотехнологии ФГБНУ «ФИЦ ВИР». Непосредственное участие автор принимал на всех этапах представленных в работе исследований, в обработке и анализе полученных данных, подготовке публикаций. Исследования по детекции вирусов в тканях микрорастений были проведены совместно с кандидатом биологических наук, ведущим научным сотрудником отдела биотехнологии ВИР к.б.н. Антоновой О. Ю. Эксперименты по криоконсервации 10 селекционных сортов картофеля проведены совместно с лаборантом Волковой Н. Н.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, заключения, списка сокращений, списка литературы и одного приложения. Работа изложена на 137 страницах, содержит 18 таблиц и 13 рисунков. Список литературы включает 327 источников, из них 210 на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д. б. н. Т. А. Гавриленко за всестороннюю помощь и советы на всех этапах работы. Искреннюю благодарность за помощь на разных этапах работы автор адресует сотрудникам отдела биотехнологии ВИР к. б. н. С. Е. Дунаевой, к. б. н. О. Ю. Антоновой, к. б. н. Г. И. Пендинен, к. б. н. О. В. Апаликовой, лаб.-иссл. Н. Н. Волковой, лаб.-иссл. М. М. Черепко, лаб.-иссл. Л. Е. Шуваловой. За помощь в статистической обработке данных автор благодарит к. т. н. Л. Ю. Новикову. Отдельная благодарность автора адресована членам семьи за их поддержку при выполнении и написании работы.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Биологическая характеристика и хозяйственная значимость объектов исследования

В рамках данной работы изучались вегетативно размножаемые сельскохозяйственные культурные растения умеренной зоны: представители культурных видов родов *Rubus* L. и *Solanum* L. – малина, ежевика и картофель из коллекции ВИР им. Н. И. Вавилова.

Биологическая характеристика и хозяйственная значимость образцов малины и ежевики

Род *Rubus* L. (Малина и Ежевика) относится к подсемейству *Rosoideae* семейства *Rosaceae* Juss. (Бологовская, 1936; Jennings et al., 1990; Graham, Woodhead, 2009). В настоящее время в составе рода насчитывается, по данным разных авторов, от 500 (Jennings, 1988; Meng, Finn, 2002) до 750 видов (Alice, Campbell, 1999; Красовская, 2005) различной ploидности (Jennings, 1988; Тахтаджян, 1993; Meng, Finn, 2002). На территории России встречаются виды рода *Rubus*, относящиеся к четырем под родам: *Idaeobatus*, *Rubus* (= *Eubatus*), *Chamaerubus* (= *Chamaemorus*), *Cylactis* (Бологовская, 1936; Тахтаджян, 1993).

Селекционные сорта малины относятся к под роду *Idaeobatus* Focke, включающему более 100 видов – по данным разных систематиков от 117 (Красовская, 2002) до 200 (Синькова, 1972; Jennings, 1988; Skirvin et al., 2005; Finn, Hancock, 2008). Большинство видов малины диплоиды, однако встречаются единичные три- и тетраплоидные формы (Тахтаджян, 1993; Thompson 1995а,б, Thompson 1997). Виды под рода *Idaeobatus* встречаются в Азии, Европе, Северной Америке и Южной Африке, но наибольшее разнообразие наблюдается в Азии. Важнейшие из видов малин - *Rubus idaeus* subsp. *idaeus* - европейская красная малина и *Rubus idaeus* subsp. *strigosus* Michx. - североамериканская красная малина. Родословные большинства современных сортов малины включают оба этих подвида. Кроме них в культуре распространены чёрные малины – *R. occidentalis* L. из Северной Америки. На территории России и сопредельных стран встречаются представители шести видов малины (Тахтаджян, 1993).

Наиболее многочисленный (>200 видов) под род *Rubus* рода *Rubus* включает обширное видовое разнообразие ежевик (Черепанов, 1981; Jennings, 1988; Skirvin et al., 2005). Внутри под рода *Rubus* встречаются виды различной степени ploидности – от диплоидов ($2n=2x=14$) до додекаплоидов ($2n=12x=84$) (Jennings, 1988; Тахтаджян, 1993; Meng, Finn, 2002). Ежевики распространены в Северо-Западной Азии и Европе, на севере Африки, в Северной Америке, в горах и тропических областях Южной Америки (Бологовская, 1936; Skirvin et al., 2005). Во флоре России и сопредельных государств насчитывается свыше 80 видов ежевик (Синькова, 1983; Черепанов, 1981).

По данным ФАО за 2014 год, Россия является ведущей в мире по производству свежих ягод малины (FAOSTAT <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> 2013; <http://www.mapsofworld.com/world-top-ten/raspberry-producing-countries.html>, 10/03/2017). Малина является одной из наиболее распространенных ягодных культур в России (Бологовская, 1936; Синькова, 1972; Казаков, 1994; Кормановская, 1995; Атрощенко, Щербакова, 2013, 2015).

В российском государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию на 03/08/2017, насчитывается 85 сортов малины и 2 сорта ежевики (www.reestr.gossort.com). Генофонд сортов и дикорастущих видов малины и ежевики в ВИРе составляет около 300 образцов, поддерживается в основном в неконтролируемых условиях традиционным способом в коллекционных питомниках на филиалах Полярная ОС ВИР, Майкопская ОС ВИР и НПБ «Пушкинские и Павловские и Пушкинские лаборатории ВИР» (Юшев и др., 2016). В коллекции *in vitro* ВИР поддерживается 177 образцов рода *Rubus* (данные на 2017 г.).

Питомниководство базируется на производстве высококачественного оздоровленного посадочного материала (саженцев малины и ежевики), что требует разработанных технологий оздоровления и микроразмножения образцов. Поэтому в рамках настоящей работы было проведено совершенствование методов сохранения коллекционных образцов малины и ежевики в контролируемых условиях среды (оптимизация модифицированного метода криоконсервации – дроплет-витрификации), а также оздоровление от вирусных болезней на примере вируса RBDV.

Биологическая характеристика и хозяйственное значение возделываемого картофеля

Картофель – группа клубнеобразующих видов рода *Solanum* L., секции *Petota* Dumort, подсекции *Potatoe* G. Don. В эту подсекцию наряду с большим числом (по данным разных систематиков, от 100 до 200) дикорастущих видов входит группа культурных видов (по данным разных авторов, от 3 до 17), разнообразие которых представлено аборигенными южно-американскими сортами различных уровней ploидности: ди- ($2n=2x=24$), три-, тетра- и пентаploидного ($2n=5x=60$) (Букасов, 1978; Hawkes, 1990; Ovchinnikova et al., 2011; Spooner et al., 2014). В ВИРе для описания видовой принадлежности образцов картофеля традиционно используют систему Букасова (1978), в нашей работе названия таксонов приведены согласно системе Хокса, наиболее часто используемой в настоящее время (Hawkes, 1990).

Возделываемый картофель (*Solanum tuberosum* L.) занимает четвертое место в мире среди ведущих продовольственных культур (после пшеницы, риса, кукурузы), являясь наиболее важной незерновой культурой (ФАО, 2014). В российском государственном реестре

селекционных достижений, допущенных к использованию на 03/08/2017, насчитывается 428 сортов картофеля (www.reestr.gossort.com).

Для сохранения генетического разнообразия селекционных сортов картофеля их поддерживают вегетативно, в основном, в полевых коллекциях, поскольку половое размножение разрушает генетическую структуру сортов (FAO/IPGRI, 1998; Лутова, 2003; Гавриленко и др., 2007; Лутова и др., 2011). В настоящее время в ВИРе сохраняется около 8500 образцов картофеля (Киру, Рогозина, 2017), из них 2300 селекционных сортов картофеля, около 320 из которых представлены сортами селекции РФ и стран ближнего зарубежья. Коллекция образцов культурных видов картофеля, сохраняемая в ВИРе, является старейшей и одной из крупнейших в мире, представлена более чем 3500 образцами растений (Юзепчук, Букасов, 1929; Букасов, 1978).

Современные селекционные сорта картофеля являются сложными гибридами *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* с различными дикими и культурными видами – носителями ценных генов устойчивости к биотическим и абиотическим стрессорам. Поэтому очевидно, что для селекции важно надежно сохранять широкое разнообразие генетических ресурсов картофеля в коллекциях генбанков, в частности, – в ВИРе. При этом необходимо поддерживать полевые коллекции с обязательным дублированием ценных генотипов (клонов) в *in vitro* и криоколлекциях.

Современное семеноводство базируется на производстве высококачественного оздоровленного посадочного материала (мериклонов, микрорастений, микроклубней и миниклубней картофеля) через культуру *in vitro*, что требует разработанных технологий оздоровления от вирусных, микоплазменных и бактериальных инфекций и микроразмножения образцов (Усков и др., 2014; Рябцева и др., 2015; Анисимов и др., 2017; Малько и др., 2017). Для оздоровления микрорастений картофеля широко используются методы культуры *in vitro* (культуры меристем), в том числе и в нашей стране. Однако в последнее время разрабатываются более эффективные методы – комплексной терапии, криотерапии и др. (Lizzarga et al., 1991; Антонова и др., 2015; Bamberg et al., 2016).

В связи с вышесказанным настоящая работа посвящена совершенствованию методов сохранения коллекционных образцов картофеля в контролируемых условиях среды с использованием оптимизированного метода капель-витрификации, а также метода оздоровления (криотерапии) от вирусных болезней на примере PLRV.

В настоящее время разнообразие вегетативно размножаемых культурных растений (местные и селекционные сорта, гибриды, селекционные клоны) сохраняют *in situ* и *ex situ* в различных видах: на фермах, в полевых коллекциях научных институтов и в генбанках – в естественных условиях среды, а также в контролируемых условиях среды: в *in vitro* и

криоколлекциях (IPGRI, 2000; FAO, 2014). Существуют опубликованные международные стандарты генбанков для сохранения коллекций семян (FAO, 2014), руководства по поддержанию образцов в полевых коллекциях (FAO/IPGRI, 1998). В то же время в литературе отмечается, что стандартов для формирования и поддержания *in vitro* и криоколлекций пока нет (IPGRI, 2000; Reed, 2008; FAO, 2014). В связи с этим выполненная работа посвящена совершенствованию существующих технологий сохранения и оздоровления образцов в контролируемых условиях – *in vitro* и *in cryo*.

1.2. Современные методы сохранения в контролируемых условиях генофонда вегетативно размножаемых культур на примере малины, ежевики, картофеля – *in vitro* и криоколлекции

1.2.1. Методы *in vitro* сохранения образцов вегетативно размножаемых культур

Известно, что половое размножение вегетативно размножаемых культур разрушает генетическую структуру сортов, представленных высоко гетерозиготными генотипами (FAO, 1998; Лутова, 2003; Гавриленко и др., 2007; Лутова и др., 2011). В то же время длительное вегетативное размножение в полевых условиях приводит к инфицированию растений вирусами, патогенными грибами и бактериями (FAO, 1998; Дунаева, Гавриленко, 2007; Митрофанова, 2007; Трускинов, 2014; FAO, 2014), в результате происходит потеря селекционных сортов и образцов культурных и дикорастущих видов, зачастую уникальных, обладающих хозяйственно ценными признаками.

Методы культуры тканей растений стали незаменимыми в современной селекции и семеноводстве вегетативно размножаемых культур, поскольку позволили получать большое количество клонового посадочного материала (в частности, селекционных сортов плодовых и ягодных культур: малины, ежевики, вишни, яблони, смородины, а также сортов картофеля), проводить оздоровление растительного материала от патогенов и сохранять ценные генотипы в контролируемых условиях среды (FAO, 2014; Гиричев и др., 2012; Высоцкий, 2015б; Молканова, 2017а, б).

Наибольшее распространение в производстве оздоровленного посадочного материала получил метод размножения под названием «пролиферация пазушных побегов», или собственно микроклональное размножение, основанный на снятии апикального доминирования, при котором побеги развиваются из меристем пазушных почек (Высоцкий, 1989, 2016; Reed, 1990; IPGRI, 2000; Лутова, 2003; Медведев, 2004). Этот метод позволяет сохранять генетическую стабильность исходных растений, и в настоящее время является наиболее надежным для клонального микроразмножения и промышленного производства

плодовых, ягодных культур, картофеля (Высоцкий, 1989, 2016; Reed, 1990; IPGRI, 2000; Лутова, 2003; Медведев, 2004; Дунаева и др., 2011; Овэс и др., 2014, 2016; Молканова, 2017а, б).

Работа с *in vitro* коллекциями в генетических банках растений включает инокуляцию эксплантов (почек, изолированных меристем) на питательную среду, микроклональное размножение, получение микрорастений и среднесрочное хранение образцов растений в контролируемых условиях среды.

При введении образца в культуру *in vitro* проводится стерилизация исходных почек, вычленение меристем или апексов побегов в ламинар-боксе и инокуляция эксплантов на питательную среду с добавлением цитокинина 6-бензиламинопурина (БАП) (Voxus, 1976; Клоконос, 1989; Стрыгина, 1989; Абдуваси, 1994; Read, 2004; Таварткиладзе, Вечернина, 2007; Макаров и др., 2017; Молканова, 2017а), TDZ (Вовк, 2000; Сковородников, 2004). Главной задачей этапа микроклонального размножения является достижение высокого значения коэффициента микроразмножения – КМР. Дальнейшее клональное микроразмножение осуществляется делением микропобегов на однопочковые черенки, которые используются в качестве вторичных эксплантов. При получении необходимого количества микрочеренков их укореняют, получают укорененные микрорастения, проверяют их на наличие бактериальных и вирусных инфекций и образцы без патогенов включают в коллекцию *in vitro*. Чаще всего так размножают микрорастения картофеля (Дунаева и др., 2011; Овэс и др., 2014). Для получения необходимого числа микропобегов можно проводить несколько пассажей микрочеренков на питательной среде с цитокинином. Таким образом часто поступают при микроразмножении плодовых и ягодных культур (Высоцкий, 1989; Вовк, 2000; Сковородников, 2004; Митрофанова, 2007; Дунаева и др., 2011; Высоцкий, Упадышев, 2015, 2016).

На этапе укоренения используют менее богатые по составу среды – например, МС с уменьшенной в два раза концентрацией минеральных солей (Клоконос, 1989; Стрыгина, 1989) или среду Уайта (Высоцкий, 1989; Упадышев, Высоцкий, 1995). В качестве стимуляторов корнеобразования применяют ауксины – индолилмасляную кислоту (ИМК), индолилуксусную кислоту (ИУК), нафтилуксусную кислоту (НУК) (Высоцкий, 1989; Дунаева и др., 2011).

В процессе работы с культурой *in vitro* необходимы контролируемые условия освещения и температуры; культивирование эксплантов проходит в закрытых пробирках с постоянной влажностью (Debergh, Read, 1991). Для большинства культур оптимальными условиями, обеспечивающими нормальное развитие эксплантов, являются температура 22–25°C и 16-часовое освещение (Высоцкий, 1989; Reed, 1990). Такие условия называют «стандартными условиями световой комнаты» (Высоцкий, 1989; Reed, 2013; Дунаева и др., 2011).

Успешность результатов на всех этапах клонального микроразмножения растений определяется составом питательной среды, типом и концентрацией фитогормонов, генотипом

растения, типом экспланта, окружающими условиями (температура, освещенность). В большинстве случаев для клонального микроразмножения растений применяется питательная среда на основе минерального состава (макро- и микросолей, витаминов) Мурасиге-Скуга – МС (Murashige, Skoog, 1962). Используются также модифицированные питательные среды Мурасиге-Скуга, в частности, для малины (Reed, 1990; Poothong, Reed, 2014, 2015, 2016), и другие питательные среды, которые подбираются для определенного растительного объекта (Вовк, 2000).

Для повышения значений КМР проводят подбор состава и концентраций цитокининов в питательных средах (Высоцкий, 1989; Стрыгина, 1989; Debergh, Read, 1991; Высоцкий, Упадышев, 2015, 2016). Чаще всего для этих целей применяют БАП (Voxus, 1976; Высоцкий, 1978; Стрыгина, 1989; Reed, 1990). Для ремонтантной малины рекомендуется также применение хлорфенилпередилмочевины (CPPU) (Нам и др., 1998), для образцов некоторых дикорастущих видов рода *Rubus* более эффективным оказался зеатин (Debnath, 2004; Nicuță et al., 2014; Zayova et al., 2016).

К настоящему времени накоплен достаточно большой опыт культивирования *in vitro* плодовых и ягодных культур: смородины черной (Атрощенко, 1995), жимолости (Сорокин, 2002), вишни (Орлова, 2002), абрикоса и сливы (Митрофанова, 2007), яблони и груши (Бьядовский, 2013). Определенные успехи по микроразмножению достигнуты в отношении таких представителей рода *Rubus*, как малина красная (Высоцкий, 1989; Reed, 1990; Упадышев, 1991), малина черная (Упадышев, Высоцкий, 1991), ежевика (Reed, 1990; Упадышев, Высоцкий, 1991), малино-ежевичные гибриды (Соловых, Муратова, 2011; Сковородников и др., 2015), а также ремонтантные сорта малины (Вовк и др., 1999; Вовк, 2002; Сковородников, 2004; Нам, 2004).

Влияние генотипа на эффективность микроразмножения растений показано в большом количестве работ (Reed, 1990; Оразбаева и др., 2012; Иванова-Ханина, 2013; Уланович, Сковородников, 2014; Poothong, Reed, 2014, 2015, 2016). В частности, у 6 сортов малины и ежевики было выявлено избирательное отношение к гормональному составу питательных сред для микроразмножения (Соловых, 2013). Автор пришла к заключению, что для клонального микроразмножения малины требуются более низкие концентрации цитокининов по сравнению с ежевикой.

При изучении способности к микроразмножению 6 сортов малины были отмечены межсортовые различия по уровню КМР. В случае двух сортов КМР не возрастал при добавлении с питательную среду с 0,5 мг/л БАП до 0,02 мг/л ИМК или до 0,02 мг/л ГК (Стрыгина, 1989). Аналогичные результаты при микроразмножении сортов ремонтантной малины получил В. Вовк (2000). В результате добавления в питательную среду ауксина ИМК

(0,05 мг/л) совместно с цитокинином БАП (2 мг/л) автор наблюдал снижение КМР у двух изученных образцов малины (Вовк, 2000). Образцы малины не всегда эффективно размножались в присутствии БАП и ИМК.

При изучении влияния концентрации различных компонентов питательной среды МС на показатели микроразмножения пяти сортов малины красной установили, что увеличение содержания солей (CaCl_2 , MgSO_4 , and KH_2PO_4) с одновременным снижением концентрации KNO_3 способствовало повышению КМР только у четырех сортов, для повышения показателей микроразмножения одного сорта требовались дополнительные манипуляции (Poothong, Reed, 2014, 2015).

Таким образом, в литературе существует обширная информация о сортовой специфичности показателей микроразмножения растений и высказывается рекомендация индивидуального подбора питательных сред для размножения и хранения отдельных образцов в коллекциях *in vitro*, в частности, плодовых и ягодных культур (Клоконос, 1989; Стрыгина, 1989; Вовк, 2002; Оразбаева и др., 2012; Иванова-Ханина, 2013; Уланович, Сковородников, 2014). Актуальной проблемой является поиск питательных сред для эффективного микроразмножения и поддержания генетически разнообразного растительного материала в *in vitro* коллекциях. Экономически эффективной была бы возможность выращивания всех образцов на одной питательной среде, однако широкое генетическое разнообразие сохраняемых растений усложняет задачу (Reed, 1990). Тем не менее, показана возможность подбора небольшого набора питательных сред для эффективного размножения большого числа генотипов определенных культур. Так, В.-М. Reed в генбанке NCGR (США) в 1990 году исследовала способность к микроразмножению 256 образцов (сортов и образцов дикорастущих видов) рода *Rubus* на трех питательных средах разного состава. В экспериментах В.-М. Reed «эффективным микроразмножением» считали образцы с коэффициентом микроразмножения (КМР) не менее трех. Ею была рекомендована питательная среда МС+1 БАП+0,1 ИМК (№I), на которой хорошо размножались все сорта ежевики и часть образцов малины, питательная среда среда МС+1 БАП+0,1 ИМК+0,1 ГК (№II) – для малин и ежевик, которые имели низкие значения КМР на среде №I и питательная среда Андерсона +1 БАП+0,1 ИМК (№III) – для малин, плохо размножающихся на питательной среде №I (Reed, 1990).

Микрорастения в условиях активного роста теоретически можно поддерживать бесконечно в контролируемых условиях среды при периодическом пассировании на свежие питательные среды, однако это требует частых субкультивирований, что приводит к большим финансовым затратам: работа оператора, освещение, кондиционирование помещения с культурами, эксплуатация инструментов и оборудования (Гиричев и др., 2012; Высоцкий, 2015). Стратегия среднесрочного *in vitro* хранения («Medium-term storage») укорененных

микрорастений позволяет снизить эти затраты (Гавриленко и др., 2007; Гиричев и др., 2012; Высоцкий, 2015б; Reed, 1990, 2004, 2013; Дунаева и др., 2011, 2012).

Замедленный рост микрорастений обеспечивается пониженной положительной температурой. В частности, для ягодных и плодовых культур умеренного климата 4°C (Reed, 1999; Дунаева, Гавриленко, 2007). Рекомендуются также дополнительные приемы, в частности, введение в питательную среду маннита, абсцизовой кислоты и уменьшение количества сахарозы (Grount, 1995; Reed, 1999).

Стратегия сохранения генетического разнообразия растений в генетических банках включает полевые коллекции и дублирующие наиболее ценный растительный материал *in vitro* и криоколлекции (FAO, 1998, 2014; Дунаева, Гавриленко, 2007; Дунаева и др., 2012). Преимущества и недостатки этих коллекций представлены в таблице 1.

Коллекции *in vitro* играют важную роль в сохранении образцов во всем мире (Reed, 1990). Особая компактность «пробирочных» коллекций удобна для обмена материалом между разными лабораториями и генбанками (FAO, 2014). При этом обеспечивается надежная сохранность генотипа от возможных патогенов и действия экстремальных факторов среды (Высоцкий, 1989; Гавриленко и др., 2007; FAO, 2014). Однако стоимость *in vitro* коллекций остается высокой, поэтому в состав коллекции включают только самые ценные генотипы. Так, самая крупная *in vitro* коллекция образцов малины и ежевики – в генбанке США, она насчитывает 250 образцов (Jenderek, Reed, 2017). Коллекция *in vitro* малин и ежевик ВИР – около 180 образцов. *In vitro* коллекции представителей рода *Rubus* также сохраняются в ГБС (Молканова, 2017а, б), Мичуринске (Соловых, 2013) и ВСТИСП (Высоцкий, 2015а). Крупные коллекции *in vitro* образцов картофеля поддерживаются в нескольких мировых генбанках: в США – NCGRP (Bamberg et al., 2016), в Германии – IPK (Keller et al., 2016), в Перу – CIP (Vollmer et al., 2017), а также в России – ВНИИКХ (132 сора в коллекции *in vitro* БЗСК, Овэс и др., 2016), ВИР – около 400 образцов. Однако для более надежного сохранения образцов необходима дублетная базовая криоколлекция.

В полной мере это относится и к сохранению разнообразия представителей родов *Rubus* и *Solanum* в коллекции *in vitro* ВИР. Отметим, что *in vitro* коллекция малины и ежевики ВИР, включающая сорта малины российской селекции, недостаточно изучена по способности к эффективному клональному микроразмножению. Поэтому одной из задач настоящей работы был подбор питательных сред для эффективного микроразмножения *in vitro* растений малины и ежевики в соответствии со схемой, разработанной для поддержания образцов рода *Rubus* в генбанке США (Reed, 1990). Эффективное клональное микроразмножение образцов позволит получить в кратчайшие сроки достаточное количество исходных микрорастения – источников эксплантов для криоконсервации.

Таблица 1 – Способы сохранения генетического разнообразия вегетативно размножаемых растений – преимущества и недостатки (из: Гавриленко и др., 2007)

Способ	Преимущества	Недостатки
Естественные условия – полевые коллекции	1. Возможность изучения коллекций и возможность использования генофонда в селекционных и генетических программах.	1. Высокая вероятность потери образцов в результате накопления фитопатогенов, воздействия стрессовых факторов, урбанизации. 2. Требуют больших площадей. Высокая стоимость поддержания полевых коллекций; достаточно трудоемкие методы.
Хранение <i>in vitro</i>	1. Изоляция от патогенов и стрессовых факторов среды. 2. Компактность коллекции. 3. Освобождение от инфекций и оздоровление. 4. Удобная форма обмена 5. Возможность массового и ускоренного размножения независимо от времени года. 6. Коллекции сохраняются в контролируемых условиях среды.	1. Относительно ограниченные сроки беспересадочного хранения. 2. Необходимо достаточно дорогостоящее оборудование. 3. Не исключена возможность генетических изменений при длительном хранении (необходимы дополнительные исследования). 4. Риск утраты образцов в результате инфекции достаточно высок.
Криохраниение	1. Изоляция от патогенов и стрессовых факторов среды. 2. Компактность коллекции 3. Теоретически неограниченно долгий период хранения. 4. Теоретически минимальный уровень генетических изменений (необходимы дополнительные исследования). 5. Коллекции поддерживаются в контролируемых условиях среды. Низкая стоимость хранения образцов при сверхнизких температурах.	1. Узкий круг культур, для которых разработаны методы надежного криохраниения. 2. Необходимо достаточно дорогостоящее оборудование. 3. Риск потери образцов в результате нарушения условий хранения достаточно высок. 4. Высокая стоимость закладки образцов на криогенное хранение.

1.2.2. Методы криоконсервации растений

Криоконсервация растений представляет собой процесс подготовки клеток, органов и тканей к долгосрочному хранению в жидком азоте при -196°C (Reed, 2008) или в его парах при $-183 \dots -185^{\circ}\text{C}$ (Вержук и др., 2009), но не выше $\sim -135^{\circ}\text{C}$ (Kaczmarczyk et al., 2012; Martinez-Montero, Harding, 2015), таким образом, что жизнеспособность и регенерационная способность эксплантов сохраняется после замораживания-оттаивания (Reed, 2008; Kaczmarczyk et al., 2012; Engelman, 2014).

Для оценки эффективности криоконсервации эксплантов наиболее часто применяют понятия:

– «жизнеспособность» (viability rates) или «выживаемость» (survival) (Kaczmarczyk et al., 2008; Panta et al., 2014);

– «регенерационная способность после оттаивания» (regeneration percentages) (Kaczmarczyk et al., 2008) или «способность к посткриогенной регенерации побегов» (post-thawed recovery, recovery after cryopreservation) (Высоцкая, Попов, 2005; Towill, Ellis, 2008; Panta et al., 2014); либо «фактическое возобновление проростков» (actual regrowth of plantlets) (Keller et al., 2008).

В ряде работ приведены данные только об уровне жизнеспособности криосохраняемых эксплантов, в других работ приводят оба показателя. Так, например, для оценки эффективности криоконсервации черенков некоторые авторы применяют только термин «жизнеспособность» (Вержук и др., 2011; 2015; 2016). При этом процент жизнеспособности черенка определяет «образование из почек зеленых листьев, а в нижней части черенка - корней» (Вержук и др., 2011). Следует отметить, что в англоязычной литературе употребляют термин «Recovery of the plant after cryopreservation» (Towill, Ellis, 2008), который подразумевает тот же показатель, который В.Г. Вержук с соавторами называют «жизнеспособность», поскольку оценивают его по успешности прививки, либо введением в культуру апексов, либо укоренением черенков.

Наиболее часто параллельно используются оба показателя для одних и тех же объектов в одних и тех же работах (Reed, 2008; Kaczmarczyk et al., 2008, 2011). Все авторы отмечают положительную корреляцию между показателями жизнеспособности и регенерационной способности эксплантов после оттаивания (Kaczmarczyk et al., 2008; Panta et al., 2014). Однако, несмотря на положительную корреляцию, подсчет только жизнеспособных эксплантов может сильно завышать результаты криоконсервации (Panta et al., 2014). Данный вопрос требует более детального изучения, поскольку ряд литературных данных об эффективности экспериментов по криоконсервации содержит заведомо завышенные показатели, основываясь только на жизнеспособности. По нашему мнению, необходимо учитывать оба показателя, поскольку их комплекс более детально характеризует процесс возобновления роста после оттаивания. Кроме

того, по числу выживших эксплантов можно сразу судить о степени криповреждений, возникших при криоконсервации.

Криповреждения клеток при криоконсервации обусловлены в основном двумя факторами: во-первых, формированием и ростом внутриклеточных кристаллов льда при замораживании и, во-вторых, процессами рекристаллизации при последующем оттаивании (Steponkus, 1984; Sakai et al., 1990; Белоус, Грищенко, 1994; Benson, 2004; Попов, 1993, 2008).

Для успешного замораживания растительных органов и тканей содержание свободной воды в клетках должно быть снижено на 20-30% (Panis, Lambardi, 2005), поскольку при этом повышается вязкость цитозоля, которая препятствует образованию кристаллов льда, способных вызывать необратимые повреждения клеточных мембран (Steponkus, 1984; Sakai et al., 1990; Попов, 1993; Белоус, Грищенко, 1994). Для снижения содержания воды в клетках применяют два подхода: медленное и быстрое замораживание.

Многоэтапное программное замораживание, которое иначе называют медленным замораживанием (Reed, Lagerstedt, 1987), направлено на постепенное обезвоживание клеток при дегидратации путем медленного охлаждения материала со скоростью 0,2–0,3°C/мин до -40°C с последующим замораживанием в жидком азоте (Forsline et al., 1998; Reed, 2008; Benson, 2008). При таком постепенном охлаждении эксплантов в течение нескольких часов образуется межклеточный лёд, который вытесняет внутриклеточную воду за пределы клетки; в результате происходит дегидратация растительной ткани.

Метод медленного (пошагового) охлаждения (замораживания) был разработан первым и до сих пор используется при криоконсервации спящих почек древесных культур (сливы, яблони) (Forsline et al., 1998; Towill et al., 2004). Ранее данный метод применялся также для криоконсервации почек микрорастений (Reed, Lagerstedt, 1987; Reed, 1988), однако из-за низкого уровня регенерации после оттаивания в последние десятилетия стали применять методы быстрого замораживания (Gupta, Reed, 2006; Reed, 2008).

Методы быстрого замораживания подразумевают прямое погружение материала в жидкий азот, без предварительного охлаждения. Они более просты, хорошо воспроизводятся, позволяют эффективно сохранять образцы разных видов, представленных древесными и травянистыми, тропическими и арктическими растениями, в виде различных типов эксплантов (почек, меристем, эмбрионов, пыльцы, каллусов и клеток) (Reed, 2008; Feng et al., 2013; Wang et al., 2014). Большинство методов быстрого замораживания основано на явлении витрификации, при которой внутриклеточная вода во время замораживания переходит в стекловидную (витрифицированную) фазу, минуя процесс кристаллизации, и клеточные органеллы остаются неповрежденными. Это достигается использованием специальных веществ - криопротекторов (Sakai et al., 1990; Белоус, Грищенко, 1994).

Выделено три группы криопротекторов по проникающей способности и функциям (Sakai et al., 1990, 2008; Белоус, Грищенко, 1994; Benson, 2008):

1) Непроницающие через клеточную стенку (ПЭГ₆₀₀₀, ПВП, полисахариды и белки) – создают защиту от механических повреждений, поскольку концентрируются в межклеточном пространстве и снижают скорость роста кристаллов льда;

2) Проникающие только через клеточную стенку (олигосахариды, пролин, ПЭГ₁₀₀₀) – предотвращают повреждения мембраны растущими кристаллами льда и защищают цитоплазму от излишней дегидратации;

3) Проникающие через клеточную стенку и мембрану клетки (ДМСО, глицерол, этиленгликоль) - оказывают влияние на точку заморозания цитозоля, выравнивают осмотическое давление и таким образом оказывают стабилизирующее действие на клетки (Sakai et al., 1990; Белоус, Грищенко, 1994; Benson, 2008).

Для эффективной защиты от криповреждений рекомендуют использовать смесь криопротекторов разных типов. Наиболее часто применяют раствор PVS2, в состав которого входит несколько криопротекторов (30% глицерола, 15% ДМСО, 15% этиленгликоля, 0,4 М сахараза), а также микро- и макроэлементы по МС (Sakai et al., 1990). Концентрация и длительность обработки криопротекторами должна определяться очень тщательно, чтобы сохранить жизнеспособность клеток (Arakawa et al., 1990; Sakai et al., 1990; Nishizawa et al., 1993; Panis et al., 2005).

Основные этапы криоконсервации являются общими для любых методов. Первый этап – это подготовка растительного материала, второй - изоляция эксплантов. Третий этап – обработка криопротекторами, четвертый – замораживание в жидком азоте (криохранение), пятый – оттаивание и шестой - учет регенерационной способности.

К методам быстрого замораживания относятся инкапсуляция-дегидратация (EnDe), витрификация (Vi), инкапсуляция-витрификация (EnVi), дроplet-метод (Dr), дроplet-витрификация (DrVi).

Метод **инкапсуляции-дегидратации** включает инкапсуляцию эксплантов микрорастений в шариках альгината натрия, с последующим высушиванием в потоке стерильного воздуха ламинара и погружением в жидкий азот. Данный метод, в основном, применяют для криоконсервации апексов микрорастений плодовых культур (Dereuddre et al., 1990; Wang et al., 2005; Gupta, Reed, 2006). Известны единичные примеры использования данного метода и для криоконсервации апексов картофеля (Fabre, Dereuddre, 1990).

Метод витрификации заключается в обработке эксплантов перед быстрым погружением в жидкий азот витрифицирующими растворами PVS2 (Sakai et al., 1990) и PVS3 (50% глицерола и 50% сахаразы, Nishizawa et al., 1993). Наиболее часто применяют раствор PVS2, содержащий

смесь криопротекторов ДМСО, глицерола, этиленгликоля, сахарозы) (Sakai et al., 1990; Golmirzaie, Panta, 1997). Метод получил широкое распространение для разных культур, поскольку он проще в исполнении, чем более ранние методы криоконсервации. В ведущем генбанке картофеля СР (Перу) на основе метода витрификации с 1995 по 2000 года были криоконсервированы 197 генотипов картофеля со средним уровнем регенерации 46% (Golmirzaie, Panta, 2000). Однако, у 15% образцов картофеля из коллекции СР так и не удалось получить регенеранты, а у 30% образцов регенерировало менее 15% эксплантов.

В настоящее время наиболее широко используют различные комбинации метода витрификации с другими методиками. Так, например, **инкапсуляция-витрификация** (Tannoury et al., 1991) представляет собой комбинацию методов инкапсуляции-дегидратации и витрификации. Как и в случае метода инкапсуляции, апексы или каллусы микрорастений сначала инкапсулируют в альгинатные шарики, после чего инкапсулированный материал инкубируют в витрифицирующем растворе для дегидратации и витрификации. Данный способ более результативный и быстрый, чем инкапсуляция-дегидратация (Hirai, Sakai, 1999, 2000; Wang et al., 2005). Такие выводы были сделаны при криоконсервации образцов картофеля (Hirai, Sakai 1999, 2000) и малины (Wang et al., 2005).

Дроplet-метод (дроplet-замораживание) был разработан в 1993 году в генбанке ИРК (Германия) для криоконсервации апексов картофеля (Schäfer-Menuhr et al., 1994). Термин «дроplet» отражает специфику данного метода: в капли криопротектора (10% ДМСО), нанесенные на полоски алюминиевой фольги, помещают экспланты на 12-часовую инкубацию. После этого полоски фольги с эксплантами быстро замораживают в жидком азоте. Данный прием облегчает быстрое погружение эксплантов в жидкий азот и извлечение из него. С помощью данного метода в ИРК созданы криоколлекции картофеля (1428 сортов) со средним уровнем регенерации после оттаивания 58% (Kaczmarczyk et al., 2008, 2011).

Дроplet-витрификация является комбинацией методов дроplet-замораживания и витрификации (рис. 1). Данная технология была разработана В. Panis с коллегами в 2005 году для криоконсервации коллекции банана, в том же году она была успешно применена для картофеля (Halmagyi et al., 2005). Дроplet-витрификация включает все этапы дроplet-метода, отличаясь от него использованием раствора PVS2, содержащим более высокое количество ДМСО (15%) и дополнительные криопротекторы (см. выше), а также существенно более короткой продолжительностью инкубации эксплантов в этом растворе (30 минут вместо 12 часов).

На сегодняшний день данный метод зарекомендовал себя наиболее простым в исполнении и наиболее надежным способом криоконсервации, обеспечивающим стабильно высокий процент регенерирующих эксплантов после оттаивания.

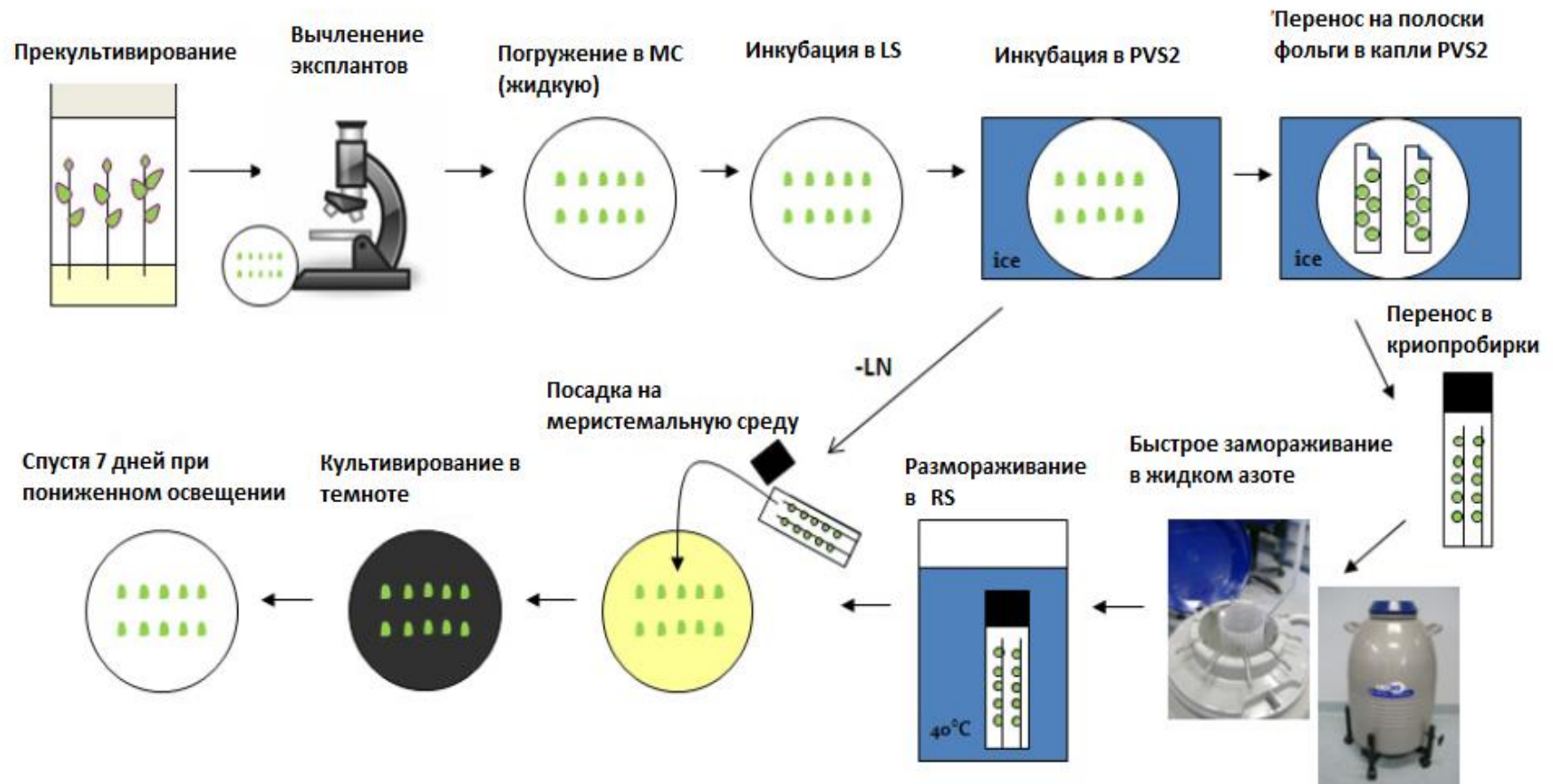


Рисунок 1 – Основные этапы метода дроплет-витрификации при криоконсервации апексов побегов микрорастений и их криохранении (из: Kaczmarczyk et al., 2012).

В настоящее время данный метод получил широкое распространение и успешно используется для криоконсервации самых разных объектов, включая как травянистые, так и древесные растения, относящиеся к разным ботаническим семействам, включая тропические виды и растения умеренной зоны: банан (Panis et al., 2005, 2009, 2016), таро (Sant et al., 2008), ананас (Souza et al., 2016), лук и чеснок (Kim et al., 2006, 2009, 2012a,б), пеларгония (Gallard et al., 2008), зверобой (Coste et al., 2012), картофель (Panta et al., 2015), роза (Halmagyi, Pinker, 2006; Pawlowska, Szewczyk-Taranek, 2013; LeBras et al., 2014), тополь (Tsvetkov et al., 2009), секвойя (Ozudogru et al., 2011), яблоня (Condello et al., 2011a).

С использованием метода капель-витрификации созданы криоколлекции многочисленных образцов следующих культур: банана в Бельгии (Panis et al., 2005, 2009), лука и чеснока в Южной Корее (Kim et al., 2006, 2009, 2012a), картофеля в Перу (Panta et al., 2015; Vollmer et al., 2016, 2017), США (Bamberg et al., 2016) и России (Shvachko, Gavrilenko, 2011). Кроме того, известны публикации об успешной криоконсервации единичных образцов малины (Nukari et al., 2009; Condello et al., 2011б) и ежевики (Vujović et al., 2011).

Самая новая методика криоконсервации называется Cryo-plate (Yamamoto et al., 2011), и сочетает в себе приемы инкапсуляция-дегидратации и капель-витрификации. В этом методе верхушки побегов прикрепляют тонким слоем альгината кальция к алюминиевой криопластине, обрабатывают растворами LS и PVS, а затем замораживают путем непосредственного погружения крио-пластин в жидкий азот (Yamamoto et al., 2011, 2012).

Последние два метода криоконсервации (капель-витрификации и Cryo-plate) имеют общее преимущество: более быстрое замораживание и оттаивание по сравнению с другими методиками на основе витрификации: образцы помещают на алюминиевую фольгу или криопластины (с очень высокой теплопроводностью), которые находятся в прямом контакте с жидким азотом при охлаждении и с размораживающим раствором (RS) при оттаивании (Engelmann, 2014).

Методики криоконсервации продолжают совершенствоваться в направлениях упрощения исполнения и повышения результативности показателей посткриогенного восстановления меристем. Основными показателями эффективности той или иной методики криоконсервации являются проценты жизнеспособных и регенерирующих после оттаивания эксплантов.

Регламенты и стандарты для формирования криоколлекций. Генбанки должны поддерживать очень разнообразные коллекции и не могут сосредотачиваться только на хорошо изученных модельных организмах (Dussert et al., 2003; Keller et al., 2011; Volk et al., 2016). В криоколлекции приходится иногда включать ценные (уникальные, редкие) образцы с низким уровнем регенерации после оттаивания. Международная организация по сохранению биоразнообразия (IPGRI) 20 лет назад рекомендовала криобанкам пополнять криоколлекции

образцами, проявляющими как минимум 20% регенерации после оттаивания (IPGRI, 2000). Вопросы стандартизации методики закладки образцов на длительное хранение в криобанк при сверхнизких температурах для гарантированного сохранения регенерационной способности эксплантов образцов разных культур активно обсуждаются (Dussert et al., 2003; Volk et al., 2016).

В 2003 (Dussert et al., 2003) была опубликована статья в журнале «Cryoletters», в которой приведены статистические расчеты минимального необходимого уровня регенерации побегов после оттаивания для обеспечения безопасности хранения криоконсервированных эксплантов, которые могут служить моделью при создании других криоколлекций. Dussert с соавторами рассчитали взаимосвязь между количеством сохраняемых эксплантов и величиной минимальной необходимой частоты регенерации и показали, что эта частота должна составлять 39% от общего количества всех криоконсервированных эксплантов (Dussert et al., 2003). В этом случае вероятность получения минимум одного регенеранта из каждой криопробирки составляет 0,95.

Более детально подобные расчеты приведены в работе Volk et al. (2016). В этой работе показано, что при сохранении в каждой криопробирке по 10 эксплантов, из одной пробирки регенерирует как минимум один эксплант с вероятностью 95% при условии исходной частоты регенерации не менее 35%. Авторы (Volk et al., 2016) приводят следующий пример: для получения 50 жизнеспособных эксплантов (с вероятностью 0,95) требуется заложить в крио минимум 120, 150, 210 или 310 эксплантов, в зависимости от частоты их регенерации: 50, 40, 30 и 20%, соответственно (Volk et al., 2016).

Например, следуя этим расчетам, в генбанке ИРК сохраняют *in cryo* по 200 эксплантов каждого образца. Эту выборку разделяют на две части – образец и безопасный дублет – по 100 эксплантов в каждой. Дополнительно 100 эксплантов (2×50) используют для контроля уровня регенерации (Keller et al., 2011). Это позволяет обеспечить безопасное хранение всего материала, частота регенерации которого составляет не менее 10%. Для безопасного хранения растительного материала, частота регенерации которого 30%, *in cryo* закладывают по 100 эксплантов на образец, изучают уровень регенерации у 50 эксплантов (Keller et al., 2011).

По данным В. Panis с соавторами (2016), в Международном центре Bioversity International при криохранении коллекции образцов банана соблюдают два условия: проведение трех независимых повторностей для криоконсервации и для каждой «успешной» повторности руководствуются минимальным процентом регенерации 39% – для получения как минимум одного регенеранта из одной криопробирки при 95-ном уровне значимости, согласно работе Dussert et al. (2003).

В ведущем генбанке картофеля СР (Перу) криоконсервируют 150 эксплантов на образец, 30 из которых используют для изучения частоты регенерации после оттаивания. О необходимости проведения дополнительной криоконсервации судят в зависимости от результата первой повторности: если частота регенерации выше 30%, то вторую повторность не делают. Если частота регенерации составляет 20–30% – проводят вторую повторность, если ещё ниже 20% – для таких образцов подбирают более специфичный протокол (Vollmer et al., 2016, 2017).

Таким образом, разные генбанки применяют разные методики криоконсервации и разные подходы к логистике криохранения коллекций. Общим остается принцип статистических подсчетов: за их основу берут два параметра – уровень регенерации образца и допустимое число криосохраняемых эксплантов. Отметим, что в одном все генбанки едины: об эффективности посткриогенного восстановления эксплантов судят по уровню их регенерации, а не жизнеспособности. В базах данных, создаваемых нами в ВИРе, указан только уровень посткриогенной регенерации. Подчеркнем, что даже при корреляции двух названных показателей, которая отмечена многими авторами (Keller et al., 2011; Panis et al., 2005, 2016; Vollmer et al., 2016, 2017), приведение данных лишь о жизнеспособности эксплантов после оттаивания приводит к необоснованно завышенным показателям эффективности тех или иных условий криоконсервации. Существующая неоднозначность в минимальных количествах криосохраняемых эксплантов также представляет интерес для исследования и стандартизации методики применительно для криоколлекции апексов микрорастений в ВИРе.

1.2.2.1. Факторы, влияющие на показатели посткриогенной регенерации

Типы эксплантов, используемые для криоконсервации растений. В качестве эксплантов для криоконсервации используют как части *in vivo*, так и *in vitro* растения. У полевых и тепличных растений криоконсервируют черенки, семена, спящие почки, пыльцу.

Криоконсервация спящих почек используется в основном для древесных плодовых культур умеренного климата, в частности, яблони (Forsline et al., 1998; Towill et al., 2004; Volk et al., 2008; Lambardi et al., 2009; Hofer, 2015). Однако для древесных тропических культур данный метод не подходит.

В то же время, криоконсервация спящих зимующих почек предполагает два варианта посткриогенного восстановления: либо проведение прививки (окулировки) размороженной почки, либо введение её в культуру *in vitro*. Следует отметить, что методы прививки адаптированы не для всех культур, в основном – для древесных. При оттаивании спящих почек и введении их в культуру *in vitro* наблюдается большой выпад материала в связи с высоким уровнем контаминации эксплантов (Towill, Ellis, 2008).

В системе *in vitro* в качестве эксплантов для криоконсервации изолируют почки, апексы и меристемы микрорастений, каллусы, клеточные суспензии, протопласты (Benson et al., 1996; IPGRI, 2000; Gonsales-Arno et al., 2014).

Криоконсервацию каллусов и клеточных суспензий, протопластов проводят в основном для сохранения коллекций биопродуцентов, например, женьшеня (Popov et al., 2006; Gonsales-Arno et al., 2014).

Криоконсервацию пыльцы не сложно проводить, поскольку нет необходимости в использовании криопротекторов, т.к. содержание свободной воды в пыльцевых зернах крайне мало. Препараты пыльцы могут быть возвращены из криобанков селекционерам (Ganeshan et al., 2008) даже в случае выпадения необходимого образца из *in vitro* или полевой коллекции. Однако подчеркнем, что при этом организм сохраняется в стадии гаметофита.

Наиболее распространенным типом экспланта для криоконсервации древесных культур умеренного климата являются почки *in vivo* и *in vitro* растений (Towill et al., 2004). Для травянистых культур, для растений разных климатических зон – почки, апексы микрорастений (Reed, Chang, 1997; Benson, 2004). Для криоконсервации используют как верхушечные (апикальные), так и пазушные (аксиллярные) почки микрорастений. Так, в оригинальном протоколе дроблет-витрификации (DV) в качестве эксплантов были использованы только верхушечные почки микрорастений банана размером 1 мм (Panis et al., 2005). Для криоконсервации единичных представителей рода *Rubus*, которая была выполнена рядом авторов при помощи метода дроблет-витрификации, использовали верхушечные экспланты микрорастений: меристемы размером 0,3-0,5 мм для сорта малины красной (*R. idaeus* L.) Latham (Condello et al., 2011b) и почки размером 1-2 мм в случае сорта ежевики (*R. fruticosus* L.) Šačanska Bestrna (Vujović et al., 2011). Для криоконсервации образцов картофеля Panta с коллегами (2014, 2015) брали верхушечные почки микрорастений размером 1,8-2,5 мм (включая конус нарастания и 4-5 примордиев). Другие авторы (Schäfer-Menuhr et al., 1994; Kaczmarczyk et al., 2008) использовали экспланты практически такого же размера (2-3 мм) для криоконсервации картофеля дроблет-методом. Экспланты представляли собой верхушки побега микрорастений картофеля (shoot tip), включающие верхушечную микропочку с частью стебля (Schäfer-Menuhr et al., 1994; Kaczmarczyk, 2008).

Ряд авторов сообщал об отсутствии достоверных различий в уровнях регенерации после оттаивания между указанными типами эксплантов (Hirai, Sakai, 1999; Lee et al., 2011; Ozudogru et al., 2011; Shvachko, Gavrilenko, 2011; Coste et al., 2012; Швачко, 2012). Другие авторы (Halmagyi et al., 2005; Yoon et al., 2006) отмечают наиболее высокую способность к регенерации верхушечных почек. Поскольку в большинстве работ использовано ограниченное число образцов, данный вопрос требует дополнительного изучения.

Список большинства криоколлекций, созданных в разных странах мира, в которых сохраняются не только культуры умеренного климата, но и образцы тропических видов растений, без указания методов и числа сохраняемых образцов, приведен в обзоре Gonzalez-Arnao с соавторами (2014). С 2014 года этот список пополнился и расширился.

Отметим, что технологии криохранения растений получили мощное развитие за последние 30-50 лет. Так, первые успешные опыты по криоконсервации были проведены в 1960 году Sakai для черенков тутовника с использованием метода медленного замораживания (Sakai, 1960). С тех пор технологии криоконсервации быстро развивались и в настоящее время широко используются для самых разных видов растений (Reed, 2008; Gonzalez-Arnao et al., 2008, 2014; Cruz-Cruz et al., 2013; Wang et al., 2014; Panta et al., 2015; Panis et al., 2016). Особо динамичное развитие методы криоконсервации получили в последние годы. Однако крупных представительных криоколлекций в мире не так много. Большинство исследований по криоконсервации выполнено пока на единичных культурах/ генотипах. Это, вероятно, связано с тем, что данные методы требуют комплекса отработанных технологий.

Как было сказано выше, для одних и тех же генотипов при криоконсервации **различными методами** были получены разные результаты. Например, в работе Н.А. Швачко (2012) показан более высокий уровень посткриогенной регенерации при использовании метода дроплет-витрификации по сравнению с дроплет-методом для одних и тех же генотипов картофеля (сорта *S. tuberosum* Дезире и клона образца *S. acaule*). Q. Wang с коллегами (2005) при криоконсервации микрорастений семи генотипов малины (*Rubus idaeus* L.) методом инкапсуляции-витрификации получили достоверно ($p \leq 0,05$) более высокие показатели жизнеспособности (85%) и регенерации (75%) криосохраняемых меристем, чем при использовании метода инкапсуляции-дегидратации (65 и 50%, соответственно) (Wang et al., 2005). При криоконсервации апексов трех других генотипов – образцов рода *Rubus* – с применением методов витрификации и инкапсуляции-дегидратации было получено в среднем 71% и 92% регенерации после оттаивания, соответственно, при этом два образца имели достоверно ($p \leq 0,05$) более высокие показатели посткриогенной регенерации при использовании метода инкапсуляции-дегидратации, а для одного генотипа различия были недостоверны (Gupta, Reed, 2006). Апексы микропобегов ежевики сорта Šačanska Bestrna криоконсервировали с использованием метода инкапсуляции-дегидратации и получили 16,7% регенерирующих эксплантов, а в случае метода дроплет-витрификации для того же генотипа удалось получить больше ($p \leq 0,05$) – 70% регенерирующих после оттаивания эксплантов (Vujović et al., 2011; Ružić, Vujović, 2012; Ružić et al., 2013). Противоречивые результаты, полученные разными авторами, не позволяют однозначно выбрать наиболее эффективный метод криоконсервации.

Различные способы предобработки исходных микрорастений – источников эксплантов также существенно влияют на эффективность регенерации после оттаивания. Так, рядом авторов было отмечено положительное влияние на регенерацию: холодового закаливания (Reed, 1993; Kaczmarczyk et al., 2008), добавления в питательную среду повышенной концентрации сахарозы (Panis et al., 2005; Nukari et al., 2011), витаминов E, C и антиоксидантов (липоевой кислоты, глутатиона, глицина, бетаина) (Uchendu et al., 2010a, б). Отметим, что для картофеля более ранние работы выполнены без этапа закаливания (Schäfer-Menuhr et al., 1994). Включение в протоколы этапа закаливания в разных лабораториях отличается различными температурными режимами и продолжительностью предобработки. В последнее время в некоторых работах также сообщается об эффективной посткриогенной регенерации эксплантов с использованием протоколов без холодового закаливания исходных микрорастений (Condello et al., 2011б; Vujović et al., 2011; Souza et al., 2016).

Кроме того, большое влияние на посткриогенную регенерацию оказывает **длительность обработки эксплантов криопротекторами** – витрифицирующими растворами PVS2 (Sakai et al., 1990) или PVS3 (Nishizava et al., 1993), причем PVS2 используется в большинстве работ. В зависимости от вида растения и размера экспланта необходима разная длительность обработки эксплантов раствором PVS2, которая сильно влияет на выживаемость после оттаивания (Sakai et al., 2008). Так, например, для меристем *in vitro* растений банана оптимальное время обработки раствором PVS2 при использовании метода капель-витрификации было 30-50 минут при 0°C (Panis et al., 2005). Для незакаленных пазушных почек растений яблони наиболее высокий уровень регенерации после оттаивания был получен после применения 60-минутной инкубации почек в растворе PVS2 (Condello et al., 2011a). Для апексов микропобегов розы обработка PVS2 больше 20 минут сильно повреждала ткани (Halmagyi, Pinker, 2006). Для апексов микропобегов картофеля, криоконсервированных методом капель-витрификации, выживаемость снижалась после 20 минут обработки раствором PVS2, по данным Kim с соавторами (2006). В то же время в более поздних публикациях других авторов сообщается об успешном применении метода капель-витрификации, включающем этап 50-минутной инкубации эксплантов картофеля в растворе PVS2 при 0°C (Panta et al., 2014; 2015). В случае эксплантов малины криоконсервация методом витрификации со стадией 20-минутной экспозиции в растворе PVS2 при комнатной температуре позволила получить до 71% выживших эксплантов (Gupta, Reed, 2006). Это значит, что при работе с любым новым объектом все этапы любого метода должны быть апробированы и при необходимости – оптимизированы.

Можно отметить также, что в разных лабораториях для образцов одних и тех же культур после криоконсервации использовали **питательные среды** с разным фитогормональным

составом (табл. 2). Так, например, в случае картофеля использовали среды с кинетином и ГК (Panta et al., 2015; Vollmer et al., 2016), либо с ИУК, зеатином-рибозидом и ГК в разных концентрациях (Kim et al., 2006, 2012b; Wang et al., 2014). Единого мнения об оптимальном составе экзогенных фитогормонов в среде для рекультивации, таким образом, нет. Однако при всех различиях в фитогормональном составе питательных сред на этапе подготовки исходных микрорастений и этапе посткриогенной регенерации в качестве базовой среды всегда используется состав Мурасиге и Скуга (1962). Состав и концентрации фитогормонов, применяемых для посткриогенной регенерации, представлены в таблице 2.

Как видно из данных таблицы 2, при криоконсервации, проведенной методом капель-витрификации для разных культур использовали разные состав и концентрации фитогормонов, вносимых путем холодной фильтрации в основную среду Мурасиге и Скуга. В отдельных случаях (Sant et al., 2008) фитогормоны в среду не добавляли.

Отметим, что при криоконсервации образцов малины другими методами (инкапсуляции-витрификации, витрификации) ранее применяли среду МС, дополненную либо 0,5 мг/л БАП+ 0,05 мг/л ИМК (Wang et al., 2005), либо 1 мг/л БАП (Gupta, Reed, 2006; Kovalchuk et al., 2010). В работах по криоконсервации образцов малины и ежевики ранее не использовали зеатин-рибозид, однако этот цитокинин успешно используется для микроразмножения ряда образцов *Rubus* (см. главу 1.2.1). Кроме того, зеатин-рибозид (0,2 мг/л) был применен для посткриогенной регенерации образцов хризантемы (Lee et al., 2011) и *Lomandra sonderi* (Menon et al., 2012). Отметим, что в протоколе криоконсервации картофеля в генбанке ИПК, основанном на использовании капель-метода, применяется питательная среда МСТо с добавлением зеатин-рибозида (МС+0,5 мг/л ИУК+0,5 мг/л зеатин-рибозид + 0,2 мг/л ГК) (Towil, 1983; Kaczmarczyk et al., 2008). Основываясь на этих данных, в нашей работе для посткриогенной регенерации малины и картофеля мы использовали среду с зеатином (0,5 мг/л, см. «материалы и методы»).

В отдельных работах отмечены существенные различия в уровнях посткриогенной регенерации образцов **близких видов**. Этот вопрос обсуждают R.Vollmer с соавторами (2016), которые показали, что 56%-ная частота регенерации образцов *S. tuberosum* ($2n=4x$) существенно превышала соответствующие показатели у представителей вида *S. stenotomum* ($2n=2x$). Однако такое сравнение, с нашей точки зрения, не совсем корректно, поскольку эти близкие культурные виды картофеля отличаются по уровню пloidности.

Поэтому мы проанализировали данные литературы об уровнях криорегенерации образцов родственных видов одного и того же уровня пloidности. Так, не выявлено существенных различий в показателях регенерации после оттаивания между образцами триплоидных культурных видов картофеля *S. chaucha* и *S. juzepczukii*, а также образцами диплоидных культурных видов *S. ajanhuiri*, *S. stenotomum* и *S. phureja* (Vollmer et al., 2016).

Таблица 2 – Состав и концентрация фитогормонов в питательных средах для посткриогенной регенерации при использовании методики капель-витрификации

Культура	Среда для регенерации	Ссылка
Картофель		
1533 образца	МС+0,04мг/л Кинетин +0,1 мг/л ГК	Panta et al., 2015; Vollmer et al., 2017
280 сортов	МС без гормонов	Bamberg et al., 2016
170 сортов	МС+0,5 мг/л ИУК+0,5 мг/л зеатин-рибозид + 0,2 мг/л ГК	Швачко, 2012
26 сортов	МС+0,5мг/л ГК	Hirai, 2011
1 сорт картофеля	МС+0,5 мг/л ИУК + 0,5 мг/л зеатин-рибозид + 0,2 мг/л ГК	Wang et al., 2014
12 образцов картофеля	МС+0,05 мг/л ИУК + 0,3 мг/л зеатин-рибозид + 0,05 мг/л ГК	Kim et al., 2006
Малина и ежевика:		
32 сорта малины	Не указан	Nukari et al., 2011
1 сорт малины	МС+ 0,5 мг/л БАП	Condello et al., 2011b
1 сорт ежевики	МС+ 1 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИМК+ 0,1 мг/л ГК	Vujović et al., 2011, 2015
Другие культуры:		
1536 образцов банана	МС+2,25 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИУК +	Panis et al., 2016; https://nieuws.kuleuven.be (20/06/2017)
1158 образцов чеснока <i>Allium spp</i>	МС+0,3 мг/л ИУК+ 2,0 мг/л 2-ip	Kim et al., 2007, 2012a
18 сортов таро (<i>Colocasia esculenta</i>)	МС без гормонов	Sant et al., 2008
1 образец <i>Lomandra sonderi</i>	1/2МС+1,0мМ Зеатин +0,5мМ ГК	Menon et al., 2012
1 сорт <i>Chrizantemum</i>	МС+0,15 мг/л ИУК+0,05 мг/л ГК +0,2 мг/л Зеатин	Lee et al., 2011
2 образца <i>Populus spp</i>	МС+1,5мМ БАП + 0,5 мМ ГК	Tsvetkov et al., 2009
8 сортов пеларгонии <i>Pelargonium</i>	МС+0,1 мг/л БАП+0,01мг/л ГК	Gallard et al., 2008
3 сорта <i>Rosa</i>	МС+0,25 мг/л БАП+0,5 мг/л ГК	Halmagyi, Pinker, 2006
1 сорт <i>Rosa chinensis</i>	МС+4,44 мМ БАП+ 0,24 мМ ГК+0,54 мМ НУК	LeBras et al., 2014
<i>Rosa canina, R. rubiginosa</i>	МС+5Мм БАП	Pawlowska, Szewczyk-Taranek, 2013
2 образца <i>Hipericum spp</i>	МС+0,85 мМ БАП +0,27 мМ НУК	Coste et al., 2012
2 сорта и 2 клона яблони	МС+4,5мМ БАП + 0,5мМ ИМК+ 0,5 мМ ГК	Condello et al., 2011a
3 сорта земляники	МС+1мг/л БАП+0,01 мг/л ИМК	Pinker et al., 2009
4 сорта тимьяна (<i>Thymus moroderi</i>)	МС+0,275 мМ БАП +0,25 мМ ИМК	Marco-Medina et al., 2010

Сходные результаты были получены и для других объектов. Так, при криоконсервации образцов триплоидных видов банана не были выявлены статистически достоверные различия между ними по регенерационной способности после оттаивания, хотя они отличались геномным составом (AAA, AAB, ABB) (Panis et al., 2005). Также не было выявлено различий в процентах регенерировавших почек у образцов разных диплоидных видов вязов (*Ulmus*) и у их гибридов (Harvengt et al., 2004).

По данным Folgado с соавторами (2013, 2014, 2015), эффекты разных типов предобработки (холодового закаливания, культивирования на средах с повышенной концентрацией сахаров) на регенерацию также зависят от видовых и генотипических различий. Так, уровень посткриогенной регенерации повышается после обоих вариантов предобработки у образцов *S. commersonii* и у образцов *S. juzepczukii*. В случае образцов *S. tuberosum* предобработка сахарозой повышает уровень регенерации, холодовая – снижает (Folgado et al., 2015). В то же время в более ранних исследованиях показано, что оба типа воздействий недостоверно повышали уровень регенерации того же образца *S. tuberosum* (Folgado et al., 2013, 2014). Экспланты образца *S. ajanhuiri* не регенерировали при любом типе предобработки, и крайне низкая частота криорегенерации (1%) отмечена в варианте без обработки (Folgado et al., 2015).

В ряде работ на разных объектах отмечены существенные различия в частотах выживаемости и регенерации после замораживания-оттаивания между генотипами, представленными растениями одного вида и близких видов разного **уровня плоидности** (Bouafia et al., 1996; Venson et al., 1996; Волкова и др., 2015; Vollmer et al., 2016). Однако полученные результаты не дают однозначного ответа о различиях в регенерации ди- и полиплоидных форм. Так, в ряде работ, выполненных на представителях разных таксонов, показан достоверно более низкий уровень регенерации у полиплоидов по сравнению с образцами низкого уровня плоидности у того же самого вида (Venson et al., 1996; Bouafia et al., 1996; Волкова и др., 2015). Например, в опытах по криоконсервации гетероплоидных каллусов люцерны, размороженных после 27 лет хранения в жидком азоте, погибли в основном полиплоидные клетки; криорегенеранты были получены из диплоидных клеток (эу- и анеуплоидных, $2n=2x\pm$); авторы полагают что причиной гибели преимущественно полиплоидных клеток является осмотический стресс (Волкова и др., 2015). У единичных образцов тетраплоидного вида картофеля *S. acaule* частота регенерации после замораживания-оттаивания была достоверно выше, чем у образцов с более высоким уровнем плоидности - гексаплоидного вида *S. iopetalum* (Venson et al., 1996). Уровни регенерации единичных образцов близкородственных культурных диплоидных и тетраплоидных видов картофеля (*S. phureja* и *S. tuberosum*, соответственно) существенно отличались: тетраплоиды имели более низкие

показатели регенерационной способности после оттаивания по сравнению с диплоидами (Bouafia et al., 1996). В работах R. Vollmer с соавторами (2016, 2017) получен противоположный результат. Изучив обширную выборку образцов двух близкородственных культурных видов картофеля, авторы сделали вывод о том, что уровень регенерации после замораживания-оттаивания у образцов тетраплоидного вида *S. tuberosum* был достоверно выше, чем у образцов диплоидного вида *S. stenotomum*.

Другие авторы, изучавшие тот же вопрос, не выявили существенных различий по уровню посткриогенной регенерации между растениями разных уровней ploидности (Benson et al., 1996; Panis et al., 2005; Vollmer et al., 2016). В работе по криоконсервации образцов ди- и триплоидных А-геномных видов банана не обнаружено достоверных различий в регенерационной способности (Panis et al., 2005). В работе Benson et al. (1996) не отмечено достоверных различий в показателях регенерации после оттаивания между образцами близкородственных видов *S. phureja* ($2n=2x$) и *S. tuberosum* ($2n=4x$). Также не были выявлены существенные различия между образцами диплоидного вида *S. ajanhuiri* и близкого по происхождению триплоидного вида *S. juzepczukii* (44,9 и 50,8%, соответственно), и между образцами трех близкородственных видов иного происхождения: диплоидного *S. phureja* (50,3%), триплоидного *S. chaucha* (53,1%) и тетраплоидного *S. tuberosum* subsp. *andigenum* (57,2%) (Vollmer et al., 2016).

Таким образом, вопрос о влиянии на показатели выживаемости и регенерации после замораживания-оттаивания уровня ploидности или видовых особенностей растений остается открытым. Отметим, что в перечисленных выше работах не объясняются причины возможных различий в криорезистентности диплоидных и полиплоидных растений (клеток). В этой связи процитируем результаты работы Н.И. Ненько с соавторами (2015), в которой проведены физиолого-биохимические и анатомо-морфологические исследования листового аппарата диплоидных и триплоидных сортов яблони в жаркие и засушливые летние сезоны. Авторы отмечают, что у триплоидных сортов яблони выявлено повышенное содержание связанной формы воды, пролина, катионов калия по сравнению с диплоидными. Биометрические параметры (толщина листовой пластинки, кутикулы и верхнего эпидермиса) у триплоидных сортов яблони также имели существенно более высокие значения соответствующих показателей по сравнению с диплоидными сортами. По мнению авторов, комплекс этих параметров и обеспечивает триплоидным сортам яблони большую экологическую пластичность по сравнению с диплоидными (Ненько и др., 2015). Возможно, что с этими факторами могут быть связаны и различия в криорезистентности полиплоидных и диплоидных растений (клеток) в экспериментах по криоконсервации. Кроме того, возможно, полиплоидные образцы имеют более высокие дозы генетических факторов (аллелей, QTLs), контролирующей устойчивость к

стрессам (холоду и замораживанию). В любом случае, этот вопрос требует дополнительного изучения.

Не исключено, что образцы, **различного эколого-географического происхождения**, адаптированные к действию различных абиотических стрессоров, могут отличаться по криорезистентности, на что указывают результаты Vollmer et al. (2017). В то же время более ранние результаты тех же авторов (Panta et al., 2015; Vollmer et al., 2016) не выявили достоверных различий в посткриогенной регенерации между группами образцов, собранных в высокогорных областях и в прибрежных районах.

При исследовании единичных образцов тетраплоидных видов *S. acaule* и *S. tuberosum* (сорт Дезире) была отмечена более высокая регенерационная способность после оттаивания у образцов вида *S. acaule* (Kaczmarczyk et al., 2008). При этом, вероятно, определенную роль играет различная степень устойчивости к стрессам и разное эколого-географическое происхождение у сравниваемых образцов. Так, образцы вида *S. acaule* встречаются в высокогорных областях и характеризуются повышенной холодостойкостью, могут переносить кратковременные заморозки, тогда как изученные образцы *S. tuberosum* чувствительны к пониженным температурам.

В ряде работ установлена зависимость способности к посткриогенному восстановлению от генотипических отличий – изучены выборки образцов одного вида, одного и того же уровня пloidности и общего эколого-географического происхождения (Kaczmarczyk et al., 2008; Gonsales-Arno, 2014; Niino, Valle-Arizaga, 2015; Bamberg et al., 2016).

Вероятно, генотипические отличия связаны с физиологическими и биохимическими особенностями исходных микрорастений. Исследование содержания растворимых сахаров в исходных эксплантах микрорастений показало, что у образцов дикорастущих видов *S. acaule* и *S. demissum* концентрация глюкозы, сахарозы и фруктозы была выше, чем у сортов культурного вида *S. tuberosum* ‘Desiree’, ‘King Edward’ (Kaczmarczyk, 2008; Kaczmarczyk et al., 2008). Результаты биохимических исследований растений *S. commersonii* показали, что при холодовом закаливании происходило накопление растворимых сахаров, особенно сахарозы и рафинозных олигосахаридов, которые могут обуславливать криотолерантность (Folgaldo et al., 2015).

В последние годы появились работы по изучению генома, протеома, метаболома исходных растений и посткриогенных регенерантов (Folgado et al., 2015). Однако полной информации о процессах, протекающих в клетках растений при криоконсервации, пока не получено. Отмечена изменчивость трех групп белков в ответ на холодовую предобработку исходных микрорастений: белки углеводного обмена (метаболизма), стрессовые белки, белки окислительного гомеостаза (Kaczmarczyk, 2008; Folgaldo et al., 2013, 2015). В отличие от других исследованных образцов *S. tuberosum*, у изученного образца дикорастущего вида *S. commersonii*

отмечены повышенные криотолерантность и способность к холодной акклиматизации, что, вероятно, связано с повышенным содержанием белков окислительного гомеостаза и сахаров (Folgaldo et al., 2015). Подавляющее большинство работ выполнено на единичных образцах, поэтому однозначных выводов о влиянии видовых различий, уровня ploидности сделать нельзя; эти вопросы требуют включения в исследования обширных выборок образцов.

1.2.2.2. Криоколлекции представителей рода *Rubus* (малины и ежевики)

Работы по криоконсервации образцов малины и ежевики были начаты почти 30 лет назад (Reed, Lagersted, 1987; Reed, 1998; Chang, Reed, 1999; Высоцкая и др., 1999), однако в эти исследования вовлекались лишь единичные образцы. До сих пор представительных коллекций образцов малины совсем мало. В большинстве стран работы по криоконсервации образцов малины и ежевики только начинаются (табл. 3).

Криоколлекции сортов малин и ежевик не многочисленны и большинство из них пока включает сравнительно небольшое число образцов, которые были криоконсервированы с использованием различных методик. При этом очевидно, что универсального метода криоконсервации образцов малин и ежевик пока не существует, однако при создании представительных криоколлекций в основном использованы модификации метода витрификации.

Известны работы по криоконсервации образцов рода *Rubus* с использованием методов медленного замораживания (Reed, 1987; Высоцкая, Попов, 2005), инкапсуляции-дегидратации (Wang et al., 2005; Gupta, Reed, 2006), витрификации (Kovalchuk et al., 2014). Самая крупная и представительная криоколлекция образцов рода *Rubus* сохраняется в NLGRP (National Laboratory for Genetic Resources Preservation, Форт Колинс, США, она включает свыше 209 образцов 39 видов рода *Rubus*, криоконсервированных в разные годы методами медленного замораживания, витрификации и дроplet-витрификации. Отметим, что в последнее время плановое пополнение этой криоколлекции США проводят методом дроplet-витрификации (Jenderek, Reed, 2017).

Метод дроplet-витрификации (DV), разработанный В. Panis и коллегами (2005), с различными модификациями все активнее используется для криоконсервации образцов малины и ежевики. До недавнего времени метод DV был использован для небольшого числа образцов представителей рода *Rubus*.

Таблица 3 – Кривоколлекции представителей рода *Rubus*, созданные на основе криоконсервации апексов микрорастений

Страна, организация	Число сохраняемых образцов <i>in cryo</i>	Информация об образцах	Метод криоконсервации	Средний процент посткриогенной регенерации (min-max)	Ссылка
Кривоколлекции:					
США/ NCGRP, NCGR	57	н/д	н/д	н/д	Niino, Valle Arizaga, 2015
	173	Образцы разных видов и гибриды <i>Rubus</i>	ED, Vi	60,0-100,0	Reed, DeNoma, 2012
США/ NLGRP	209	сорта и гибриды <i>Rubus</i>	DV	н/д	Jenderek, Reed, 2017
Казахстан / IPBB	31	н/д	ED, Vi	н/д	Kovalchuk et al., 2014
	11	8 сортов, 3 селекционных клона малины	Vi	20,0-81,0	Kovalchuk et al., 2010
Финляндия / МТТ ARF	32	н/д	DV	н/д	Nukari et al., 2011
Россия/ ВИР	13	Сорта малины	DV	24,2-89,3	Ukhatova et al., 2017
	3	Сорта ежевики	DV	20,0-67,5	
Начаты эксперименты по криоконсервации:					
Финляндия / МТТ ARF	7	4 сорта малины, 3 гибрида	EV	50,0-85,0	Wang et al., 2005
Индия / NBPGR	5	гибриды <i>Rubus</i>	ED	13,0-80,0	Anonymous, 2015
Россия/ ИФР	2	Сорта малины	SF	25,0-77,0	Высоцкая, Попов, 2005
Финляндия / МТТ ARF	1	1 клон малины	ED	50	Wang et al., 2005
Сербия / FRI	1	Сорт малины	DV	18	Condello et al., 20116
Сербия / FRI	1	Сорт ежевики	ED	16,7	Ružić et al., 2013
Сербия / FRI	1	Сорт ежевики	DV	70	Vujović et al., 2011, 2015

Методы криоконсервации: ED – инкапсуляция-дегидратация, Vi – витрификация, EV – инкапсуляция-витрификация, DV – дроблет-витрификация, SF – медленное замораживание, н/д – нет данных.

Gene banks: IPBB - Institute of Plant Biology and Biotechnology at National Center of Biotechnology, Казахстан; МТТ ARF – МТТ Agrifood Research Finland, Plant Production Research, Финляндия; NCGR - National Clonal Germplasm Repository, США; NCGRP- National Center for Genetic Resources Preservation, США; NLGRP – National Laboratory for Genetic Resources Preservation, США; NBPGR - National Bureau of Plant Genetic Resources, Индия; ИФР – Институт физиологии растений Россия; FRI - Fruit Research Institute, Сербия.

Оригинальный протокол В. Panis был модифицирован с целью его адаптации для образцов малины (Condello et al., 20116; Nukari et al., 2011) и ежевики (Ružić et al., 2013; Vujović et al., 2011, 2015). Так, например, E. Condello с соавторами (20116) использовали иной состав

сред для выращивания исходных микрорастений и посткриогенных регенерантов; А. Nukari с коллегами (2011) применяли иной способ погружения эксплантов в жидкий азот; Т. Vujović с сотрудниками изменили состав витрифицирующего раствора. В нашей работе будут предложены также некоторые модификации протокола капель-витрификации, более детально это вопрос раскрыт в разделе «результаты и обсуждение».

1.2.2.3. Криоколлекции культурных видов картофеля

Эксперименты по криоконсервации образцов картофеля были начаты более 30 лет назад (Манжулин, Бутенко, 1984; Манжулин и др., 1985; Fabre, Dereuddre, 1990; Schäfer-Menuhr et al., 1994), в эти исследования вовлекались единичные образцы. Обзоры литературных данных по криоконсервации картофеля приведены в нескольких современных опубликованных работах (Kaczmarczyk et al., 2011; Gonsales-Arno, 2008, 2014; Niino, Valle Arizaga, 2015). В нашей работе мы также собрали и проанализировали литературные данные по криоконсервации и криохранению картофеля (табл.4). Во всех работах по криоконсервации картофеля в качестве эксплантов использованы апексы (верхушечные почки) микропобегов.

Криоколлекции картофеля созданы в различных генбанках в разных странах (Panta et al., 2014, 2015; Keller et al., 2008; Kaczmarczyk et al., 2011), в том числе в России (ВИР) (Ухатова и др., 2016) (табл. 4).

В настоящее время для криоконсервации картофеля применяют разные методы (см. табл. 4). При использовании одного и того же метода в разных лабораториях получены разные результаты. Так, например, использование капель-метода в ИРК, Германии, позволило получить у 1428 сортов в среднем 46% регенерирующих эксплантов (Kaczmarczyk et al., 2008), в то время как в ARD, Испании, тем же методом при криоконсервации 50 сортов получили крайне низкую частоту регенерации – в среднем 13,2% (Barandalla et al., 2003). Интересно, что метод капель при использовании в СИР, Перу, для криоконсервации аборигенных сортов картофеля оказался малоэффективным, равно как и метод витрификации, со средним уровнем выживаемости (не регенерации!) 46% (Gonsales-Arno et al., 2008). Метод капель-витрификации позволил существенно – до 55% - повысить уровень регенерации после оттаивания (Volmer et al., 2016). В то же время сообщений об использовании метода капель-витрификации для сортов картофеля не много (см. табл. 4). Отметим, что свое применение в криоконсервации апексов картофеля находят такие новые технологии, как капель-витрификация (Zhang et al., 2014; Bamberg et al., 2016; Vollmer et al., 2016) и cryo-plate (Yamamoto et al., 2015; Valle Arizaga et al., 2017). Наиболее высокий уровень регенерации (83–98%) был получен при консервации методом cryo-plate, однако было изучено небольшое число (16) образцов (Yamamoto et al., 2015) и 13 генотипов (Valle Arizaga et al., 2017).

Таблица 4 – Кривоколлекции картофеля, созданные на основе криоконсервации апексов микропобегов

Страна, институт	Информация об образцах	Плоидность	Число образцов	Методы криоконсервации	Средний процент регенерации (min-max)	Ссылка
Перу, CIP	Аборигенные сорта	2x-5x	1028		55,1 (34,0-59,0)	Vollmer et al., 2016
		2x-5x	1533		57,7 (32,0-64,2)	Vollmer et al., 2017
Россия, ВИР	Аборигенные сорта	2x-5x	150	DV	51,3 (27,7-95,8)	Настоящая работа
	Селекционные сорта		20	DV	47,5 (26,7-73,3)	Настоящая работа
Германия, ИПК	селекционные сорта	4x	1428	Dr	46,0 (15,4 - 58,0)	Kaczmarczyk et al., 2008; Keller et al., 2016
США, USPG	селекционные сорта	4x	280	DV	45,0-100,0	Bamberg et al., 2016
Корея, NAC	селекционные сорта	4x	130	DV	64,0-94,0	Kim et al., 2006, Niino, Valle-Arizaga, 2015
Япония/ CAES	н/д	н/д	100	EV	40,0	Hirai, 2011
Испания, ARD	селекционные сорта	4x	50	Dr	13,2 (2,5-22,0)	Barandalla et al., 2003
Чехия, CRI	селекционные сорта	4x	50	Vi модиф.	24,8-29,0	Faltus et al., 2008
Япония/ CAES	селекционные сорта	4x	26	gelled DV	54,3	Hirai, 2011
	образцы диких видов	н/д	6			
Китай/ NGC	образцы	н/д	24	DV	47,0-76,0	Zhang et al., 2014
Япония / NIAS	12 сортов, 4 образца диких вида	н/д	16	D cryo-plate	91,6 (80,0-100,0)	Yamamoto et al., 2015
				V cryo-plate	98,6 (93,3-100,0)	
Япония / HPKAES	селекционные сорта	4x	14	EV	~70,0%	Hirai, Sakai, 1999
Мексика / INIFAP	селекционные сорта		13	D cryo-plate	82,8 (70,0-93,3)	Valle Arizaga et al., 2017
Эстония/ EVIKA	селекционные сорта	4x	10	Dr	3,0-75,0	Rosenberg et al., 2013

Примечание: Методы криоконсервации: Vi – витрификация, EV – инкапсуляция-витрификация, Dr – дроблет-метод, DV – дроблет-витрификация, gelled DV – гелевая дроблет-витрификация, D cryo-plate V cryo-plate. Генбанки: CIP- International Potato Center, Перу; ИПК - Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Германия; NAC - National Agrobiodiversity Center, Южная Корея; CAES - Central Agricultural Experiment Station, Hokkaido Research Organization, Япония; CRI - Crop Research Institute, Чехия; ARD - Agricultural Research and Development, Испания; USPG - US Potato Genebank, США; ВИР – Всероссийский институт генетических ресурсов растений, Санкт-Петербург, Россия; NGC - National Genebank of China, Китай; Department of Plant Biotechnology EVIKA, Estonian Research Institute of Agriculture, Эстония; INIFAP - National Genetic Resources Center, National Forestry, Crops and Livestock Research Institute, Мексика.

При этом отметим, что в каждом случае мы видим широкое варьирование показателей регенерационной способности после оттаивания. В этой связи подчеркнем, что сравнивать можно только сопоставимые выборки, в которых представлены образцы либо одного и того же вида, либо представители близких видов одного и того же уровня ploидности. К сожалению, не во всех работах приведены средние показатели регенерации, а также минимальные и максимальные значения.

Первые работы по криоконсервации были направлены на увеличение показателей регенерации после оттаивания у единичных образцов растений. Позднее технологии криоконсервации стали применяться для широкого агробιοразнообразия. В комплексе методы криохранения (криоконсервации) и оздоровления стали рассматривать только в последние годы, когда появились сообщения о возможностях криотерапии, поскольку одновременно проводить криоконсервацию и оздоровление растений от вирусов экономически выгодно.

Заключение к разделу 1.2.2.

Несмотря на большое число существующих методов криоконсервации, до сих пор остаются нерешенными проблемы создания и сохранения больших коллекций, включающих видовое и внутривидовое разнообразие вегетативно размножаемых сельскохозяйственных культур. Актуальной проблемой криоконсервации растений остается повышение регенерационной способности, а также использование по возможности универсального протокола для коллекционных образцов, представляющих широкое агробιοразнообразие. При выборе нового объекта необходимо решать все указанные выше методические проблемы (выбор метода, экспланта, генотипа). В случае малины большинство работ выполнены на единичных образцах (см. табл. 3). Однозначных рекомендаций относительно метода криоконсервации коллекции для малин, как, впрочем, и для картофеля, нет. Для картофеля, тем не менее, достигнуты определенные успехи в криоконсервации разнообразия селекционных и аборигенных сортов и создании обширных криоколлекций (см. табл. 4). В генбанке ИРК для криоконсервации картофеля используют дроблет-метод, а для других культур (мята, лука) – метод дроблет-витрификации (Keller et al., 2016). Данные об уровне регенерации после оттаивания при использовании одного и того же метода для разных образцов одного вида даже в одной лаборатории часто противоречивы. Так, при использовании одного и того же метода дроблет-витрификации было получено от 0 до 16% регенерирующих эксплантов у одних образцов картофеля, тогда как другие образцы регенерировали с частотой 80–100% (Panta et al., 2015). Таким образом, поисковая работа по криоконсервации двух важных вегетативно размножаемых культур (малина и картофель), несомненно, актуальна и своевременна.

Для создания криоколлекций образцов вегетативно размножаемых культур в виде почек микрорастений необходим тщательный мониторинг фитосанитарного статуса исходных растений – источников экспланта, контроль за наличием/отсутствием бактериальных и вирусных инфекций. Известно, что у инфицированных образцов существенно более низкий уровень посткриогенного восстановления (Reed, 2008; Vollmer et al., 2016). Все образцы *in vitro* коллекции ВИР ежегодно тестируются на наличие бактериальных инфекций, пораженные микрорастения выбраковывают (Дунаева и др., 2011). Для успешной криоконсервации и надежного сохранения образцов вегетативно размножаемых культур важен также безвирусный статус микрорастений. Данные о вирусных инфекциях и некоторых методиках оздоровления будут рассмотрены и систематизированы в следующих разделах.

1.3. Оздоровление образцов *in vitro* коллекций от вирусных инфекций

1.3.1. Значение оздоровленного материала для развития семеноводства

«Оздоровленный материал садовых культур – это растения или их органы, свободные от основных (наиболее распространенных и вредоносных) вирусов (а также фитоплазм, вириодов и других вирусоподобных болезней), которые в естественных условиях присутствуют на данной культуре в РФ, и протестированный на наличие вирусов и возбудителей болезней рекомендуемыми методами» (Технология..., 2013).

В России с 2010 года на посадочный материал плодовых и ягодных культур принят ГОСТ Р 53135-2008, а также в 2013 году принята технология получения оздоровленного от вирусов посадочного материала плодовых и ягодных культур (2013). Согласно этим документам, в посадочном материале малины не должно быть 11 вирусов (RBDV, AMV, RRV, TBRV, CLV, SLRV, REV, CMV, RVCV, BRV, AMV), и фитоплазмы израстания. В связи с этим в настоящее время на первое место ставят диагностику материала на наличие вирусов и выбраковку зараженных растений. Оздоровление рекомендовано в том случае, когда заражены все растения сорта/генотипа/образца. Для разных вирусных болезней рекомендованы различные способы терапии на основе культуры меристем, термотерапии и химиотерапии либо комплекса этих методов (Технология..., 2013). В то же время, единого метода оздоровления нет.

Современное семеноводство картофеля невозможно без производства оздоровленного от вирусов посадочного материала. Для регламентирования получения семенного картофеля в России введены два документа: ГОСТ Р 53136-2008 (2009), который описывает технические условия получения и воспроизводства посадочного материала картофеля, а также ГОСТ Р 55329-2012 (2013), в котором описаны методы анализа семенного картофеля. В этих документах отмечено, что картофель должен быть свободен от восьми вирусов (PLRV, PVA, PVM, PVS, PVX и PVY (включая некротические штаммы PVY), PMTV и TRV). Для разных

вирусных болезней картофеля рекомендованы различные способы терапии на основе культуры меристем, термотерапии и химиотерапии либо комплекса этих методов.

В рамках реализации «Стратегии развития садоводства и питомниководства в Российской Федерации на период до 2020 года» и «Государственной программы развития сельского хозяйства и регулирования рынков сельскохозяйственной продукции сырья и продовольствия на 2013–2020 годы» запланирована государственная поддержка питомниководства и элитного семеноводства, которая невозможна без производства здорового (оздоровленного) от вирусов посадочного материала. С другой стороны, в генбанках сохраняют большое разнообразие сортов и клонов вегетативно размножаемых культур, в том числе уникальных образцов, поэтому методы мониторинга и оздоровления от вирусной инфекции весьма актуальны не только для производителей посадочного материала, но и для коллекций генбанков.

В коллекции ВИР представлено широкое генетическое разнообразие вегетативно размножаемых культур, востребованное в современной селекции. Полевые коллекции ВИР начали создаваться много лет назад, некоторые образцы были привезены из международных экспедиций до начала работы карантинной службы и, соответственно, могли быть инфицированы любыми вирусами. Как известно из литературы, вирусные болезни могут вызывать снижение качества получаемой продукции и посадочного материала (Упадышев, 2011; Мытницкая и др., 2012; Анисимов и др., 2016, 2017).

Известно, что на степень поражения растений в полевых коллекциях вирусами большое влияние оказывают генотип растений, штамм вирусов, зона произрастания культуры и условия среды (Власов и др., 2016).

Вирусы могут быть классифицированы по типу нуклеиновой кислоты в их геноме (ДНК- и РНК-содержащие); способу передачи (насекомыми, пылью, нематодами); устойчивости к температуре (термостабильные и термолабильные) (Власов, Ларина, 1982; Loebenstein, 2001; Власов и др., 2016). В связи с этим, учитывая разнообразие образцов в генбанке ВИР, многообразие возможных патогенов, актуален поиск наиболее эффективных методов оздоровления от разных вирусных инфекций. В нашей работе по оздоровлению от вирусов выбраны две вегетативно размножаемых культуры: малина и картофель, поскольку в *in vitro* коллекции ВИР они наиболее широко представлены (Гавриленко и др., 2015). В связи с этим образцы малины и картофеля могут быть примером объектов, на которых удобно вести поисковые работы по наиболее эффективным методикам тестирования и оздоровления от вирусных инфекций. В рамках настоящей работы внимание будет уделено оздоровлению от единичных, наиболее распространенных и вредоносных вирусов малины (RBDV) и картофеля (PLRV).

1.3.2. Вирусы малины

В настоящее время описано 24 вирусные болезни малины (Приходько, 1997; Немцова, 2009; Упадышев, 2011; Упадышев и др., 2014а, б). В России наиболее распространенными и вредоносными вирусами для малины являются: вирус кустистой карликовости малины (RBDV), кольцевой пятнистости малины (RpRSV), мозаики резухи (ArMV), черной кольцевой пятнистости томата (TBRV) и латентной кольцевой пятнистости земляники (SLRSV) (Казаков, 2001; Евдокименко и др., 2013; Упадышев, 2014б, в). Вирус кустистой карликовости малины в настоящее время наиболее распространен и вредоносен для малины.

Вирус кустистой карликовости малины (ВККМ) - Raspberry bushy dwarf virus (RBDV) - относится к группе *Idaeovirus*, геном представлен «плюс-цепью» (ss) РНК (Sabanadzovic, Martin, 2011). В настоящее время описано 3 семейства изолятов RBDV: S изоляты (наиболее распространенные); RB изоляты, подобные S изолятам серологически, но отличающиеся от них способностью инфицировать сорта малины, устойчивые к S изолятам; В изоляты (Jones et al., 2000). RBDV приводит к существенному снижению продуктивности и качества урожая малины и ежевики (Daubeny et al., 1982). RBDV является наиболее распространенным патогеном дикорастущих и культурных растений рода *Rubus* (Murant, 1987). Данный вирус широко распространен в Северной и Южной Америке (Medina et al., 2006), Азии (Chamberlain et al., 2003; Isogai et al., 2012), Европе (Spak, Kubelkova, 2000; Barbara et al., 2001; Jeremović, Raunović, 2011; Isac et al., 2008; Mavrič Pleško et al., 2009; Milusheva et al., 2012), РФ и сопредельных странах (Pupola et al., 2009; Valasevich et al., 2011; Якуб, Евдокименко, 2013; Упадышев и др., 2014б, 2015; Кондрашева, 2016).

Вирус кустистой карликовости малины отличается термоустойчивостью и способностью проникать в апикальные ткани (Jones, 2003; Wang et al., 2008; Упадышев и др., 2015; Тихонова и др., 2015). RBDV передается с пылью (Murant et al., 1974; Мытницкая и др., 2012). Для ограничения распространения RBDV рекомендуется использовать высоко устойчивые к данному вирусу сорта или в качестве посадочного материала использовать оздоровленный безвирусный материал (Мытницкая и др., 2012; Упадышев и др., 2015).

1.3.3. Вирусы картофеля

В разных источниках сообщается о различном числе вирусов, поражающих картофель: от 40 (Власов и др., 2016) до 52 (Jones, 2014), в том числе 36 встречаются в разных регионах, а 16 – только на территории Южной Америки (Jones, 2014). Самые вредоносные из них: вирус картофеля Y (PVY), вирус картофеля M (PVM), вирус скручивания листьев картофеля (PLRV), вирус картофеля S (PVS), вирус картофеля X (PVX), вирус картофеля A (PVA), вирус картофеля V (PVV) вирус метельчатости верхушек картофеля (potato mop-top virus – PMTV) и вирус

погрешности табака (tobacco rattle virus – TRV) (Peters, 1970; de Bokx, Huttinga, 1981; Jeffries, 1998; Valkonen, 1994; Loebenstein, 2001; Гавриленко и др., 2005; Рогозина и др., 2016; Макарова и др., 2017). Все перечисленные вирусы широко распространены в зонах выращивания культуры в разных странах и встречаются на территории России (Трускинов, 1976; Рогозина, 1991; Власов, 1992; Рейфман и др., 1996; Власов и др., 2016).

К числу наиболее вредоносных вирусов картофеля относится вирус PLRV (Loebenstein 2001; Brunt 2001; Власов и др., 2016; Макарова и др., 2017), вызывающий до 90% потери урожайности сортов картофеля (Власов и др., 2016). PLRV преобладает в большинстве зон выращивания картофеля: в России (Власов и др., 2016), США (Di Fonzo et al., 1996), Шотландии (Evans, 2000), Украине (Бондус и др., 2014), Пакистане (Gul et al., 2013; Abbas et al., 2016), Узбекистане (Carli, Baltaev, 2008), Турции (Yardımcı et al., 2015), Индии (Singh, 2015) и других странах. Отметим, что PLRV наряду с PVY являются главными причинами вырождения сортов картофеля (Власов и др., 2016). В связи с этим в настоящей работе особое внимание уделено вирусу PLRV.

Вирус скручивания листьев картофеля (ВСЛК) – Potato Leafroll Virus (PLRV) – относится к группе *Polerovirus* семейства *Luteoviridae*, геном представлен «плюс-цепью» (ss) РНК (Loebenstein, 2001). PLRV распространяется по растению по флоэме (Loebenstein, 2001). В полевых условиях этот вирус передается несколькими видами тлей, но главным образом – *Myzus persicae* Sulz. (персиковой тлей) (Loebenstein, 2001; Brunt, 2001). Штаммы PLRV вызывают разные симптомы поражения растений картофеля или растений-индикаторов, хотя серологически не отличаются (Jones, 2014; Рогозина и др., 2016).

Разрабатывая методы оздоровления для коллекций генбанков, мы специально выбрали два разных объекта – малину и картофель, – и два наиболее распространенных и вредоносных вируса: RBDV и PLRV.

1.3.4. Методы оздоровления *in vitro* образцов вегетативно размножаемых растений

В настоящее время существует несколько способов оздоровления растений от вирусной инфекции: культура верхушечных меристем, химиотерапия, термотерапия, криотерапия и электротерапия, а также комбинированная терапия, сочетающая в разных комбинациях указанные выше методы.

Оздоровление с помощью культуры меристем. Метод оздоровления от вирусных инфекций с использованием культуры апикальных меристем был разработан одним из первых (Morel, Martin, 1952). Он основан на том, что концентрация патогена не одинакова в различных тканях и органах инфицированного растения, при этом ткань меристемы корней и верхушек побегов может быть свободна от вируса (Valkonen, 1994). Одной из особенностей метода

является низкая приживаемость (10-30%) вычленяемых меристем крайне малых размеров (0,1-0,3 мм), необходимых для получения безвирусных растений (Упадышев, 2011).

Следует отметить, что с конца XX века метод культуры меристем получил широкое распространение для оздоровления картофеля при сохранении больших коллекций картофеля в Международном центре картофеля (International Potato Centre (CIP), Перу (Lizarraga et al., 1991), а также во всех странах мира при производстве семенного картофеля (Анисимов и др., 2009).

Эффективность оздоровления методом культуры апикальных меристем зависит от индивидуальных особенностей генотипа растения-хозяина, от вируса и от степени зараженности растения вирусами (Упадышев, 2011). Так, при использовании культуры *in vitro* меристем с 1-2 примордиями, по данным некоторых исследователей, можно получить до 100% микрорастений картофеля, свободных от PLRV (Accatino, 1966; Лебенштейн, 2005). Другие авторы (Wang et al., 2006) сообщают о более низких показателях - до 50% оздоровленных от PLRV микрорастений картофеля. В то же время некоторые вирусы могут инфицировать и меристемные клетки, как, например, вирус RBDV у представителей рода *Rubus*, в связи с чем в таком случае данный метод не позволяет получить ни одного оздоровленного растения (Wang et al., 2008; Wang, Valkonen, 2009).

Термотерапия. Первое сообщение об успешном применении метода термотерапии датируется 1949 годом (Kassanis, 1949), в обзоре Loebenstein, 2001 сообщается об использовании термотерапии в оздоровлении растений разных видов более чем от 70 вирусов. Суть метода состоит в том, что клубни, растения или отдельные части инфицированных растений (апикальные, пазушные меристемы или микрочеренки в пробирочной культуре) подвергают воздействию повышенных температур (36°-40°С). Под действием повышенной температуры происходит нарушение синтеза вирусных РНК, что ведет к снижению концентрации вируса (Loebenstein, 2001). Кроме того, на начальном этапе термотерапии ускоряется рост растения, что способствует формированию безвирусных меристем (Технология..., 2013). Термотерапия является эффективным методом для оздоровления растений от PVY и PLRV (Loebenstein, 2001; Власов и др., 2016). Отметим, что в отношении оздоровления от термостабильных вирусов, к которым относится RBDV (Jones, 2003), данный метод не эффективен, что подтверждено в работе М.Т.Упадышева с соавторами (Упадышев и др., 2014б).

Химиотерапия. При использовании данного метода оздоровления проводится обработка инфицированных растений различными веществами с противовирусной активностью. К ним относятся ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот вирусов: синтетический аналог гуанозина – рибавирин (1-бета-рибофуранозил-1Н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) (Cassells, Long, 1982; Рогозина, 1991), бактериальная эндонуклеаза РНКазы (Бойко, Зейрук, 1984), интерферон

(Атабеков, Тальянский, 1987); стимуляторы роста и фенольные соединения, в частности, салициловая кислота (Упадышев и др., 2014в). Следует отметить, что фитотоксичность препаратов может быть причиной замедления или прекращения роста микрорастений (Wang et al., 2006; Danci et al., 2009; Упадышев и др., 2014в). С другой стороны, использование таких противовирусных препаратов, как виразол, хитозан, интерферон позволило в 2–3 раза увеличить приживаемость меристем у 6 сортов картофеля (Рябцева и др., 2015).

Часто применяют для химиотерапии рибавирин, поскольку он активен против РНК- и ДНК-содержащих вирусов (Danci et al., 2009). Рибавирин не влияет на синтез РНК в нормально функционирующих растительных клетках, поскольку селективно ингибирует синтез только вирусной РНК. Тем не менее, рибавирин оказывает угнетающее воздействие на развитие растений. Фитотоксическое действие рибавирина возрастает с увеличением его концентрации в среде (Wang et al., 2006; Danci et al., 2009). Концентрация рибавирина варьирует от 20 до 100 мг/л; чаще всего составляет 30 мг/л (Cassells, Long, 1982). Наиболее высокая эффективность рибавирина была показана в отношении вирусов картофеля PVM, PLRV, PVS, PVX (Faccioli, 2001, 2002); PVM, PLRV, PVS, PVX и PVY (Griffiths et al., 1990; Danci et al., 2009). Отметим, что оздоровленные от RBDV микрорастения малины не были получены при действии рибавирина (Антонова и др., 2015).

Часто используемый антивирусный препарат РНКазы показал меньшую фитотоксичность по сравнению с рибавирином. В работе Е. В. Рогозиной дополнительное применение РНКазы при оздоровлении картофеля методом вычленения меристем вызывало увеличение выхода безвирусных растений-регенерантов на 25 – 45% по сравнению с контрольными вариантами (Рогозина, 1991). По данным О. Ю. Антоновой с соавторами (2015), эффективность оздоровления микрорастений малины от вируса RBDV методом химиотерапии с использованием РНКазы составила всего 5%.

Криотерапия. Для генбанков особый интерес представляет метод криотерапии, поскольку использование такой технологии позволяет решать одновременно две задачи: долгосрочное сохранение криоколлекции и получение оздоровленных криорегенерантов. При погружении в жидкий азот жизнеспособность сохраняют только клетки в зоне апикальных меристем (Apical Dome =AD) и первых двух листовых примордиев, то есть клетки, потенциально свободные от вирусов. Таким образом, криотерапия «работает» как микроскальпель, отсекая пораженные вирусом более крупные и более гидратированные клетки вне меристемной зоны, погибающие из-за травм, вызванных криоаморазиванием (Wang et al., 2009). Впервые в 1997 году методом криотерапии были получены свободные от вируса шарки сливы растения гибрида *Prunus*, (Brison et al., 1997). В настоящее время криотерапия успешно применяется для устранения вирусов при оздоровлении многих важных сельскохозяйственных

культур: картофеля (*Solanum tuberosum*) – от вирусов PLRV и PVY (Wang et al., 2003, 2006), банана (*Musa spp.*) – от вируса огуречной мозаики (CMV) и полосатости банана banana streak virus (BSV) (Helliot et al., 2002), винограда (*Vitis vinifera*) – от вируса винограда А (GVA) (Wang et al., 2003), батата (*Ipomoea batatas*) – от вирусов хлороза и вируса крапчатости батата (sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV) и sweet potato feathery mottle virus (SPFMV), соответственно) (Wang et al., 2003, 2006, 2014; Feng et al., 2013).

Следует отметить, что применение криотерапии для оздоровления малины от RBDV, пеларгонии от вирусов Pelargonium flower break virus (PFBV) (Gallard et al., 2011) и Pelargonium line pattern virus (PLPV) (Gallard et al., 2011) было не результативным, поскольку перечисленные вирусы инфицируют клетки меристем, в таких случаях необходимо использование дополнительных методов терапии (Wang et al., 2008; Gallard et al., 2011).

Эффективность криотерапии во многом зависит от генотипа (Wang et al., 2006; Feng et al., 2013), как и эффективность криоконсервации. Есть сообщения об успешном использовании метода криотерапии для оздоровления картофеля от PLRV (83–86%) в опытах по криоконсервации почек микрорастений, пораженных вирусом (Wang et al., 2006, 2009). Следует отметить, что при этом эффективность криотерапии не зависела ни от метода криоконсервации, ни от размера оздоравливаемого экспланта (Wang et al., 2006, 2014). Например, для картофеля достаточно вычленять почки размером 1–2 мм, а не меристемы размером 0,2–0,5 мм (Wang et al., 2006, 2009), что позволяет избежать трудности во время изоляции меристем. Кроме того, время, которое затрачивается на криотерапию (от этапа размножения материала до тестирования оздоровленных посткриогенных регенерантов), как минимум в два раза меньше, чем при термотерапии. При использовании криотерапии возможно быстрое одновременное оздоровление большого количества образцов, поскольку для получения терапевтического эффекта достаточно погружения тканей в жидкий азот всего на 1–2 часа (Wang et al., 2009, 2014; Kaczmarczyk et al., 2012; Feng et al., 2013).

Об эффективности комбинированных методов оздоровления от различных вирусов.

Наиболее эффективной для освобождения растений от вирусов считается комбинированная (комплексная) терапия, сочетающая методы культуры апикальных меристем, термо- и химиотерапии, криотерапии в разных сочетаниях (табл. 5–7).

Уже в конце XX века продемонстрирована успешность использования методов комбинированной терапии: культуры меристем, дополненной термотерапией, что привело к оздоровлению картофеля от вирусов Y, S и PLRV (Paet, Zamora, 1990) (табл. 6).

В отделе биотехнологии ВИР, по данным О. Ю. Антоновой с соавторами (2017), при использовании комплексной термо- химиотерапии были получены оздоровленные от PVX, PVY, PVS, PVM микрорастения картофеля (табл. 6).

1.3.5. Эффективность различных методов оздоровления растений малины и ежевики от RBDV в системе *in vitro*

До начала экспериментов по оздоровлению микрорастений малины от RBDV разными методами мы провели анализ литературных данных на эту тему. Согласно литературным данным, эффективность оздоровления инфицированных RBDV растений зависит от способа терапии и от особенностей генотипов (Wang et al., 2008). Данные об оздоровлении образцов малины от RBDV собраны в таблице 5. Перспективным методом оздоровления растений малины от RBDV является использование магнитно-импульсной обработки микрорастений *in vitro* (Упадышев, Донецких, 2008; Упадышев, 2011; Упадышев и др., 2014в, 2015), однако эти исследования были выполнены для единичных генотипов.

По данным О. Ю. Антоновой с соавторами (2015), были получены оздоровленные от вируса RBDV микрорастения малины методом комплексной термо-химиотерапии. Эффективность оздоровления составила 21% при использовании РНКазы и 60% – в варианте применения рибавирина.

Необходимо отметить, что подавляющее число исследований по оздоровлению малины от RBDV выполнено на единичных сортах (Wang et al., 2008; Wang, Valkonen, 2009; Упадышев, 2011). Ряд работ демонстрирует отсутствие эффекта оздоровления от RBDV методом культуры меристем (Wang et al., 2008; Wang, Valkonen, 2009; Упадышев, 2011), однако в них изучено также по одному генотипу. Исключение составляет работа Е. В. Немцовой с соавторами (2007), выполненная на представительной выборке из 12 сортов малины, показавшая неэффективность метода культуры меристем в отношении вируса RBDV, что позднее также на обширной выборке (59 генотипов 15 сортов) подтвердила работа N.Purola с коллегами (2009).

N. Pūrola с соавторами (2009) сообщили о низкой эффективности оздоровления сортов малины в вариантах применения химиотерапии *in vitro* с использованием различных препаратов (рибавирин, азациитидин, дицианамид). Для единичных генотипов сообщалось об эффективной (до 90%) элиминации RBDV при воздействии химиотерапии с использованием салициловой кислоты (Упадышев и др., 2014в).

Q. C. Wang с соавторами (2008) не обнаружили ни одного оздоровленного от RBDV растения малины после действия различных вариантов термотерапии (38°/26°С – 16/8 часов фотопериод в течение 3-5 недель) в сочетании с *in vitro* культурой меристем размером 0,2 мм. Эти же авторы отмечали существенное снижение жизнеспособности микрорастений при действии повышенной температуры (Wang et al., 2008).

Таблица 5 – Эффективность различных методов оздоровления образцов малины от RBDV

Методы оздоровления:	Число изученных образцов	Эффективность оздоровления, %	Метод тестирования	Ссылка
Культура меристем	1 генотип	0	ИФА, ОТ-ПЦР, LAMP	Wang et al., 2008
	1 генотип	0	ИФА, ОТ-ПЦР	Wang, Valkonen, 2009
	12 сортов	0	ОТ-ПЦР	Немцова и др., 2007
	12 генотипов	0	ОТ-ПЦР	Мытницкая и др., 2012
	59 генотипов 15 сортов	0	ИФА	Pupola, 2009
Химиотерапия: (салициловая кислота)	1 малино-ежевичный гибрид сорта Логанберри	75-100	ИФА, ОТ-ПЦР	Упадышев, 2011, Упадышев и др., 2014в
(рибавирин)	7 сортов	0	ИФА	Антонова и др., 2015
(РНКаза)	малины	0		
Термотерапия	1 генотип	0	ИФА, ОТ-ПЦР	Упадышев и др., 2014б
Криотерапия	1 генотип	0	ИФА, ОТ-ПЦР, LAMP	Wang et al., 2008
Магнитотерапия (МИО)	1 малино-ежевичный гибрид сорта Краснодарская	50-100	ИФА, ОТ-ПЦР	Упадышев, 2011
МИО с нарастанием и снижением частоты импульсов	2 сорта (Арбат, Малаховка)	75	ИФА	Тихонова и др., 2014
Комплексная терапия:				
Культура меристем и химиотерапия (рибавирин, азациитидин и дицианамид)	59 генотипов 15 сортов	0	ИФА	Pupola et al., 2009
Культура меристем и термотерапия (21, 28, 35 или 42 дня)	1 генотип	0	ИФА, ОТ-ПЦР, LAMP	Wang et al., 2008
Криотерапия и термотерапия (21 день или 42 дня)	1 генотип	0	ИФА, ОТ-ПЦР, LAMP	Wang et al., 2008
Криотерапия и термотерапия (28 или 35 дней)	1 генотип	33–35	ИФА, ОТ-ПЦР, LAMP	Wang et al., 2008
Термо- химиотерапия: рибавирин	7 сортов малины	0–60	ИФА	Антонова и др., 2015
Термо- химиотерапия: РНКаза		0–25		

Результаты экспериментов Q. C. Wang с коллегами (2008) показали, что для оздоровления малины от RBDV эффективно использование криотерапии в сочетании с термотерапией в течение 28 или 35 дней. В случае укороченного (21 день) или удлиненного (42 дня) цикла термотерапии оздоровления от RBDV не происходило. Таким образом, противоречия в результатах оздоровления, полученные даже при исследовании одного и того же генотипа, отражают сложность экспериментов при оздоровлении растений от вирусов.

Как видно из приведенных данных, сообщений об успешном оздоровлении микрорастений малины от RBDV в литературе не много. Отметим, что работы, в которых получены успешные результаты – 50–100% оздоровленных от RBDV растений, выполнены на единичных генотипах (Wang et al., 2008; Упадышев, 2011; Тихонова и др., 2014). Таким образом, надежного метода оздоровления микрорастений малины от RBDV в настоящее время нет. Поисковые работы по сравнению эффективности различных способов оздоровления являются актуальными как для генбанков, так и для решения задач практической селекции и семеноводства (получения высококачественного оздоровленного посадочного материала).

1.3.6. Эффективность различных методов оздоровления микрорастений картофеля от основных вирусов, включая PLRV

Проведенный анализ существующих литературных данных об эффективности оздоровления от разных вирусов картофеля, представленный в таблице 6, иллюстрирует, насколько данные разных авторов при оздоровлении микрорастений картофеля от разных и от одних тех же вирусов различаются по эффективности.

Как видно из данных таблицы 6, приемы антивирусной терапии неодинаковы по эффективности, а в ряде случаев одни и те же подходы в разных лабораториях дают противоречивые результаты (Griffiths et al., 1990 и Dhital et al., 2007; Трускинов, Рогозина, 1997 и Faccioli, 2001). Кроме того, большинство исследований выполнены на единичных сортах или их ограниченном числе, поэтому не известно, насколько предлагаемые методики применимы для больших коллекций. Таким образом, разработка способов оздоровления растений картофеля от вирусных инфекций, включая PLRV, остается крайне актуальной.

Проведенный анализ литературных данных об эффективности оздоровления картофеля от вируса скручивания листьев, представленный в таблице 7, иллюстрирует, насколько полученные результаты различаются.

Таблица 6 – Эффективность различных методов оздоровления растений картофеля от вирусных инфекций в системе *in vitro*

Метод оздоровления	Вирусы картофеля			
	Семейство <i>Alphaflexiviridae</i>	Семейство <i>Potyviridae</i>	Семейство <i>Betaflexiviridae</i>	
	PVX	PVY	PVS	PVM
Культура апикальных меристем	+ ^б (Jianming et al., 2012) ++ ^а (Faccioli, 2001)	+ ^а (Nasir et al., 2010) ++ (Wang et al., 2006)	++ ^а (Faccioli, 2001)	+ ^а (Faccioli, 2001)
Простая терапия:				
обработка рибавирином	+ ^а (Трускинов, Рогозина, 1997; Zapata et al., 1995) ++ ^а (Griffiths et al., 1990)	- ^а (Griffiths et al., 1990) + ^а (Трускинов, Рогозина, 1997; Zapata et al., 1995) + ^в (Cassells, Long, 1982) ++ ^а (Wang et al., 2006; Nascimento et al., 2003)	+ ^а (Griffiths et al., 1990; Трускинов, Рогозина, 1997) +++ ^а (Faccioli, 2001; Zapata et al., 1995)	+ ^а (Трускинов, Рогозина, 1997) + ^в (Cassells, Long, 1982) ++ ^а (Faccioli, 2001) ++++ ^а (Griffiths et al., 1990)
обработка РНКазой	+++ ^а (Морозова, 1992; 40)	- ^а (Griffiths et al., 1990); + ^а (Леонова, Салганик, 1991)	+ ^а (Морозова, 1992; Леонова, Салганик, 1991)	+ ^а (Морозова, 1992; Леонова, Салганик, 1991)
термотерапия	++ ^а (Jianming et al., 2012, Faccioli, 2001) +++ ^а (Lopez-Delgado et al., 2004)	+ ^а (Nascimento et al., 2003) ++ ^а (Wang et al., 2006; Nasir et al., 2010)	- ^а (Wang et al., 2006) + ^а (Faccioli, 2001)	
криотерапия	++ ^б (Jianming et al., 2012)	++++ ^а (Wang et al., 2006)		
Комплексная терапия:				
химио- и термотерапия	+++ ^{аб} (Антонова и др., 2017); ++++ ^а (Griffiths et al., 1990; Faccioli, 2001; Hawkes, 1990; Lopez-Delgado et al., 2004);	- ^а (Griffiths et al., 1990; Faccioli, 2001), ++ ^а (Dhital et al., 2007); +++ ^{аб} (Антонова и др., 2017)	++ ^а (Faccioli, 2001); ++ ^{аб} (Антонова и др., 2017); ++++ ^а (Griffiths et al., 1990; Zapata et al., 1995)	++ ^а (Faccioli, 2001); +++ ^а (Griffiths et al., 1990); +++ ^{аб} (Антонова и др., 2017)
термотерапия и культура меристем	++ ^в (Jianming et al., 2012) ++++ ^а (Faccioli, 2001)	++++ ^а (Wang et al., 2006; Paet, Zamora, 1990)	++ ^а (Heldak, 2001) ++++ ^а (Faccioli, 2001; Paet, Zamora, 1990)	
химиотерапия и культура меристем	++++ ^а (Klein, Livingston, 1983) ++++ ^{а, в} (Yang et al., 2014)	++ ^{а, в} (Yang et al., 2014)	++++ ^а (Klein, Livingston, 1983) ++++ ^{а, в} (Yang et al., 2014)	
термо-, химиотерапия и культура меристем	+++ ^а (Sanchez et al., 1991)	+++ ^а (Sanchez et al., 1991) +++++ ^а (Nasir et al., 2010)	+++ ^а (Sanchez et al., 1991)	
термо-, химио-, электротерапия и культура меристем	+++ ^а (Bădărașu, Chiru, 2014)	+++ ^а (Mahmoud et al., 2009)		

Примечание. PVX, PVY, PVS, PVM – соответственно X-, Y-, S- и M- вирусы картофеля; «-» – отсутствие эффекта оздоровления; «+» – до 40 % безвирусных растений, «++» – от 41 до 60 % безвирусных растений, «+++» – от 61 до 89 % безвирусных растений, «++++» – от 90 до 98 % безвирусных растений. Тестирование методом иммуноферментного анализа (а), в ПЦР с обратной транскрипцией (б), с помощью растений-индикаторов или электронной микроскопии (в). Пропуски означают отсутствие данных.

Согласно литературным данным, эффективность оздоровления инфицированных PLRV растений зависит от способа терапии (табл. 7). Так, наилучшие результаты обеспечивают криотерапия (Wang et al., 2006, 2009) и комплексная терапия, сочетающая культуру меристем с термотерапией (Wang et al., 2006; Paet, Zamora, 1990) или химиотерапией (Awan et al., 2007).

Таблица 7 – Эффективность различных методов оздоровления микрорастений картофеля от PLRV в системе *in vitro*

Метод оздоровления	Число изученных образцов	Эффективность оздоровления, %*	Метод тестирования	Ссылка
Культура меристем	1 генотип	56	ИФА	Wang et al., 2006
	4 сорта	20-30	ИФА, ОТ-ПЦР	Awan et al., 2007
Химиотерапия (рибавирин, конц)	9 сортов и 1 генотип (20)	16,5-33	ИФА	Griffiths et al., 1990
	6 сортов (50)	15-42	ИФА	Faccioli, Colalongo, 2002
	4 сорта (40)	31-45	ИФА, ОТ-ПЦР	Awan et al., 2007
	1 сорт	10	ОТ-ПЦР	Dhital et al., 2007
	1 генотип (25)	39,6-40,4	ОТ-ПЦР	Singh, 2015
Термотерапия	1 генотип	50	ИФА	Wang et al., 2006
	4 сорта	44-51	ИФА, ОТ-ПЦР	Awan et al., 2007
	4 сорта	0	ИФА	Danci et al., 2009
Криотерапия	1 генотип	83-86	ИФА	Wang et al., 2006
Комплексная терапия:				
Химио- (рибавирин) и термотерапия	9 сортов и 1 генотип	16,5-83,3	ИФА	Griffiths et al., 1990
	6 сортов	0	ОТ-ПЦР	Faccioli, Colalongo, 2002
	4 сорта (40)	49-64	ИФА, ОТ-ПЦР	Awan et al., 2007
	2 сорта	25-59	ОТ-ПЦР	Dhital et al., 2007
	2 сорта	69-100	ИФА	Dewi, Slack, 1994
	85 образцов	72,7	ИФА, ОТ-ПЦР	Антонова и др., 2017
Термотерапия и культура меристем	Большие коллекции	Не указан	ИФА, ОТ-ПЦР	Salazar, 1999; Operational..., 2011
	3 клона	93-100	ИФА	Paet, Zamora, 1990
Термотерапия и культура меристем	1 генотип	90	ИФА	Wang et al., 2006
	4 сорта	65-100	ИФА	Danci et al., 2009
Термо-, химиотерапия (рибавирин) и культура меристем	4 сорта	67-92%	ИФА, ОТ-ПЦР	Awan et al., 2007

Наименее эффективным было применение химиотерапии с рибавирином (Griffiths et al., 1990), а также культуры меристем (Wang et al., 2006; Awan et al., 2007).

Используя криотерапию для оздоровления от PLRV одного образца картофеля, Q.C. Wang с коллегами (2006) получили от 83 до 86% безвирусных посткриогенных регенерантов (в зависимости от протокола криоконсервации). В этой работе для криотерапии применяли протоколы инкапсуляции-дегидратации, инкапсуляции-витрификации и дроплет-метод. Q.C. Wang et al (2006) провели сравнение различных методов оздоровления (криотерапии, культуры меристем, термотерапии и комплекса термотерапии с культурой меристем). По эффективности оздоровления от PLRV метод криотерапии был сравним с вариантом комплексной терапии (90%), сочетающей комбинацию методов термотерапии и последующего вычленения меристем – в этих вариантах получены наилучшие результаты (Wang et al., 2006).

Dhital S. P. и соавторы (2007) сообщали о результатах оздоровления трёх образцов картофеля: использование только хемотерапии (обработка рибавирином) привело к оздоровлению 10% растений, освобожденных от вирусов PVY и PLRV, тогда как применение комбинации методов химиотерапии (рибавирин) и термотерапии повысило эффективность оздоровления от указанных вирусов до 20 и 25%, соответственно (Dhital et al., 2007). Эти же авторы (Dhital et al., 2007) увеличили выход безвирусных растений, дополнив рибавирин ацетилсалициловой кислотой; выполнив 3 цикла комплексной терапии по 30-36 дней; в результате было получено 59 и 48% оздоровленных от PLRV растений у двух других сортов картофеля. В более ранних исследованиях (Dewi, Slack, 1994) с удлиненным циклом терапии, длившимся свыше 6 недель, были полностью оздоровлены от PLRV растения одного сорта и получено 69% оздоровленных микрорастений другого сорта.

Добавление 25 мг/л рибавирина в питательную среду позволило получить до 39,6% оздоровленных микрорастений картофеля (Singh, 2015). Увеличение концентрации рибавирина в среде до 30 мг/л вызывало снижение жизнеспособности микрорастений, в то время как эффективность оздоровления оставалась на том же уровне (40,4%, там же).

Эффективность комплексной термо- химиотерапии при оздоровлении микрорастений картофеля от вируса PLRV также зависит от вида противовирусного препарата. Так, в работе A. R. Awan et al (2007), выполненной на четырех сортах картофеля, было показано, что в комплексе с термотерапией ($37\pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 40 дней) применение рибавирина (40 мг/л) давало более высокий процент оздоровления, чем азацитидина (40 мг/л). Авторы отмечали снижение жизнеспособности микрорастений с ростом концентрации противовирусных препаратов (Awan et al., 2007).

По данным Griffiths с коллегами (1990), при химиотерапии с рибавирином в концентрации 20 мг/л только у двух сортов из изученных 9 произошло оздоровление от вируса скручивания

листьев; применение комплексной терапии (4 цикла культивирования при 35-31°C на среде с рибавирином (20 мг/л) в течение 4 недель каждый) способствовало оздоровлению трех сортов. Всего было изучено по шесть микрорастений на вариант, в работе приводятся данные в абсолютных числах для микрорастений, но мы для сравнения с данными литературы приведем процент оздоровления (табл.7). Так, при химиотерапии с рибавирином оздоровилось 16–33% микрорастений, при комплексной термо- химиотерапии – 16,5–83,3% растений, в зависимости от сорта (Griffiths et al., 1990).

Таким образом, даже рекомендации концентрации рибавирина в питательной среде до сих пор остаются противоречивыми.

Отметим, что подавляющее число исследований было выполнено на единичных генотипах (сортах), что может частично объяснять противоречия в литературных данных, поскольку эффективность оздоровления зависит и от этого фактора (Griffiths et al., 1990; Wang et al., 2006).

Для оздоровления от наиболее вредоносных вирусов больших коллекций картофеля, насчитывающих тысячи образцов аборигенных и селекционных сортов, в генбанках Перу (CIP) и Германии (IPK) апробирован метод комплексной химио- и термотерапии (Lizarraga et al., 1991; Salazar, 1999; Operational..., 2011). В то же время в литературных данных существуют противоречия (см. табл. 6, 7) относительно эффективности использования такого подхода для единичных образцов картофеля. Так, комплексная терапия, сочетающая химиотерапию с рибавирином и термотерапию, по данным одних авторов оказалась безрезультатной в отношении вируса PLRV (Griffiths et al., 1990; Faccioli, Colalongo, 2002), тогда как в ряде других работ было получено от 47 до 100% оздоровленных растений (Dhital, 2007; Dewi, Slack, 1994; Danci et al., 2009) с использованием сходного метода (табл. 7). Это указывает на необходимость проведения дальнейших исследований с привлечением большего числа исследуемых образцов.

В перечисленных выше работах по оздоровлению микрорастений от вирусов в исследования были включены в основном немногочисленные сорта картофеля. В этих работах проводился экспериментальный подбор оптимальной комбинации разных методов оздоровления. Известно, что в генбанках схемы оздоровления картофеля от вирусов включают многочисленные этапы обработок с использованием разных методов. Криотерапия в генбанках пока широко не используется. Наряду с традиционным методом культуры меристем для оздоровления используют комплексную термо-химиотерапию. Так, в CIP (Перу) приняты сложные схемы оздоровления с большим количеством этапов обработки растений методами термо- и химиотерапии, которые занимают до 8 месяцев (Lizarraga et al., 1991; Salazar, 1999). В генбанке IPK применяются более простые схемы, в которых приемы термо- и химиотерапии чередуются, а не применяются совместно (Operational..., 2011).

Подчеркнем, что для генбанков актуальны исследования, выполненные на большом числе генотипов. Это связано со спецификой сохраняемых коллекций генетических ресурсов растений, в которых сосредоточено большое видовое и сортовое разнообразие представителей отдельных ботанических семейств/родов.

Так, полевая коллекция малины ВИР в основном на Павловской и Майкопской опытных станциях ВИР (Юшев и др., 2016). Растения этих образцов много лет поддерживались в полевой коллекции ВИР и, судя по визуальным симптомам, накопили вирусные инфекции, в том числе RBDV. По данным диагностики 2013-2015 гг., 17 сортов из протестированных 41 сорта (41,5%) содержали вирус RBDV (Антонова и др., 2015). В отделе биотехнологии ВИР был разработан метод комплексной термо- химиотерапии.

Коллекция картофеля ВИР насчитывает более 8500 образцов (Киру, Рогозина, 2017) культурных и дикорастущих видов картофеля, селекционных сортов и гибридных форм. Большинство из образцов дикорастущих видов и культурных диплоидных видов сохраняется в виде семян (за исключением небольшого числа триплоидных и пентаплоидных видов картофеля). Образцы аборигенных и селекционных сортов поддерживаются в виде клубней. Один из наиболее ценных разделов коллекции – чилийские аборигенные сорта (*Solanum tuberosum* L.), которые представляют интерес как для фундаментальных исследований вопросов происхождения возделываемого картофеля, так и для селекционной работы. Образцы чилийских аборигенных сортов поступали в коллекцию в результате экспедиционных сборов сотрудников ВИР, а также в ходе обменов между мировыми генбанками. Эти образцы многие десятки лет поддерживали в полевой коллекции ВИР на основе клубневых репродукций, что, судя по визуальным симптомам, привело к накоплению вирусных инфекций в растениях. Для оздоровления образцов полевой коллекции была инициирована *in vitro* коллекция протестированных сортов.

В отделе биотехнологии ВИР был разработан метод комплексной термо- химиотерапии для оздоровления микрорастений картофеля от вирусов PVX, PVY, PVS, PVM, PLRV (Антонова и др., 2017). Участником данной разработки была и Ю. В. Ухатова. В настоящей работе проведено сравнение эффективности двух методов антивирусной терапии – комплексной термо- химиотерапии (Антонова и др., 2017) и оптимизированного метода криотерапии, используемых для оздоровления микрорастений картофеля от вируса PLRV.

Сохранение *in vitro* коллекции образцов малины и картофеля в контролируемых условиях направлено на разработку по возможности единой стратегии и универсальных методов оздоровления, достаточно эффективных для большинства сохраняемых образцов.

Опираясь на данные литературных источников с учетом подходов, применяемых в мировых генбанках картофеля, можно сделать вывод о том, что универсальных методов

оздоровления нет. Учитывая разнообразие образцов в генбанках и множество вероятных патогенов, создаются разные комплексные системы оздоровления, как, например, в СИР и ИРК для картофеля. Эти схемы могут обеспечить разную степень оздоровления разнородного растительного материала, пораженного разными вирусами. Очевидна актуальность совершенствования существующих методов оздоровления вегетативно размножаемых растений от вирусных инфекций.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растительный материал

Материалом для исследования послужили 142 образца малины, ежевики и картофеля из *in vitro* коллекции ВИР (Приложение А). Каждый из 142 образцов в *in vitro* коллекции представлен одним генотипом (клоном). Микрорастения 47 сортов малины обыкновенной (*Rubus idaeus*), 20 сортов ежевики (подрод *Rubus*) и четырех образцов дикорастущих видов рода *Rubus* (*R. axillaris*, *R. illecebrosus*, *R. parvifolius*, *R. pyramidalis*) были использованы в экспериментах по микроразмножению, криоконсервации и оздоровлению от вирусных инфекций. Микрорастения 55 образцов 5 культурных видов картофеля (*S. chilotanum* (= *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*), *S. andigenum* (= *S. tuberosum* ssp. *andigenum*) *S. stenotomum*, *S. phureja*, *S. chaucha*, *S. juzepczukii*) послужили источниками эксплантов для экспериментов по криоконсервации и оздоровлению. *In vitro* растения 20 селекционных сортов картофеля были получены из коллекции Банка здоровых семян картофеля ВНИИКХ им. Лорха (Приложение А).

Материал для оценки образцов малины и ежевики по способности к микроразмножению представлен 41 селекционным сортом (29 сортов отечественной селекции, 12 - зарубежной) и двумя образцами дикорастущих видов малины, 20 селекционными зарубежными сортами и двумя образцами дикорастущих видов ежевики. Список сортов приведен в Таблице 1 Приложения. Образцы ежевики (клоны) были генотипированы ранее с использованием изоферментного анализа (Дунаева и др., 2005), сорта малины – с использованием SSR-анализа (Lamoureux et al., 2011).

Эксперименты по криоконсервации проводили с представителями культурных видов двух родов: *Solanum* и *Rubus*. При формировании выборки мы старались подобрать для каждой культуры генетически разнородный материал, относящийся к разным таксонам, зачастую отличающимся уровнем ploидности, эколого-географическими и молекулярно-генетическими характеристиками. Такой подбор генетически разнородного материала позволяет нам изучать влияние разных факторов (видовых и внутривидовых отличий, уровня ploидности и экологической приуроченности образцов) на жизнеспособность и регенерационную способность эксплантов после оттаивания в экспериментах по криоконсервации. Кроме того, апробация метода криоконсервации на генетически разнородном материале позволяет с высокой долей вероятности использовать разработанный протокол для создания в генбанках криоколлекций, включающих широкое генетическое разнообразие представителей изученных таксонов.

В качестве исходного материала для экспериментов по криоконсервации *R. idaeus* ($2n=2x=14$) были использованы 13 селекционных сортов малины красной отечественной и зарубежной селекции (Приложение А).

В качестве исходного материала для экспериментов по криоконсервации картофеля были использованы 20 селекционных сортов возделываемого картофеля (*S. tuberosum*, $2n=4x=48$), полученных в виде микрорастений из Банка здоровых семян картофеля ВНИИКХ им. Лорха: Барин, Брянский деликатес, Великан, Вымпел, Gala, Голубизна, Жигулёвский, Жуковский ранний, Ильинский, Импала, Колобок, Крепыш, Лорх, Метеор, Накра, Невский, Никулинский, Red Scarlett, Удача, Фиолетовый.

В этих же экспериментах изучали 35 образцов 5 культурных видов из коллекции ВИР, представленных местными аборигенными южноамериканскими сортами, которые в системе Hawkes (1990) видам: *S. stenotomum* (6 образцов), *S. phureja* (4 образца), *S. juzepczukii* Buk. (3 образца), *S. chaucha* Juz. et Buk. (8 образцов), *S. tuberosum ssp. tuberosum* Juz. et Buk. (10 образцов), *S. tuberosum ssp. andigenum* (4 образца) (Приложение А).

Виды *S. stenotomum* и *S. phureja* являются диплоидами ($2n=2x=24$), *S. chaucha* и *S. juzepczukii* - триплоидами ($2n=3x=36$), *S. tuberosum ssp. tuberosum* и *ssp. andigenum* - тетраплоидами ($2n=4x=48$). Перечисленные образцы были собраны экспедициями ВИР, а также международными экспедициями, проведенными в разные годы в различных странах Южной Америки; для этих образцов известны эколого-географические характеристики, что позволило нам разделить их на две контрастные группы: (1) образцы чилийских сортов, собранные в прибрежных районах Чили и на прилегающих островах (0-200 м над ур. м. и (2) образцы высокогорных (3300-4000 м над ур. м.) андийских видов. Судя по литературным данным, высокогорные виды отличаются холодостойкостью, а также устойчивы к кратковременным заморозкам (Букасов, 1931). Следует отметить, что для большинства образцов видов *S. juzepczukii* и *S. chaucha* высоту точки сбора находили на сайте CIP (<http://www.cip.com>). Для образцов *S. tuberosum ssp. tuberosum* в паспортной базе данных ВИР не указана высота точек сбора, поэтому её определяли с помощью специализированного сайта (<http://www.latlong.ru/#3>).

Данные образцы картофеля ранее были хорошо охарактеризованы – генотипированы с использованием SSR-маркеров, охарактеризованы по числу хромосом, многочисленным морфологическим признакам, а образцы нескольких видов - также по признакам устойчивости к золотистой картофельной нематодe и возбудителю рака картофеля (Gavrilenko et al., 2010, 2013; Khutti et al., 2012; Limantseva et al., 2014). Эти образцы поддерживаются в отделе биотехнологии ВИР в клоновой *in vitro* коллекции, создание дублетной криоколлекции для таких образцов актуально.

Для оздоровления микрорастений малины от RBDV были выбраны клоны микрорастений двух сортов (Новокитаевская, Самарская Плотная), содержащие RBDV.

Материалом для оздоровления картофеля от вируса PLRV послужили 20 клонов 15 образцов чилийских аборигенных сортов картофеля *S. tuberosum*, пораженных PLRV, из полевой коллекции ВИР (Приложение А).

2.2. Методы исследований

В настоящей работе использовали общепринятые методы культуры *in vitro* с небольшими модификациями, разработанными для представителей рода *Rubus* (Reed, 1990; Дунаева и др., 2011) и *Solanum* (Трускинов, 1987; Дунаева и др., 2011).

2.2.1. Оценку способности к «эффективному клональному микроразмножению» коллекционных образцов малины и ежевики проводили в соответствии со схемой В.-М. Reed (1990). В качестве эксплантов использовали одноузловые черенки микрорастений, по 15 на генотип для каждой повторности. Через шесть недель культивирования на питательной среде №I (Мурасиге и Скуга (МС) + 1 мг/л бензоаминопурина (БАП) + 0,1 мг/л индолил-масляной кислоты (ИМК)) подсчитывали коэффициент микроразмножения (КМР) эксплантов. «Эффективным клональным микроразмножением» согласно В.-М. Reed (1990) считали образование в течение шести недель из одного исходного экспланта как минимум трех новых побегов ($KMP \geq 3$), на каждом из которых сформировалось не менее двух почек (рис. 2).

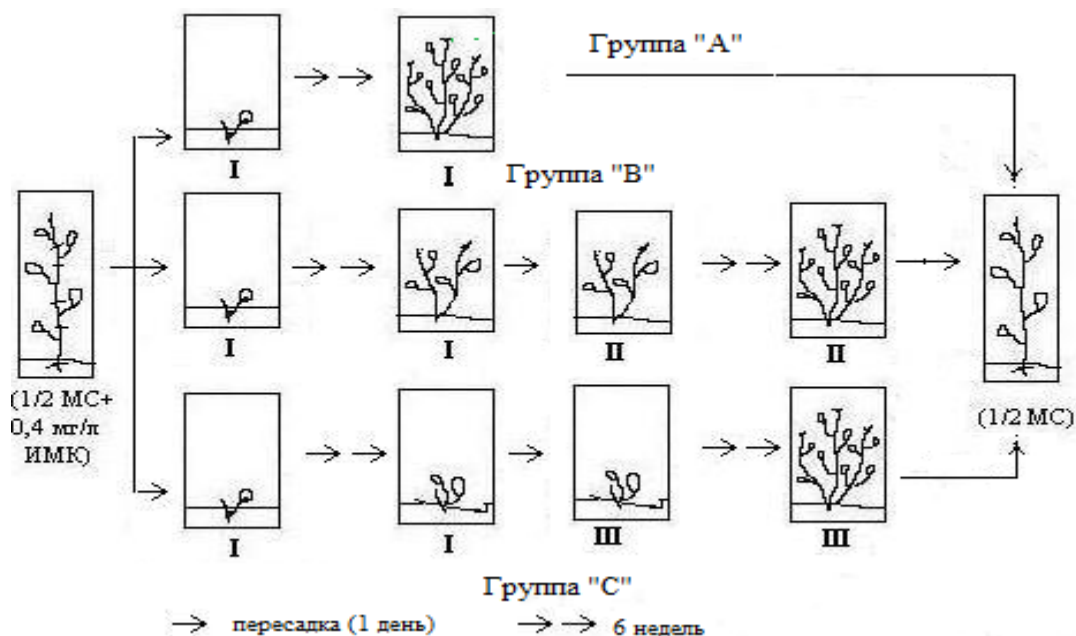


Рисунок 2 – Схема опыта по изучению способности образцов «эффективному клональному микроразмножению».

Питательные среды: №I – Мурасиге и Скуга (МС) + 1 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИМК; №II – МС + 1 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИМК + 0,1 мг/л ГК; №III – Андерсона + 1 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИМК

Образцы со значениями $KMP \geq 3$ после 6-недельного культивирования на питательной среде №I были отнесены к группе «А», в дальнейшем микрорастения этих образцов переносили

на среду $\frac{1}{2}$ МС без гормонов для среднесрочного *in vitro* хранения. Образцы, экспланты которых имели низкие значения КМР (<3) к концу шестой недели культивирования на питательной среде №I, разделялись на две группы - «В» и «С»:

- в группу «В» включали образцы с хорошо развитыми зелеными микропобегами, для «эффективного микроразмножения» их переносили на питательную среду №II (МС + 1 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИМК + 0,1 мг/л гиббереллина (ГК));

- в группу «С» относили образцы с ослабленными бледно-зелеными микропобегами, которые переносили на питательную среду №III (Андерсона + 1 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИМК) для достижения более высоких коэффициентов микроразмножения.

Микропобеги образцов из групп «В» и «С» культивировали дополнительные шесть недель на питательных средах №II и №III, соответственно (см. рис. 2). В конце этого срока вновь учитывали показатели КМР, после чего микрорастения переносили на среду $\frac{1}{2}$ МС (МС с половинным составом макросолей и утроенным количеством хелата железа) без гормонов (Немцова и др., 2009; Дунаева и др., 2011).

2.2.2. Метод капель-витрификации для криоконсервации образцов малины, ежевики, картофеля

Для экспериментов по криоконсервации почек микрорастений использовали оригинальный метод **капель-витрификации (DV)**, разработанный В. Panis et al. (2005), с учетом модификаций (Дунаева и др., 2011). Оптимизированный в рамках настоящей работы протокол «DV-biotech» включал следующие этапы (табл. 8) (Ухатова и др., 2017; Ukhatova et al., 2017). Изолированные экспланты (верхушечные и пазушные почки размером 1,1-1,8 мм) помещали в жидкую среду МС с 3% сахарозой без гормонов для предотвращения высыхания на 1 час и далее переносили в растворы криопротекторов: LS (Loading Solutions – МС с добавлением 2М глицерола и 0,4М сахарозы, Matsumoto et al., 1994) на 20 минут при 20°C на свету, затем в раствор PVS2 – Plant Vitrification Solution (МС с добавлением 3,26М глицерола, 2,42М этиленгликоля, 1,9М диметил сульфоксида (ДМСО) и 0,4М сахарозы, Sakai et al., 1990) на 30 минут при 0°C (на льду) на свету. В последние минуты обработки раствором PVS2 экспланты переносили в индивидуальные капли того же раствора объемом 3 мкл, нанесенные на полоски алюминиевой фольги, и быстро погружали в криобирки с жидким азотом на 1 час. Для оттаивания эксплантов полоски фольги с нанесенными на них эксплантами переносили в раствор RS (Rewarming Solution, МС с добавлением 1,2М сахарозы, Sakai, 1997) на 15 минут при 20°C на свету. Для получения криорегенерантов экспланты после оттаивания помещали на агаризованную питательную среду МСТо с 3% сахарозой, дополненную зеатин-рибозидом (0,5

мг/л), ИУК (0,5 мг/л) и ГК (0,2 мг/л) (Towill, 1983) и культивировали при температуре 22°C и фотопериоде 16 часов.

Растворы фитогормонов фильтровали через стерильный мембранный фильтр (фильтры Millex-GV, диаметр пор 0,22 мкм) и вносили в проавтоклавированную агаризованную питательную среду с температурой около 50°C, после чего разливали по чашкам Петри. Растворы LS и PVS2 не автоклавировали, стерилизовали через мембранный фильтр (фильтры Millex-GV, диаметр пор 0,45 мкм). Раствор RS автоклавировали при 121°C 20 минут. Все растворы и среды хранили в холодильнике при 4°C, кроме LS и PVS2, которые помещали в морозильник при –18°C и размораживали непосредственно перед работой.

Таблица 8 – Основные этапы модифицированного метода дроплет-витрификации – «DV- biotech», использованного для криоконсервации представителей родов *Rubus* и *Solanum*

№	Этап	Условия опыта	
		Сорта малины и ежевики	Образцы картофеля
1	Подготовка растительного материала	Культивирование микрорастений на питательной среде МС, дополненной БАП (0,5 мг/л), ИМК (0,05 мг/л) и 3% сахарозой (Wang et al., 2005), при 22°C с 16-часовым фотопериодом в течение 4-6 недель.	Культивирование микрорастений на питательной среде МС без фитогормонов с 3% сахарозой (Дунаева и др., 2011) при 22°C с 16-часовым фотопериодом в течение трех недель.
2	Изоляция почек	Экспланты (верхушечные и пазушные почки размером 1,1-1,8 мм) помещали в жидкую среду МС без гормонов при 20°C на свету для предотвращения высыхания.	
3	Обработка эксплантов растворами с криопротекторами	Экспланты помещали в чашки Петри с раствором LS (Loading Solutions, МС с добавлением 2М глицерола и 0,4М сахарозы, Matsumoto et al., 1994) на 20 минут при 20°C на свету ; затем - с раствором PVS2 (Plant Vitrification Solution, МС с добавлением 3,26М глицерола, 2,42М этиленгликоля, 1,9М диметилсульфоксида (ДМСО) и 0,4М сахарозы, Sakai et al., 1990) на 30 минут при 0°C (на льду) на свету. На последних минутах обработки раствором PVS2 экспланты помещали в индивидуальные капли того же раствора объемом 3 мкл, нанесенные на полоски алюминиевой фольги размером 0,5x2,0 см (по 5 капель раствора PVS2 на полоске).	
4	Криоконсервация/ погружение в жидкий азот	Быстрое погружение полосок фольги с эксплантами в криопробирки с жидким азотом (2 полоски по 5 эксплантов, т.е. 10 эксплантов в одну криопробирку) в сосуд Дьюара на разные сроки в зависимости от цели: на 1 час – для оценки посткриогенной регенерации, на долгосрочное криохранение в криобанке ВИР – для пополнения криоколлекции. Контрольные экспланты не замораживали в жидком азоте!	
5	Оттаивание	Для оценки посткриогенной регенерации полоски фольги с эксплантами из криопробирок с жидким азотом переносили в раствор RS (Rewarming Solution, МС с добавлением 1,2М сахарозы, Sakai, 1997) на 15 минут при 20°C на свету . Контрольные экспланты помещали в раствор RS прямо из PVS2.	
6	Учет регенерационной способности	Экспланты помещали на агаризованную питательную среду МСТо с 3% сахарозой, дополненную зеатин-рибозидом (0,5 мг/л), ИУК (0,5 мг/л) и ГК (0,2 мг/л) (Towill, 1983), культивировали при постоянной температуре 22°C с 16-часовым фотопериодом. Процент выживших и регенерировавших эксплантов отмечали на третьей, шестой и восьмой неделе после оттаивания.	

Эффективность криоконсервации оценивали по следующим показателям, которые используются в литературе:

- (1) выживаемость или жизнеспособность эксплантов – число (%) зеленых почек на питательной среде MSTo; параллельно учитывался и процент некротизировавшихся эксплантов;
- (2) эффективность регенерации или регенерационная способность – число (%) эксплантов, сформировавших микропобег(-и) на питательной среде MSTo к 8 неделе после размораживания;
- (3) динамика формирования регенерантов – число (%) эксплантов с регенерантами на 3, 6 и 8 неделях после размораживания.

Криоконсервация каждого образца выполнена в трех повторностях. В качестве контроля в каждой повторности использовано 10 эксплантов на образец, которые проходили этапы 1, 2, 3, 5 и 6, без этапа 4 (погружение в жидкий азот) (табл. 8). Для оценки регенерационной способности образца после криоконсервации в каждой повторности было изолировано по 20 эксплантов, которые проходили все этапы (1 – 6) данного протокола. Одновременно в каждой повторности изолировали дополнительные 30 эксплантов каждого образца для закладки их на длительное криохранилище в биокриокомплексе ВИР, т.е. данные 30 эксплантов проходили только этапы 1 – 4, без этапов 5 и 6 (оттаивание и учет регенерационной способности). Таким образом, для одной повторности опыта было изолировано по 60 эксплантов.

2.2.3. Оздоровление микрорастений малины и картофеля от вирусов

Для детекции вирусных инфекций в исходных и полученных после антивирусной терапии микрорастениях применяли методы иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Метод ИФА. Детекцию RBDV и PLRV проводили методом ИФА с использованием набора реактивов фирмы Agdia, включавшего позитивный и негативный контроли. Для тестирования использовали листья полевых и *in vitro* растений; в последнем случае брали нижние листья развитых микрорастений после 2-3 месяцев культивирования. Растительный материал растирали в жидком азоте до состояния мелкого порошка, добавляли лизирующий буфер и далее следовали протоколу, рекомендованному фирмой-изготовителем (<https://www.agdia.com>). По результатам ИФА был проведен отбор зараженных PLRV и RBDV пробирочных растений, каждое из которых маркировали и размножали черенкованием для проведения опытов по оздоровлению, оставляя нижнюю часть микрорастений для выделения из них РНК с целью последующего использования полученных препаратов РНК в качестве положительных контролей при проведении последующих реакций/тестов.

Метод ОТ-ПЦР. Выделение РНК. Тотальную РНК, потенциально включающую РНК вирусных геномов, выделяли из нижних листьев развитых пробирочных растений. Выделение РНК малины проводили при помощи коммерческого препарата трезол, используя набор «Реагент ExtractRNA, #BC032» фирмы Евроген (<http://www.evrogen.ru/>). Тотальную РНК картофеля выделяли при помощи коммерческого набора «Выделение тотальной РНК на магнитных частицах, покрытых SiO₂» фирмы Силекс М (<http://sileks.com/>). Полученные препараты РНК малины и картофеля хранили при -70°C.

Синтез кДНК. Синтез первой нити кДНК проводили в 25 мкл реакционной смеси состава: 2 мкл РНК, 1× реакционный буфер, 400 мкМ dNTP's, 0,5 мкг смеси случайных гексапраймеров, 1 ед/мкл РНКазина, 4 ед/мкл обратной транскриптазы М-MLV-ОТ. Для отжига гексануклеотидных праймеров инкубировали смесь в течении 10 мин при 25°C и затем при температуре 37°C в течение 60 минут. Полученную матрицу использовали для проведения ПЦР с праймерами, специфичными к последовательностям генома PLRV.

Проведение ПЦР. Для тестирования микрорастений малины на присутствие вируса RBDV использовали праймеры, специфичные к последовательностям генома данного вируса (Немцова, 2009, табл. 9).

Для тестирования микрорастений картофеля на присутствие вируса использовали праймеры, специфичные к последовательностям генома вируса PLRV (Singh, 1999). Контролем эффективности синтеза матрицы служила реакция с праймерами, специфичными к последовательности гена белка тубулина (табл. 9). В качестве позитивных контролей использовали РНК исходных микрорастений каждого клона с детектированным ранее вирусом (см. раздел ИФА). В качестве негативного контроля брали воду.

Таблица 9 – Праймеры для выявления вирусов RBDV и PLRV

Детектируемый патоген	Праймер	Последовательность (5' - 3')	Ссылка
RBDV	RBDV-CP+2	ttc ttt tgt cgg gtt cag tga g	Немцова, 2009
	RBDV-CP-2	aac tat tgt gga gga ttt gc	
	RBDV-CP+3	gac atg tat atg tct gct aag g	
	RBDV-CP-3	tgt cgt cga cgg cac cgc cc	
PLRV	PLRV-f	cgc gct aac aga gtt cag cc	Singh, 1999
	PLRV-r	gca atg ggg gtc caa ctc at	
Контроль синтеза матрицы	tubul-f	atg ttc agg cgc aag gct t	Nicot et al., 2005
	tubul-r	tct gca acc ggg tca ttc at	

Электрофорез. ПЦР-продукты разделяли при помощи электрофореза в 2,5 % агарозных гелях. В качестве стандартов для определения молекулярного веса полученных фрагментов

использовали стандарты молекулярного веса «100 bp+1500» фирмы СибЭнзим (<http://russia.sibenzyme.com/>). Гели окрашивали бромистым этидием с последующей визуализацией фрагментов ДНК в УФ-свете с помощью системы гель-документации GelDoc (BioRad, USA). Наличие у данного клона диагностического фрагмента обозначали цифрой «1», отсутствие – цифрой «0», информация была занесена в электронную базу данных в формате Microsoft Excel-2003.

Для проведения работ по **оздоровлению образцов** клоны из полевых коллекций с детектированными вирусами были введены в культуру *in vitro* в виде апексов крупного размера. После введения выбранных клонов в стерильные условия процедуру тестирования повторяли, и микрорастения малины и картофеля, содержащие вирус RBDV или PLRV, соответственно, включали в оздоровление.

Оздоровление микрорастений малины от RBDV проводили в трех вариантах (А-Б-В) опытов: А- криотерапии, Б- химиотерапии, В –комбинированной терапии (совместное действие термо- и химиотерапии); схема экспериментов приведена на рисунке 3.

Для криотерапии образцов малины была использована модификация метода капель-витрификации «DV-biotech») без каких-либо дополнительных манипуляций (см. выше, раздел «криохранение»). В качестве эксплантов изолировали только верхушечные почки размером 1,1-1,8 мм. Опыты были проведены в трех повторностях. Инфицированные образцы изучали, не закладывая в криотанк, т.е. оздоравливаемые экспланты прошли все этапы (1-6) метода капель-витрификации. Отметим, что метод капель-витрификации был применен для криотерапии образцов малины впервые.

В вариантах химиотерапии в питательную среду ($\frac{1}{2}$ МС + 0,1 мг/л ИМК + 0,1 мг/л ГК) добавляли рибавирин (Sigma, #R9644-50) в концентрации 30 мг/л; стерилизацию осуществляли фильтрованием (фильтры Millex-GV, диаметр пор 0,22 мкм). В опытах по химиотерапии верхние части побегов микрорастений длиной одно-два междоузлия помещали на питательную среду с противовирусными агентами и выдерживали материал в течение 4 недель на светоустановке при температуре 24-26°/18-20°С, фотопериод – 16/8 часов. Затем у подросших микрорастений отсекали верхние части побегов длиной одно-два междоузлия, переносили их на свежую среду того же состава, и процедуру химиотерапии повторяли. Всего было проведено три цикла обработки материала химическими препаратами.

В вариантах комбинированной терапии микрорастения, культивируемые на питательной среде $\frac{1}{2}$ МС + 0,1 мг/л ИМК + 0,1 мг/л ГК с рибавирином (30 мг/л), в течение 4 недель инкубировали при постоянной повышенной температуре (35°С) в камере Barnsted (фотопериод – 16/8 часов). Затем от микрорастений отсекали верхние части побегов длиной 1 -2 междоузлия,

переносили их на свежую питательную среду того же состава, и процедуру комплексной терапии повторяли снова.

1. Тестирование микрорастений малины методом ИФА на наличие RBDV		
2. Микроразмножение <i>in vitro</i> растений, содержащих RBDV (Черенкование микрорастений по 30 черенков на среде МС +0,5мг/л БАП+0,01мг/л ИМК; культивирование 3 недели при 25°С)		
3. Оздоровление микрорастений:		
3А Криотерапия («DV-biotech»)	3Б. Химиотерапия	3В. Комплексная терапия (химиотерапия и термотерапия)
Этап 3А.1. Изоляция почек 5-недельных микрорастений в жидкую среду МС, обработка растворами для осмо- и криопротекции (LS, PVS2)	Этап 3Б.1. Перенос верхних частей побегов (1-2 междоузлия) на питательную среду МС+30 мг/л рибавирина; культивирование 4 недели при 24-26°С	Этап 3.В.1. Перенос верхних частей побегов (1-2 междоузлия) на питательную среду МС+30 мг/л рибавирина; культивирование 4 недели при 35°С
Этап 3А.2. Замораживание эксплантов в жидком азоте на 1 ч	Этап 3Б.2. Перенос верхних частей побегов (длиной 1-2 междоузлия) на питательную среду МС+30 мг/л рибавирина; культивирование 4 нед. при 24-26°С	Этап 3.В.2. Перенос верхних частей побегов (длиной 1-2 междоузлия) на питательную среду МС+30 мг/л рибавирина; культивирование 4 недели при 35°С
Этап 3А.3. Оттаивание эксплантов в растворе (RS)	Этап 3Б.3. Перенос верхних частей побегов (длиной 1-2 междоузлия) на питательную среду МС+30 мг/л рибавирина; культивирование 4 нед. при 25°С	Этап 3.В.3. Перенос верхних частей побегов (длиной 1-2 междоузлия) на питательную среду МС+30 мг/л рибавирина; культивирование 4 нед. при 25°С
Этап 3.А.4. Учет регенерационной способности в течение 8 недель на среде МС с ИУК, зеатин-рибозидом и ГК. Перенос посткриогенных регенерантов на среду ½МС без гормонов; культивирование 4 недели. Выделение РНК из криорегенерантов.	Этап 3.4. Перенос верхних частей микропобегов (длиной 1-2 междоузлия) на свежую среду без рибавирина; культивирование 4 недели при 24-26°/18-20°С. Выделение РНК из целых микрорастений.	
4. Тестирование микрорастений на наличие RBDV методами ИФА* и ОТ-ПЦР		
5. Микроразмножение оздоровленного от RBDV материала		

Рисунок 3 – Схема оздоровления микрорастений малины от RBDV.

На третьем этапе растения инкубировали на среде с рибавирином (30 мг/л) при 24-26°/18-20°С. Всего при комплексной терапии было проведено два цикла термообработки и три

цикла химиотерапии рибавирином. Прошедшие оздоровление микрорастения помещали на питательную среду без противовирусных реагентов и через 3 месяца анализировали на присутствие RBDV методом ИФА.

По данным Е.В. Немцовой с соавторами (2015), «на территории Брянской области предположительно распространены изоляты из семейства RB, имеющие высокое сходство с изолятами ВККМ из Белоруссии», что было установлено при анализе нуклеотидных последовательностей гена белка оболочки и гена транспортного белка вируса кустистой карликовости малины. Для быстрого и эффективного обнаружения вируса RBDV в растениях малины ранее была разработана система праймеров для анализа вируса с помощью обратной транскрипции - ПЦР, получен патент на изобретение (Заякин и др., 2009). Поскольку, вероятно, штаммы вируса в Брянской области типичны для европейской части России, мы использовали те же праймеры в своей работе (табл. 9).

Оздоровление микрорастений картофеля от PLRV проводили в двух вариантах: криотерапии и комбинированной термо- и химиотерапии (рис. 4).

1. Тестирование микрорастений методом ОТ-ПЦР на наличие PLRV	
2. Микроразмножение <i>in vitro</i> растений, инфицированных PLRV (Черенкование микрорастений по 30 черенков на среде МС без гормонов; культивирование 3 недели при 25°C)	
3. Оздоровление микрорастений	
3.1. Криотерапия («DV-biotech»):	3.2. Комплексная термо-и химиотерапия:
Этап 3.1.1. Изоляция почек в жидкую среду МС, обработка растворами для осмо- и криопротекции (LS, PVS2)	Этап 3.2.1. Формирование безлиственных черенков; культивирование микрорастений на среде МС+30 мг/л рибавирина в течение 2-3 дн. при 20°C, затем 4 недели при 35°C
Этап 3.1.2. Замораживание эксплантов в жидком азоте на 1 ч	Этап 3.2.2. Формирование безлиственных черенков; культивирование микрорастений на среде МС+30 мг/л рибавирина в течение 2-3 дн. при 20°C, затем 4 недели при 35°C
Этап 3.1.3. Оттаивание эксплантов в растворе (RS)	Этап 3.2.3. Формирование безлиственных черенков; культивирование микрорастений на среде МС+30 мг/л рибавирина в течение 4 недель при 20°C.
Этап 3.1.4. Учет регенерационной способности в течение 8 недель. Перенос посткриогенных регенерантов на среду МС без гормонов; культивирование 4 недели. Выделение РНК из криорегенерантов.	Этап 3.2.4. Перенос микрорастений на среду МС без гормонов, культивирование 4 недели при 20°C в течение 2 мес. Выделение РНК из микрорастений.
4. Тестирование микрорастений методом ОТ-ПЦР на наличие PLRV	
5. Микроразмножение оздоровленного от PLRV материала	

Рисунок 4 – Схемы оздоровления микрорастений картофеля от PLRV методами криотерапии и комбинированной терапии, использованные в работе.

Для криотерапии образцов картофеля использовали метод капель-витрификации – протокол «DV-biotech» без каких-либо дополнительных манипуляций (см. выше, раздел «криоконсервация»). Изолировали только верхушечные почки (по 20 на повторность). Опыты были проведены в трех повторностях. Для образцов с детектированными вирусами проводили оценку посткриогенного восстановления, не закладывали их в криотанк, т.е. оздоравливаемые экспланты прошли все этапы (1–6) капель-витрификации. Экспланты оттаивали в растворе RS в течение 15 мин при комнатной температуре, затем помещали на питательную среду МСТо (табл. 8).

Для комплексной термо- химиотерапии использовали схему оздоровления микрорастений картофеля от вирусов PVX, PVY, PVS, PVM, PLRV, разработанную в отделе биотехнологии ВИР (Антонова и др., 2017). Участником данной работы была и автор настоящего исследования. Эффективность данного метода комплексной термо- химиотерапии сравнивали с методом криотерапии, оптимизированного в рамках диссертационной работы.

В основу этой схемы комбинированной термо- и химиотерапии (рис. 4) были положены протоколы, которые используют в генбанках СІР и ІРК (Salazar, 1999), а также в отделе биотехнологии ВИР (Антонова и др., 2015, 2017). От протокола ІРК наша схема отличилась одновременным, а не последовательным воздействием противовирусных препаратов и повышенной температуры, а от схемы СІР – меньшим числом этапов терапии.

Комплексная терапия включала три этапа продолжительностью 4 недели каждый, в течение которых микрорастения выдерживали на питательной среде МС без гормонов с добавлением рибавирина (30 мг/л) при повышенной температуре (37°C), после чего пробирочные растения переносили на свежую среду того же состава и культивировали их при 26°C в течение одного месяца. Прошедшие оздоровление микрорастения помещали на питательную среду без противовирусных реагентов и через 3 месяца анализировали на присутствие PLRV методом ОТ-ПЦР.

2.2.4. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью методов вариационной статистики (t-критерий Стьюдента, χ -квадрат, доверительные интервалы, метод ϕ (Фишера), коэффициента ранговой корреляции Спирмена r_s , компьютерная программа StatSoft STATISTICA 6.0 (модули одно- и многофакторного анализа) при уровне значимости 0,05. Опыты проводили в трехкратной повторности.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изучение способности к «эффективному клональному микроразмножению»

образцов малины и ежевики из *in vitro* коллекции ВИР

В таблице 10 представлены результаты оценки коэффициента микроразмножения (КМР) у образцов малины и ежевики из *in vitro* коллекции ВИР.

Таблица 10 – Состав групп («А», «В», «С») образцов малины (подрод *Idaeobatus*) и ежевики (подрод *Rubus*), выделенных по способности к «эффективному микроразмножению»

Группа «А» КМР \geq 3 на среде №I на 6 неделе культивирования				Группа «В» КМР на средах №I (6 недель / №II (12 недель)		Группа «С» КМР на средах №I (6 недель) / №III (12 недель)
Ежевика:		Малины:		Ежевика:	Малины:	Малины:
Ashton Cross 5,5 \pm 0,9	Logan Thornless 3,6 \pm 0,2	<i>R. pyramidalis</i> и-589009 3,1 \pm 0,1	Барнауль- ская 3,3 \pm 0,1	Cascade 1,5 \pm 0,1 / 3,4 \pm 0,2	Красноплод- ный сеянец 2,6 \pm 0,3 / 3,8 \pm 0,2	Bababerry 2,1 \pm 0,4 / 3,2 \pm 0,2
Bodega Bay 3,2 \pm 0,2	Merton Thornless 3,1 \pm 0,2	Cumberland 3,0 \pm 0,0	Глория х НК (2) 3,1 \pm 0,3	Nc861402 2,1 \pm 0,3 / 3,2 \pm 0,2	Суздальская 2,5 \pm 0,3 / 3,5 \pm 0,2	Canby 2,4 \pm 0,2 / 3,8 \pm 0,2
Evergreen Thornless 3,2 \pm 0,2	Whitford Thornless 3,1 \pm 0,3	Rubin bulgarski 3,8 \pm 0,3	Память Горького 3,0 \pm 0,0		Урожайная 1,9 \pm 0,2 / 3,9 \pm 0,2	Chief 1,6 \pm 0,3 / 3,0 \pm 0,2
Brazos 3,7 \pm 0,2	<i>R.</i> <i>illecebrosus</i> и-588477 5,9 \pm 0,5	Nootka 3,1 \pm 0,2	Sentry 4,0 \pm 0,3		Cornoelles Victoria 2,1 \pm 0,2 / 3,3 \pm 0,2	Festival 1,1 \pm 0,1 / 3,0 \pm 0,1
Cherokee 4,9 \pm 0,3	Silvan 3,9 \pm 0,6	Mandarin 5,3 \pm 0,2	Бабье лето-2 3,4 \pm 0,2		Summit 1,5 \pm 0,2 / 3,6 \pm 0,2	<i>R. parvifolius</i> , и-588463 1,2 \pm 0,2 / 3,1 \pm 0,2
Darrow 4,4 \pm 0,3	Young 3,1 \pm 0,3	Trent 3,2 \pm 0,2	Вислуха 3,3 \pm 0,2			Грушовка 1,9 \pm 0,4 / 3,3 \pm 0,3
Dirskan Thornless 4,9 \pm 0,4	<i>R. axillaris</i> и-588614 3,1 \pm 0,1	Искра 3,1 \pm 0,1	Белая Спирина 3,9 \pm 0,2			Гусар 2,5 \pm 0,2 / 3,3 \pm 0,2
Агавам 3,1 \pm 0,2	Waldo 3,0 \pm 0,2	Каскад 3,2 \pm 0,2	Таганка 3,5 \pm 0,2			Краснокутская 2,6 \pm 0,2 / 3,5 \pm 0,2
Ebano 3,4 \pm 0,1	Orus 1063 3,5 \pm 0,2	Шарташская 3,1 \pm 0,2	Местная 3,1 \pm 0,2			Любительская 1,8 \pm 0,5 / 3,5 \pm 0,3
Boysen 3,1 \pm 0,1	Santiam 3,3 \pm 0,2	Скромница 3,0 \pm 0,0	Метеор 3,3 \pm 0,3			Марьянушка 1,3 \pm 0,2 / 3,2 \pm 0,2
		Сормовичка 3,0 \pm 0,2	Надежда 3,0 \pm 0,0			Ранняя сладкая 2,2 \pm 0,3 / 3,4 \pm 0,2
		Ивушка 4,0 \pm 0,3	Прогресс 3,0 \pm 0,2			Самарская плотная 1,8 \pm 0,3 / 3,7 \pm 0,3
		Sentry 4,0 \pm 0,3				

Примечание. Указаны значения коэффициентов микроразмножения (КМР) при культивировании в течение 6 и 12 недель на питательных средах №I, №I/№II, №I/III

«Эффективным клональным микроразмножением» согласно В.-М. Reed (1990) считали образование из одного исходного экспланта как минимум трех новых побегов ($KMP \geq 3$), на каждом из которых сформировалось не менее двух почек.

В целом 45 (25 образцов малины и 20 образцов ежевики) из 65 (69%) образцов были отнесены к группе «А», эти образцы проявили способность к «эффективному клональному микроразмножению» уже к концу 6 недели культивирования на питательной среде №I (табл. 10). Эти образцы были представлены генетически разнородным материалом. Оставшиеся 20 (31%) образцов в тех же условиях на среде №I имели низкие значения КМР. Эти образцы были поделены на две группы («В» и «С») по внешнему виду микропобегов. В группу «В» включили 7 образцов, группу «С» составили 13 образцов (12 сортов малины, 1 видообразец малины) с ослабленными эксплантами. Для 20 образцов удалось достичь значений $KMP \geq 3$ после дополнительного 6-недельного культивирования микрорастений на питательных средах: №II – для 7 (11%) образцов группы «В» и №III – для 13 (20%) образцов группы «С» (табл. 10).

На основании полученных результатов выборка из 65 образцов была структурирована на три группы «А», «В» и «С» по способности к микроразмножению.

Состав образцов в группах «А», «В», «С» в разных повторностях опыта достоверно совпадал согласно критерию $\chi^2(0,68 < 5,99, p < 0,05)$ и коэффициенту ранговой корреляции Спирмена ($r_s = 0,77, p < 0,01$). Результаты однофакторного дисперсионного анализа показали существенное ($p < 0,05$) влияние фактора «генотип» и фактора принадлежности к группе образцов ежевик (подрод *Idaeobatus*) или малин (подрод *Rubus*) на способность образцов к клональному микроразмножению (табл. 11).

Таблица 11 – Результаты оценки влияния различных факторов на способность образцов малины и ежевики к «эффективному клональному микроразмножению» на среде №I с использованием однофакторного дисперсионного анализа (модуль ANOVA)

Фактор	Число степеней свободы	p
Генотип	64	0,026918*
Подрод	1	0,001763*

Примечание. *- значимо при $< 0,05$

У образцов ежевики значения КМР на питательной среде №I были существенно ($p < 0,01$) выше, чем у изученной выборки образцов малин (см. табл. 10). Для подавляющего большинства (20 из 22, 90%) образцов ежевики можно добиться «эффективного микроразмножения» за 6 недель культивирования на питательной среде №I (МС с 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИМК), и только

для 10% образцов был необходим перенос на среду №II. В группе «С», представленной образцами с низкими значениями КМР на среде №I, плохо адаптирующимися к условиям *in vitro*, не было ни одного образца ежевики. В то же время около половины (42%) образцов малины характеризовались низкими значениями КМР на среде №I и нуждались в двухэтапном культивировании (по схемам №I/№II или №I/№III) для достижения $KMP \geq 3$. Таким образом, образцы малины были более требовательными к составу питательных сред.

Использование разных схем культивирования позволило достичь показателей «эффективного клонального микроразмножения» для всех 65 образцов выборки, хотя и при разных схемах культивирования, и за разный временной период.

Полученные результаты указывают на статистически достоверное ($p < 0,05$) влияние генотипа на способность микрорастений малины и ежевики к «эффективному микроразмножению». Наиболее высокие значения КМР в течение 6 недель на среде №I отмечены у образцов ежевики Ashton Cross ($5,5 \pm 0,9$), Cherokee ($4,9 \pm 0,3$), Silvan ($3,9 \pm 0,6$), *R. illecebrosus* ($5,9 \pm 0,5$), образцов малины Mandarin ($5,3 \pm 0,2$), Rubin bulgarski ($3,8 \pm 0,3$), Белая Спирина ($3,93 \pm 0,21$), Ивушка ($4,0 \pm 0,3$). Низкие значения КМР на питательной среде №I выявлены у образцов малины Festival ($1,1 \pm 0,1$), *R. parvifolius* ($1,2 \pm 0,2$), Марьянушка ($1,3 \pm 0,2$), Советская ($1,4 \pm 0,4$). Наши результаты согласуются с данными других исследователей о существенном влиянии генотипа на эффективность клонального микроразмножения образцов малины и ежевики (Reed, 1990; Сковородников, 2004; Нам, 2004; Соловых, 2013, 2014; Уланович, Сковородников, 2014, Иванова-Ханина, 2015).

Полученные результаты согласуются с данными В.-М. Reed (1990), согласно которым 153 из 256 (70%) образцов из *in vitro* коллекции рода *Rubus* генбанка США могут быть эффективно размножены на одной и той же питательной среде №I; в этой же работе сообщалось о более высокой способности к микроразмножению образцов ежевики по сравнению с образцами малины.

Таким образом, использование разных схем культивирования позволило достичь показателей «эффективного микроразмножения» для всех образцов выборки - 65 сортов малины и ежевики.

Генотипы из группы «А» с высокими показателями КМР и быстрыми темпами микроразмножения отбирались для экспериментов по криоконсервации.

3.2. Оптимизация протокола дроplet-витрификации (DV) для криоконсервации образцов малины – анализ литературных данных, выбор оптимального типа эксплантов и продолжительности их обработки раствором криопротекторов

Известны работы по криоконсервации образцов рода *Rubus* с использованием методов медленного замораживания (Reed, 1987; Высоцкая, Попов, 2005), инкапсуляции-дегидратации (Wang et al., 2005; Gupta, Reed, 2006), витрификации (Ковальчук и др., 2014). Самая крупная и представительная криоколлекция образцов рода *Rubus* сохраняется в NLGRP (National Laboratory for Genetic Resources Preservation, Форт Колинс, США), она включает около 210 образцов 39 видов рода *Rubus*, криоконсервированных в разные годы перечисленными выше методами. Отметим, что в последнее время плановое пополнение криоколлекции США проводят методом дроplet-витрификации (Jenderek, Reed, 2017).

В настоящее время метод дроplet-витрификации – DV (Panis et al., 2005) широко используется в криоконсервации *in vitro* образцов многих культурных видов – представителей семейств *Musaceae*, *Solanaceae*, *Alliaceae*, *Rosaceae* (Panis et al., 2016; раздел 1.2.2., с. 20–22). Для разных видов использовались различные модификации метода DV, касающиеся всех этапов криоконсервации: предобработка исходных микрорастений (различные варианты закаливания или отказ от этого этапа); разные типы эксплантов; состав криопротекторов (PVS2, PVS3); продолжительность предобработки эксплантов растворами PVS2 или PVS3; состав питательных сред для регенерации.

Криоконсервация образцов рода *Rubus* с использованием метода DV описана в трех публикациях: для одного сорта малины (Condello et al., 2011) и одного сорта ежевики (Vujović et al., 2011) – без каких-либо предобработок исходных микрорастений – и в работе Nukari et al. (2011) – для 32 сортов малины – без уточнения деталей предобработки исходных микрорастений и состава питательной среды для посткриогенной регенерации. Детали протокола DV, применяемого в последние годы в США, не приведены в публикациях.

Наша первоначальная задача состояла в анализе литературных данных по криоконсервации представителей рода *Rubus* и в оптимизации протокола дроplet-витрификации (DV). На первом этапе были собраны все известные из литературы о модификациях протокола дроplet-витрификации (DV), которые ранее использовались для криоконсервации малины и ежевики (см. табл. 12), проведен их сравнительный анализ и сопоставление результатов, полученных в разных лабораториях.

Эффективность использованных модифицированных протоколов DV оценивали по показателям: частоте посткриогенной регенерации образцов малин и ежевик, продолжительности цикла криоконсервации и числу образцов, для которых была успешно использована та или иная модификация метода DV (см. табл. 12).

Таблица 12 – Отличия различных протоколов дроplet-витрификации, разработанных для криоконсервации представителей рода *Rubus L.* в сравнении с оригинальным протоколом DV, разработанным Panis et al. (2005)

Методика	Дроplet-витрификация, INIBAP, Бельгия (оригинальный протокол)	Дроplet-витрификация, MTT ARF, Финляндия	Дроplet-витрификация, FRI, Сербия	Дроplet-витрификация, FRI, Сербия	Дроplet-витрификация, «DV-biotech», ВИР, Россия
Ссылка → ↓ Этапы криоконсервации	Panis et al., 2005	Nukari, Uosukainen, 2007; Nukari et al., 2011	Condello et al., 2011	Vujović et al., 2011, 2015	Настоящее исследование
1	2	3	4	5	6
1. Среда для микроразмножения исходных микрорастений, условия, продолжительность	МС + 2,25 мг/л БАП, 0,17 мг/л ИУК, 10 мг/л аскорбиновой к-ты, 3 г/л гелерита, 30 г/л сахарозы, 25±2°С при постоянном свете.	Нет данных	МС с 0,3 мг/л БАП, 30 г/л сахарозы, 25°С, 16-ч. фотопериоде 30 дней.	На твердой МС с 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК, 0,1 мг/л ГК, 20 г/л сахарозы, при 23±2°С, 16-ч. фотопериоде, 3 недели.	МС +0,5 мг/л БАП, 0,05 мг/л ИМК, 30 г/л сахарозы, 22±2°С, 16-ч. фотопериоде, 5 недель.
2. Предобработка исходных растений:					
2а. Культивирование микрорастений на твердой среде с повышенным содержанием сахарозы	60 г/л на 3 недели	0,25-0,75М	Этап отсутствует	Этап отсутствует	Этап отсутствует
2б. Холодовое закаливание	Этап отсутствует	в статье детали не указаны	Этап отсутствует	Этап отсутствует	Этап отсутствует
3. Предобработка эксплантов: среда, продолжительность					
3а. Изоляция эксплантов	LS (2 М глицерол и 0.4 М сахароза) до 5-7 ч.	Твердая среда МС с активированным углем – 3 дня.	LS (2 М глицерол и 0.4 М сахароза), продолжительность не указана	Экспланты – на МС с 0.3М сахарозы, на время вычленения апексов, затем – в жидкую МС с постепенно растущим уровнем сахарозы: 0,3М – на 15 часов, затем с 0,7М - на 5 ч.	Жидкой МС без гормонов, около 1 ч. на свету.
3б. Осмопротекция		LS (2 М глицерол и 0.4 М сахароза) при КТ 30 минут.	LS (2 М глицерол и 0.4 М сахароза) при КТ в темноте 20 минут.	LS (1,9 М глицерол и 0.5 М сахароза) при КТ 30 мин.	LS (2 М глицерол и 0.4 М сахароза) при КТ 20 мин. на свету.
3с. Дегидратация	PVS2 на льду от 30 до 50 мин.	PVS2 при КТ от 45 до 60 мин.	PVS2 на льду 30 мин.	Обработка раствором модифицированного PVS=A3 при КТ 10, 20, 30 мин., а также 60, 90, 120 мин. с раствором PVS3.	PVS2 на льду 30 мин.

1	2	3	4	5	6
4. Замораживание	Погружение полосок фольги в криопробирку, заполненную LN, на 1 ч.	Погружение полосок фольги в криопробирку, заполненную стерильным воздухом, погружение в LN.	Погружение полосок фольги в криопробирку с LN, на 30 мин.	Погружение полосок фольги в криопробирку, заполненную LN, на 1 ч.	Погружение полосок фольги в криопробирку, заполненную LN, на 1 ч.
5. Оттаивание	Жидкая RS (MS с 1,2 М сахарозой) при КТ 15 мин.	Жидкая RS (MS с 1,2 М сахарозой) при КТ 15 мин.	Жидкая RS (MS с 1,2 М сахарозой) при КТ 15 мин.	Жидкая RS (MS с 1,0 М сахарозой) при КТ 15 мин.	Жидкая RS (MS с 1,2 М сахарозой) при КТ 15 мин.
6. Посткриогенная регенерация					
Первая неделя в темноте	+	Нет данных	+	+	Этап отсутствует
Питательная среда для регенерации	MS + 10 мг/л аскорбиновой кислоты, 3 г/л гелерита, 0,3М сахарозы (на фильтровальной бумаге) – 2 дня, затем – на среду как для микроразмножения, без фильтровальной бумаги.	Нет данных	Первый день - на полужидкой среде MS без гормонов +0,3М сахарозы (агар 4,5 г/л), затем – на твердую MS (агар 5,5 г/л) с 0,5 мг/л БАП. Спустя неделю – на той же свежей среде.	в стандартных условиях на среде MS с 1 мг/л БАП, 0,01 мг/л ИМК, 0,1 мг/л ГК, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара.	твердая MSto +0,5 мг/л зеатин-рибозида, +0,2 мг/л ГК, +0,5 мг/л +ИУК с 30 г/л сахарозы, 7 г/л агара.
Суммарная продолжительность всех этапов криоконсервации	8 недель роста, 1 день криоконсервации	? недель роста, 1 день криоконсервации	4-5 недель роста, 1 день криоконсервации	3 недели роста, 1 день криоконсервации	5 недель роста, 1 день криоконсервации
Регистрация показателей посткриогенного восстановления	на 4–6 неделях	Нет данных	на 3 неделе	на 3–6–8 неделях.	на 3–6–8 неделях.
Уровень регенерации	40–50%	Нет данных	18%	40–50%	20–83%
Число криоконсервированных образцов	1536	32	1	1	17
Число криопробирок, эксплантов	10 эксплантов на криопробирку, от 100 эксплантов (10 пробирок) в криобанк.	10 эксплантов на криопробирку, от 5-42 пробирок в криобанке.	10 эксплантов на криопробирку.	10 эксплантов на криопробирку.	10 эксплантов на криопробирку, от 90 эксплантов (9 пробирок) в криобанк.
Продолжительность всего цикла криоконсервации, включая регистрацию данных по регенерации	14 недель	Нет данных	7–8 недель	11 недель	11–13 недель

Как видно из данных таблицы 12, общая продолжительность всего цикла протокола криоконсервации DV, предложенного E. Condello et al. (2011), существенно короче (почти на два месяца) оригинального протокола Panis et al. (2005). Поэтому мы выбрали данную модификацию метода DV для инициации исследований по криоконсервации представителей рода *Rubus* в ВИРе. Дополнительное отличие протокола Condello et al. (2011) от оригинального протокола Panis et al. (2005) – отсутствие двухнедельного этапа культивирования эксплантов после оттаивания в темноте. Отметим, что Nukari et al. (2011) также отказались от этапа двухнедельного темнового культивирования апексов микрорастений малины (см. табл. 12). Протокол E. Condello с соавторами (2011б) занимает всего 8 недель, но в нем не детализирована важная стадия этапа №3с – продолжительность обработки эксплантов раствором криопротекторов LS (МС с добавлением 0,4 М сахарозы и 2 М глицерина, Matsumoto et al., 1994), который, как подчеркивали Sakai et al. (1990), необходим для снижения осмотического шока при последующем воздействии на экспланты высококонцентрированного витрифицирующего раствора криопротекторов (PVS2). Анализ других модификаций протокола DV показывает, что длительность данной стадии варьирует от 20 минут до 5–7 часов (Panis et al., 2005; Condello et al., 2011б). Мы остановились на варианте 20 минут как наиболее коротком, поскольку, согласно выводам Барта Паниса, длительность инкубации в растворе LS не влияет на эффективность посткриогенной регенерации (Panis et al., 2005).

Другой важной стадией протокола DV, определяющей уровень посткриогенной регенерации, является обработка эксплантов раствором криопротекторов PVS2 (МС с добавлением 0,4 М сахарозы, 30% глицерина, 15% этиленгликоля и 15% DMSO, Sakai et al., 1990). Отметим, что в перечисленных работах есть противоречия и относительно продолжительности обработки эксплантов витрифицирующим раствором PVS2. Так, в работе Nukari et al. (2011) время обработки раствором PVS2 варьировало от 40 до 60 минут при комнатной температуре, в работе Condello et al. (2011) составляло 30 минут на льду и в оригинальном протоколе Panis et al. (2005) – 30–50 минут на льду (см. табл. 12), в разных лабораториях для образцов малины и ежевики применяли различную продолжительность инкубации эксплантов в растворе криопротекторов PVS2 – этот период варьировал от 30 до 60 минут. В то же время из литературных данных, полученных на разных объектах, известно, что продолжительность именно этой стадия является наиболее критичной для результативности криоконсервации (Sakai et al., 1990, 2008; Panis et al., 2005; Vujović et al., 2011).

В связи с этим первоначальная задача состояла в выборе оптимальной продолжительности обработки эксплантов раствором криопротекторов, определении более эффективного типа эксплантов для криоконсервации, апробации питательной среды (МСТо – МС с 3% сахарозой, дополненную зеатин-рибозидом (0,5 мг/л), ИУК (0,5 мг/л) и ГК (0,2 мг/л) -

для получения посткриогенных регенерантов. Как было указано в обзоре литературы, данный состав среды успешно использован для получения посткриогенных регенерантов других видов, а для малины был апробирован впервые.

Изучение влияния продолжительности обработки эксплантов раствором криопротекторов (PVS2)

Для криоконсервации был использован модифицированный метод «DV-biotech» (табл. 8). Эксплантами послужили верхушечные почки *in vitro* растений малины сорта Барнаульская.

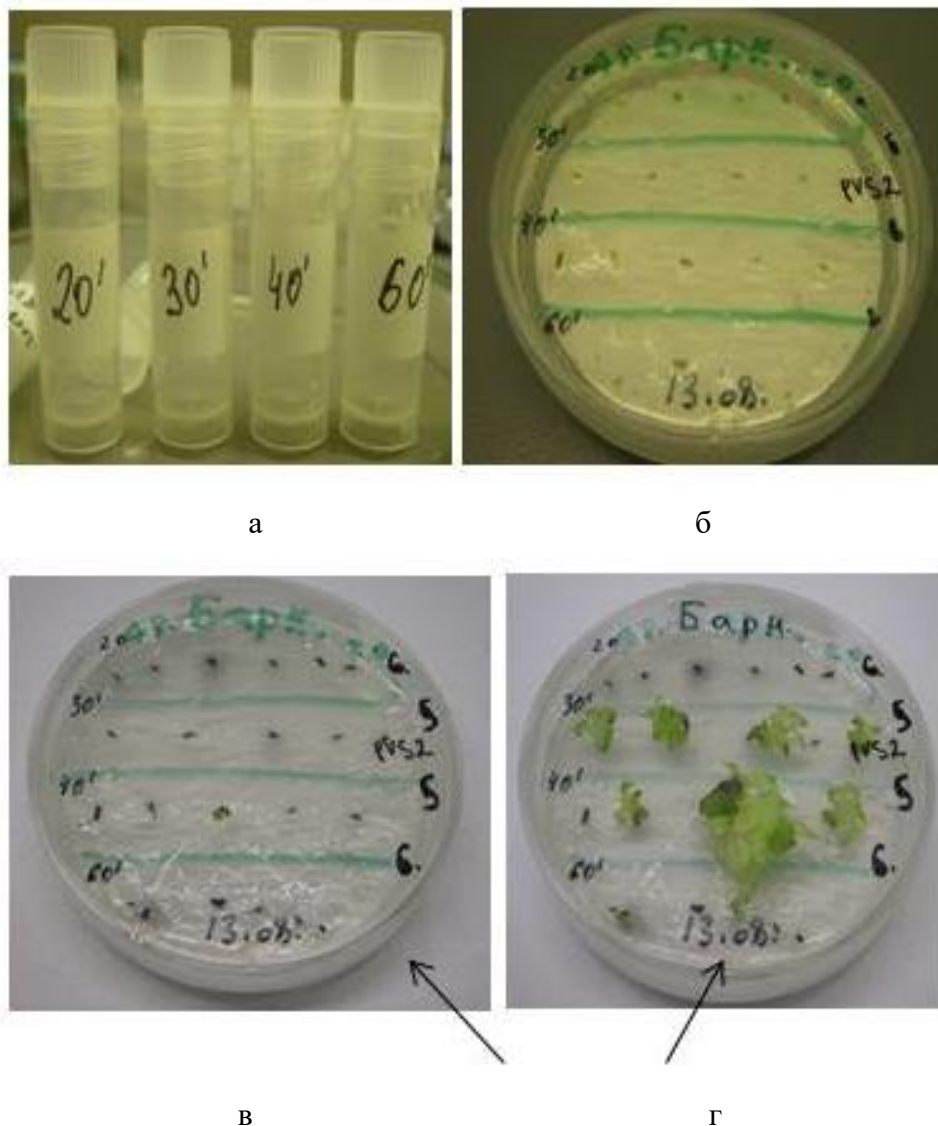


Рисунок 5 – Криорегенеранты малины сорта Барнаульская в зависимости от длительности обработки раствором PVS2.

а – маркированные криопробирки, б – экспланты на среде МСТО сразу после оттаивания, в, г – те же экспланты через 3 и 8 недель, соответственно.

Числа 20, 30, 40, 60 на криопробирках и на чашках Петри обозначают продолжительность обработки эксплантов раствором PVS2. Цифры 6, 5, 5, 6 на чашках Петри обозначают число эксплантов на вариант обработки в данной чашке Петри. Все варианты, включая контрольный, выполнены в трех повторностях.

На рисунках 5 и 6 приведены результаты оценки жизнеспособности и регенерационной способности после замораживания/оттаивания эксплантов в вариантах обработки витрифицирующим раствором PVS2 20, 30, 40 и 60 минут. При 20-минутной инкубации эксплантов в растворе PVS2 посткриогенные регенеранты вообще не формировались. Наиболее высокий процент регенерации после замораживания-оттаивания был получен при обработке эксплантов раствором криопротекторов PVS2 в течение 30 минут. Более длительная обработка (40 и 60 минут) приводила к существенному ($p < 0,05$) снижению уровня регенерации не только в опыте, но и в контроле (рис. 6). Поэтому в дальнейшем для криоконсервации и криохранения использовали именно 30-минутную обработку эксплантов криопротектором PVS2.

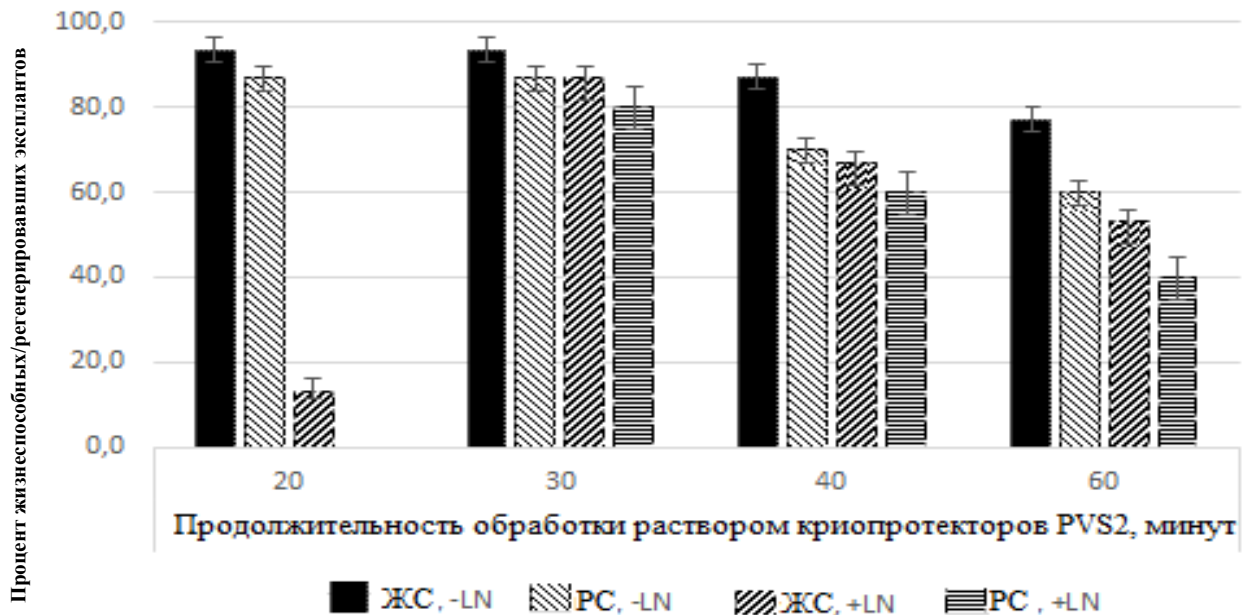


Рисунок 6 – Влияние продолжительности обработки эксплантов раствором PVS2 на их способность к регенерации после оттаивания у малины сорта Барнаульская. ЖС – процент жизнеспособных эксплантов, РС – процент регенерирующих эксплантов, –LN – контрольные экспланты (без погружения в жидкий азот), +LN – варианты опытов по криоконсервации (экспланты прошли все этапы протокола, см. табл. 8).

На следующем этапе было изучено влияние типа эксплантов на их жизнеспособность и регенерационную способность после криоконсервации. В вопросе о влиянии типа эксплантов на посткриогенную регенерацию нет единого мнения. Для ряда видов показана существенно более высокая способность к регенерации верхушечных почек микрорастений по сравнению с пазушными: картофель (Schäfer-Menuhr, 1996), кассава (Escobar et al., 1997), батат (Pennycooke, Towill, 2000). В других работах не выявлено достоверных различий в частоте регенерации верхушечных и пазушных почек, например, для картофеля (Shvachko, Gavrilenko, 2011),

моркови (Dereuddre et al., 1988), хризантем (Lee et al., 2011), секвойи (Ozudogru et al., 2011), зверобоя (Coste et al., 2012). Nukari et al. (2009) упоминает о возможности криоконсервации пазушных почек малины, однако не приводит конкретные результаты.

В настоящей работе проведена оценка показателей посткриогенного восстановления двух типов эксплантов – верхушечных и пазушных почек микрорастений сортов малины – Барнаульская и Шарташская. Криоконсервацию проводили на основе протокола «DV-biotech» (см. табл. 8). Для каждого сорта использовали по 30 верхушечных и 30 пазушных почек микрорастений на одну повторность, всего выполнено три повторности. Результаты оценки числа (%) выживших и регенерировавших эксплантов каждого типа представлены в таблице 13 и на рис. 7.

Таблица 13 – Жизнеспособность и регенерационная способность верхушечных и пазушных почек микрорастений малины сортов Барнаульская и Шарташская после замораживания-оттаивания и в контроле

Сорт	Тип экспланта	Жизнеспособность эксплантов, %		Регенерационная способность эксплантов, %	
		-LN	+LN	-LN	+LN
Барнаульская	Верхушечные	96,3±3,7 ^{ab}	87,8±6,2 ^{ab}	92,6±7,4 ^{ab}	81,1±1,1 ^{ab}
	Пазушные	86,5±3,5 ^{ab}	21,5±3,8 ^d	76,3±3,3 ^{ab}	21,5±3,8 ^d
Шарташская	Верхушечные	90,7±4,9 ^{ab}	75,0±7,6 ^{ab}	87,0±6,7 ^{abc}	67,2±11,2 ^{ab}
	Пазушные	76,7±3,3 ^{ab}	0 ^e	73,3±3,3 ^{abc}	0 ^e

Примечания: * - статистически достоверные различия (p<0,05)

-LN – контрольные экспланты (без погружения в жидкий азот),

+LN – варианты опыта по криоконсервации (экспланты прошли все этапы протокола)

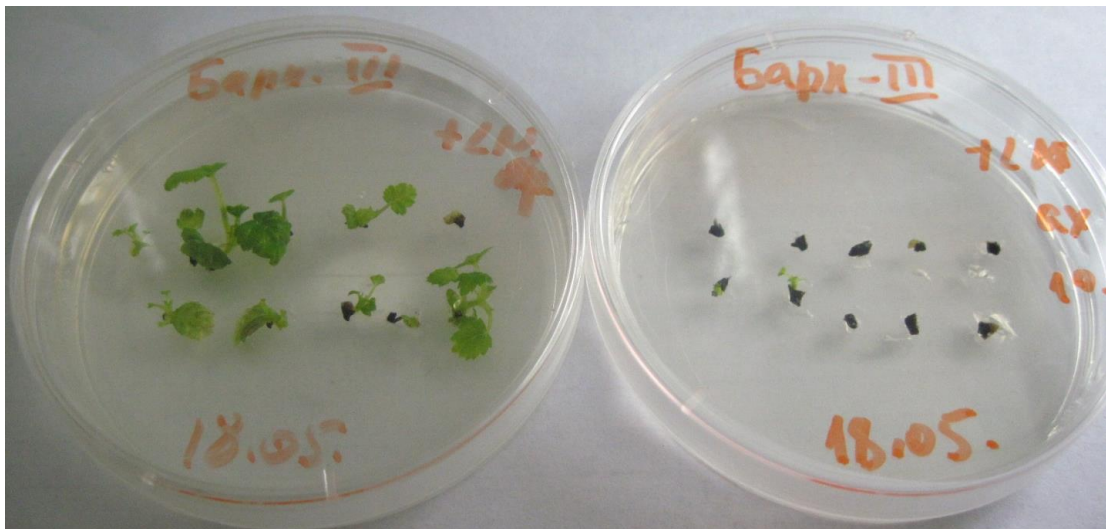


Рисунок 7 – Регенерация верхушечных (слева) и пазушных почек (справа) малины сорта Барнаульская после оттаивания.

Полученные результаты указывают, что верхушечные почки микрорастений малины обладают достоверно более высокими ($p < 0,05$) показателями посткриогенного восстановления по сравнению с пазушными (см. табл. 13, рис. 7). Поэтому в дальнейшем для экспериментов по криоконсервации и закладки образцов малины и ежевики на криохранилище использовали только верхушечные почки.

Основные этапы оптимизированного протокола дроплет-витрификации - «DV-biotech»

На основе анализа литературных данных о модификациях оригинального метода дроплет-витрификации (DV), разработанного Panis et al (2005), использованных для криоконсервации образцов малины, ежевики и других объектов (Nukari et al., 2011, Condello et al., 2011, Vujović et al., 2011, 2015; Panis et al., 2007, 2016), Дунаева и др., 2011; Vollmer et al., 2017), а также собственных результатов была предложена оригинальная модификация данного метода – «DV-biotech» (см. табл. 12 – последняя колонка). Основные модифицированные нами этапы протокола «DV-biotech» включают:

1) на первом этапе – подготовки исходных микрорастений – состав фитогормонов в среде для микро размножения исходных *in vitro* растений малины (0,5 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИМК) отличался от предложенного в других работах (Nukari et al., 2011, Condello et al., 2011b, Vujović et al., 2011, 2015), поскольку состав этой среды был использован ранее в работе Wang et al. (2005) по криоконсервации малины методом инкапсуляции-витрификации. Эта среда была успешно апробирована в отделе биотехнологии ВИР для микро размножения разных сортов малины и ежевики (Ukhatova et al., 2017);

2) – этап предкультивирования исходных микрорастений. Ранее было показано, что применение холодого закаливания в течение недели (22°C 8-ч день/–1°C ночь), а также комбинация холодого закаливания с культивированием на среде с 50 µM АБК существенно повышает посткриогенную регенерацию у нескольких генотипов *Rubus* при криоконсервации методом медленного замораживания (см. детали в обзоре Reed, 2008). В модифицированном протоколе дроплет-витрификации Nukari et al. (2011) также сообщается о холодом закаливании микрорастений, но без уточнения деталей, и о повышенном содержании сахарозы (0,25-0,75M) в питательной среде на этапе микро размножения. Condello et al. (2011b) продемонстрировали возможность применения дроплет-витрификации без длительной предобработки холодом закаливанием или добавлением сахарозы, что позволило сократить продолжительность криоконсервации на 1–2 недели; однако в этой работе был использован только один образец. Следуя за протоколом E. Condello et al. (2011b), мы также отказались от длительного (4 недели) культивирования исходных микрорастений на среде с повышенным содержанием сахарозы, что отличало наш протокол как от оригинального DV метода B. Panis с соавторами (2005), так и от протокола Nukari et al. (2011);

3) – этап обработки изолированных эксплантов растворами криопротекторов. В отличие от оригинального протокола В. Panis с соавторами (2005) и модифицированного протокола Condello с соавторами (2011б), на третьем этапе мы отказались от инкубирования эксплантов в среде LS в течение 5–7 часов, поскольку в оригинальном протоколе было отмечено, что для успешной криоконсервации минимальная продолжительность инкубации эксплантов в LS составляет 20 минут. Вместо этого в нашем протоколе изолированные верхушечные почки инкубировали в жидкой безгормональной среде MC с 30 г/л сахарозы в течение 1 часа с последующей 20 минутной инкубацией эксплантов в среде LS. В отличие от протокола Е. Condello с соавторами (2011б) инкубацию проводили не в темноте, а на свету.;

4) Как отмечено выше (см. табл. 12), для криоконсервации представителей рода *Rubus* применяют разные методы. Длительность обработки растворами LS и PVS2 варьирует в широком диапазоне в разных протоколах: (1) 90 минут (LS) и 180 минут (PVS2) в протоколе EV (Wang et al., 2005); (2) 20 минут (LS) и 20 минут (PVS2) в протоколе витрификации Reed и Gupta (2006). В нашей модификации на этапе криопротекции мы использовали только 30-минутную инкубацию в растворе PVS2, в отличие от оригинального протокола (30–50 минут) (Panis et al., 2005), а также в отличие от протокола финских коллег, которые инкубируют экспланты 45–60 минут (Nukari et al., 2011);

5) на заключительном этапе оценки посткриогенной регенерации мы использовали среду MC с зеатин-рибозидом (0,5 мг/л), ИУК (0,5 мг/л) и ГК (0,2 мг/л), предложенную Towill (1983). Протокол капель-витрификации, разработанный Panis et al (2005) для меристем банана, был использован с некоторыми модификациями для криоконсервации самых разных объектов; эти протоколы включали различные питательные среды с разными фитогормонами (БАП, кинетин, зеатин) (см. обзоры: Reed, 2008; Wang et al., 2014; Panis et al., 2016). В нашей работе мы выбрали зеатин, поскольку, судя по литературным данным, он был наиболее эффективным при *in vitro* размножении образцов рода *Rubus* по сравнению с другими цитокининами (Debnath, 2004; Nicuță et al., 2014; Zayova et al., 2016).

Подчеркнем, что все цитированные выше протоколы, кроме Nukari et al. (2011), используют верхушечные почки или меристемы. Мы изучили возможность применения пазушных почек, поскольку ряд публикаций содержал информацию о возможности их криоконсервации (см. раздел 1.2.2.1., с. 25). Однако наши результаты указывают на существенно более высокую результативность посткриогенного восстановления верхушечных почек по сравнению с пазушными. В дальнейшем этот модифицированный протокол, который мы назвали «DV-biotech», был использован для криоконсервации сортов малины и ежевики.

3.3. Изучение способности к посткриогенному восстановлению сортов малины и ежевики при использовании оптимизированного протокола дроблет-витрификации – «DV-biotech»

Оптимизированный нами протокол дроблет-витрификации – «DV-biotech» был использован для криоконсервации 13 сортов малины и 4 сортов ежевики из *in vitro* коллекции ВИР (табл. 14). В контроле (все этапы соответствуют протоколу по криоконсервации «DV-biotech» за исключением погружения в жидкий азот) показатели жизнеспособности и эффективности регенерации изученных сортов малины и ежевики были близки и, как и ожидалось, имели высокие значения: $100,0 \pm 0,0$ – $86,1 \pm 7,3$ % и $100,0 \pm 0,0$ – $82,6 \pm 3,8$ %, соответственно.

Таблица 14 – Жизнеспособность и регенерационная способность верхушечных почек микрорастений сортов малины и ежевики после замораживания/оттаивания и в контроле

№ п/п	Сорт	Жизнеспособность, %		Регенерационная способность, %	
		-LN	+LN	-LN	+LN
Малина обыкновенная (2x):					
1	Скромница	$100,0 \pm 0,0^d$	$44,4 \pm 7,1^{ab}$	$96,7 \pm 3,3^{cd}$	$24,2 \pm 5,6^a$
2	Новокитаевская	$100,0 \pm 0,0^d$	$60,6 \pm 6,5^{abc}$	$96,3 \pm 3,7^{cd}$	$40,0 \pm 6,5^{ab}$
3	Спутница	$100,0 \pm 0,0^d$	$63,6 \pm 13,7^{abc}$	$95,2 \pm 4,8^{cd}$	$45,5 \pm 1,1^{ab}$
4	Кокинская	$93,3 \pm 6,7^{cd}$	$56,7 \pm 7,1^{abc}$	$85,0 \pm 7,6^{cd}$	$51,7 \pm 1,7^{abc}$
5	Самарская плотная	$93,3 \pm 6,7^{cd}$	$65,5 \pm 10,9^{abc}$	$86,7 \pm 6,7^{cd}$	$55,2 \pm 10,3^{abc}$
6	Прогресс	$89,6 \pm 0,4^c$	$68,5 \pm 13,2^{abc}$	$82,6 \pm 3,8^{bcd}$	$56,8 \pm 9,1^{abc}$
7	Белая Спирина	$100,0 \pm 0,0^d$	$65,5 \pm 7,3^{abc}$	$100,0 \pm 0,0^d$	$57,4 \pm 6,3^{abc}$
8	Шарташская	$90,7 \pm 4,9^{cd}$	$75,0 \pm 7,6^{bc}$	$87,0 \pm 6,7^{bcd}$	$67,2 \pm 11,2^{bc}$
9	Phenix	$86,1 \pm 7,3^{bc}$	$75,9 \pm 5,8^{bc}$	$94,4 \pm 5,6^{bc}$	$70,1 \pm 4,7^{bc}$
10	Бальзам	$94,4 \pm 5,6^{cd}$	$80,6 \pm 6,3^{bc}$	$88,9 \pm 5,6^{bc}$	$80,6 \pm 6,3^{bc}$
11	Барнаульская	$96,3 \pm 3,7^{cd}$	$87,8 \pm 6,2^{bc}$	$92,6 \pm 7,4^{cd}$	$81,1 \pm 1,1^{bc}$
12	Соколенок	$86,7 \pm 3,3^c$	$84,0 \pm 4,9^{bc}$	$83,3 \pm 3,3^{bc}$	$81,1 \pm 7,0^{bc}$
13	Метеор	$100,0 \pm 0,0^d$	$90,7 \pm 0,7^{cd}$	$100,0 \pm 0,0^d$	$89,3 \pm 0,7^c$
	Среднее	$95,2 \pm 1,3^{bc}$	$68,2 \pm 3,5^{bc}$	$90,8 \pm 1,7^{bc}$	$59,6 \pm 4,9^{abc}$
Ежевика:					
1	Whitford Thornless (2x)	$94,0 \pm 3,1^{bc}$	$30,0 \pm 15,0^{abc}$	$84,3 \pm 2,9^{bc}$	$20,0 \pm 10,0^{abc}$
2	Young (7x)	$90,6 \pm 0,6^{bc}$	$45,0 \pm 25,0^{abc}$	$84,4 \pm 2,9^{bc}$	$45,0 \pm 25,0^{abc}$
3	Darrow (4x)	$96,7 \pm 3,3^{bc}$	$67,5 \pm 14,2^{abc}$	$87,3 \pm 3,7^{bc}$	$67,5 \pm 14,2^{abc}$
4	Ashton Cross (8x)	$100,0 \pm 0,0^d$	0^e	$94,4 \pm 5,6^{bc}$	0^e
	Среднее	$95,3 \pm 1,9^{bc}$	$35,6 \pm 14,2^{abc}$	$87,6 \pm 2,4^{bc}$	$33,1 \pm 14,7^{abc}$
	Среднее по 17 сортам:	$95,3 \pm 0,5^{bc}$	$62,4 \pm 5,5^{bc}$	$89,5 \pm 1,2^{bc}$	$54,9 \pm 5,9^{bc}$

Примечания: Значения, отмеченные одинаковыми буквами, статистически не отличаются ($p < 0,05$).

-LN – контрольные почки, +LN – экспериментальные почки. В скобках указан уровень плоидности образцов.

В экспериментах по криоконсервации средние показатели выживаемости и регенерационной способности эксплантов после оттаивания были существенно ниже контрольных значений – $68,2 \pm 3,5$ % и $59,6 \pm 4,9$ % – в группе сортов малин, и $35,6 \pm 14,2$ % и

33,1±14,7% в группе сортов ежевик. Средние показатели посткриогенного восстановления в изученных группах сортов малины и ежевики существенно не отличались (см. табл. 14).

В изученных группах сортов малины и ежевики выявлена достоверная положительная корреляция между показателями жизнеспособности и регенерационной способности почек после оттаивания (коэффициенты ранговой корреляции Спирмена = 0,94 и 1,0, соответственно).

Из 13 изученных сортов малины обыкновенной наиболее высокие показатели регенерационной способности отмечены у сорта Метеор (89,3%), минимальные – у сорта Скромница (24,2%). В среднем у сортов малины изученной выборки выживаемость эксплантов составила 68,2%, регенерационная способность – 59,6%, что сравнимо с литературными данными либо превышает показатели, полученные в других лабораториях (см. табл. 3). В то же время, у 4 образцов ежевики эти показатели были ниже - средняя частота регенерации составила 33,1% (см. табл. 14). Среди образцов ежевики сорт Darrow имел наиболее высокие показатели посткриогенной регенерации. Для одного сорта Ashton Cross необходимо провести дополнительные исследования по оптимизации протокола криоконсервации «DV-biotech».

По данным дисперсионного анализа, в пределах изученной выборки сортов малины не выявлено значимого влияния генотипа на выживаемость эксплантов ($p=0,0686$), в то время как влияние генотипа на регенерационную способность почек после оттаивания было статистически достоверным ($p=0,0003$). Полученные результаты подтверждают литературные данные; фактически во всех исследованиях по криоконсервации вегетативно размножаемых растений отмечено существенное влияние генотипа на частоту регенерации после оттаивания, в частности, такие данные известны и для образцов малин и ежевик, криоконсервация которых осуществлялась с использованием метода инкапсуляции-дегидратации и витрификации (Wang et al., 2005; Gupta, Reed 2006; Reed, 2008). Однако объяснений причин наблюдаемых генотипических различий в литературе не приводится.

В изучении находились диплоидные образцы малины обыкновенной – *R. idaeus* и образцы ежевики разного уровня ploидности (2x ... 8x). Частота регенерации после оттаивания у диплоидных сортов в среднем составила 58,6±5,7%, у полиплоидных – 37,5±19,8%. Различия в способности к посткриогенной регенерации у образцов разных уровней ploидности были недостоверны ($p>0,05$).

Достоверных различий между значениями посткриогенной регенерации в группе сортов малины и сортов ежевики нет, поскольку для ежевик зафиксированы большие значения ошибки среднего (±14,7), нивелирующие наблюдаемые различия между сортами малины и ежевики. Таким образом, можно заключить, что использование модифицированного метода дроплет-витрификации «DV-biotech» позволило получить высокие показатели посткриогенного восстановления для 16 образцов малины и ежевики. Среднее значение посткриогенной

регенерации у них составило 54,9%, варьируя от 20,0% (сорт Whitford Thornless) до 89,3% (сорт Метеор).

3.4. Изучение жизнеспособности и регенерационной способности после оттаивания у селекционных сортов и у коллекционных образцов культурных видов картофеля с использованием оптимизированного протокола «DV-biotech»

Изучение способности к посткриогенному восстановлению у коллекционных образцов картофеля было проведено по той же схеме, которая применялась для образцов малины и ежевики. В начале было проведено изучение способности к посткриогенному восстановлению двух типов эксплантов - верхушечных и пазушных почек микрорастений 30 образцов тетраплоидного ($2n=4x=48$) культурного картофеля *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, включая 20 селекционных сортов и 10 аборигенных чилийских сортов (табл. 15). У 19 (95%) из 20 изученных селекционных сортов отмечена достоверно ($p<0,05$) более высокая частота выживших после замораживания-оттаивания верхушечных почек по сравнению с пазушными. У 17 (85%) селекционных сортов частота регенерации верхушечных почек была существенно выше ($p<0,05$), чем у пазушных и только у трех сортов (Великан, Ильинский, Накра) эти различия были недостоверны, однако и для них отмечена та же тенденция (см. табл. 15). Аналогичные результаты получены и при изучении посткриогенного восстановления аборигенных чилийских сортов картофеля (табл. 15, Рис. 8). Показатели регенерационной способности после замораживания-оттаивания верхушечных почек были существенно ($p<0,05$) выше значений соответствующих показателей пазушных почек у 6 из 10 чилийских сортов. В среднем по объединенной выборке из 30 тетраплоидных сортов частоты выживших и регенерировавших верхушечных почек составили $62,1\pm 2,6\%$ и $48,6\pm 2,2\%$, соответственно, а для пазушных почек эти показатели равнялись $26,6\pm 3,8\%$ и $16,1\pm 2,3\%$, соответственно (см. табл. 15). Полученные данные однозначно указывают на более высокую способность к посткриогенному восстановлению верхушечных почек микрорастений по сравнению с пазушными. Исходя из полученных результатов, во всех последующих экспериментах по криоконсервации картофеля использовался только один тип эксплантов – верхушечные почки микрорастений.

Значимая ($p\leq 0,05$) положительная корреляция между показателями выживаемости и регенерационной способности отмечена как у селекционных сортов ($r=0,72$), так и у аборигенных чилийских сортов ($r=0,42$); коэффициент ранговой корреляции Спирмена для значений этих показателей составил 0,63 по всей выборке из 30-ти тетраплоидных сортов *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*.

Таблица 15 – Показатели посткриогенного восстановления различных типов эксплантов у тетраплоидных сортов картофеля *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* (2n=4x=48)

№ п/п	Название сорта или к-ВИР	Жизнеспособность после замораживания/оттаивания, %		Эффективность регенерации после замораживания/оттаивания, %	
		Верхушечные почки	Пазушные почки	Верхушечные почки	Пазушные почки
Селекционные сорта возделываемого картофеля					
1	Импала	76,6±3,3*	40,0±10,0	73,3±3,3*	33,3±6,7
2	Никулинский	90,0±0,0*	30,0±15,3	63,3±8,8*	26,7±12,0
3	Жуковский ранний	73,3±3,3*	6,7±6,7	60,0±0,0*	6,7±6,7
4	Gala	63,3±6,7*	23,3±6,7	60,0±5,8*	20,0±5,8
5	Барин	60,0±10,0*	13,3±6,7	60,0±10,0*	13,3±6,7
6	Лорх	53,3±6,7*	3,3±3,3	53,3±6,7*	3,3±3,3
7	Red Scarlett	60,0±0,0*	6,7±6,7	53,3±6,7*	0
8	Голубизна	50,9±15,4*	10,0±5,8	50,9±15,4*	6,7±3,3
9	Накра	68,9±7,8*	46,7±13,3	49,9±7,1	30,0±11,5
10	Крепыш	56,7±6,7*	23,3±6,7	46,7±3,3*	16,7±6,7
11	Жигулёвский	53,3±3,3*	20,0±5,8	46,7±6,7*	10,0±5,8
12	Невский	44,8±8,7*	26,2±3,1	44,8±8,7*	22,8±2,9
13	Вымпел	50,0±0,0*	6,6±3,3	42,5±3,8*	3,3±3,3
14	Брянский деликатес	61,8±10,0*	6,6±3,3	42,4±9,5*	6,7±3,3
15	Великан	50,0±17,3	22,9±12,2	40,0±10,0	16,9±12,6
16	Фиолетовый	41,8±6,1*	9,4±5,3	38,8±5,9*	9,4±5,3
17	Метеор	46,7±12,0*	10,0±5,8	36,7±6,7*	6,7±3,3
18	Удача	50,0±10,0*	13,3±6,7	30,0±5,8*	3,3±3,3
19	Колобок	40,0±11,5*	10,0±5,8	30,0±5,8**	6,7±6,7
20	Ильинский	60,0±11,5*	20,0±0,0	26,7±3,3	16,7±3,3
	X±m _x	57,6±2,8*	17,4±2,6	47,5±2,7*	12,9±2,1
Аборигенные чилийские сорта					
1	7540 Importable 55(47)	74,1±5,9*	23,3±12,0	70,8±7,7*	10,0±5,8
2	7576 Mantequilla 79(86)	93,3±6,7	76,7±14,5	60,0±11,5	48,3±11,7
3	2083	57,2±9,5*	32,8±4,3	57,2±9,5*	18,3±9,3
4	7589	73,3±6,7	57,1±14,2	56,7±12,0	47,7±16,7
5	3414 Amarilla temprana№1	68,4±1,7	42,2±21,2	53,4±13,4	28,9±19,8
6	7568 Amarilla redonda 45/78	63,3±8,8	49,6±5,2	50,0±0,0*	21,1±5,5
7	2095	90,0±5,8	77,9±11,2	46,7±12,0*	13,0±8,9
8	7550 Azul 3(57)	75,6±7,3	55,0±15,0	45,0±10,1	20,0±10,0
9	7599Morada alargada	53,3±3,3*	10,0±5,7	38,3±7,2*	3,3±3,3
10	10648 -	64,1±2,6	25,0±20,9	31,9±1,1	13,9±10,0
	X±m _x	71,9±4,1*	44,9±7,2	51,0±3,5*	22,5±4,8
	X±m _x для всей выборки из 30 сортов	62,1±2,6*	26,6±3,8	48,6±2,2*	16,1±2,3

Примечание: Приведены данные по выживаемости и регенерационной способности эксплантов, учтенные на 8 неделе после момента их размораживания.

*- достоверные различия ($p \leq 0,05$) между соответствующими показателями у верхушечных и пазушных почек.

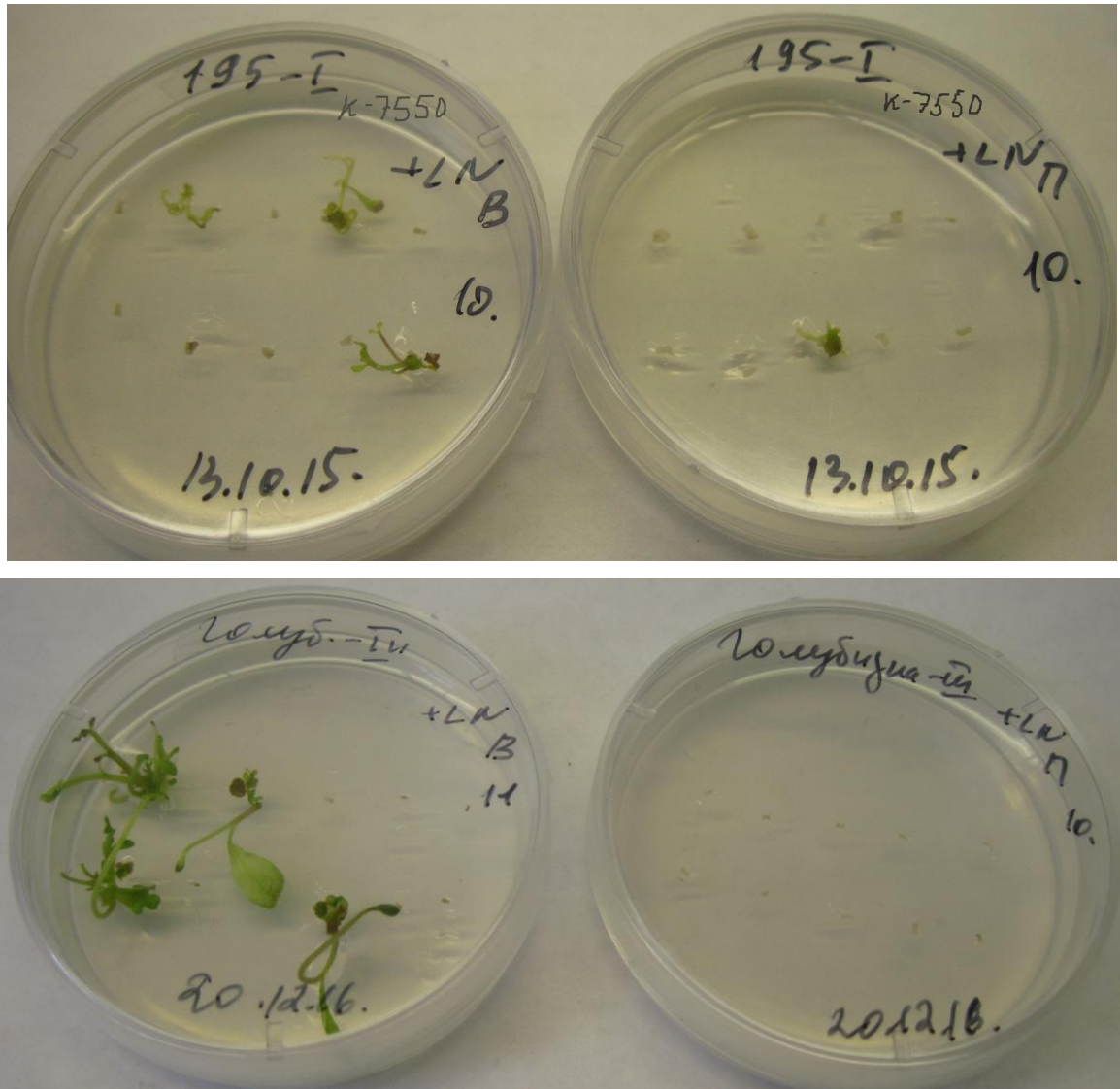


Рисунок 8 – Посткриогенное восстановление эксплантов верхушечных (слева) и пазушных (справа) почек на 8 неделе после замораживания-оттаивания у образца аборигенного чилийского сорта картофеля к-7550 Azul и у селекционного сорта картофеля Голубизна.

В таблице 16 представлены результаты экспериментов по криоконсервации 25 образцов 5 андийских культурных видов картофеля разных уровней ploидности: *S. chaucha* ($2n=3x$), *S. juzepczukii* ($2n=3x$), *S. stenotomum* ($2n=2x$), *S. phureja* ($2n=2x$), *S. tuberosum* ssp. *andigenum* ($2n=4x$), а также для нескольких образцов дикорастущего вида *S. acaule* ($2n=4x$). Отметим, что числа хромосом сохраняемых *in vitro* клонов были подсчитаны ранее (Gavrilenko et al., 2010).

Как и в предыдущих экспериментах, для образцов андийских культурных видов картофеля подтверждена достоверная ($p \leq 0,05$) корреляция двух показателей посткриогенного восстановления изученных образцов: процентов жизнеспособности эксплантов и частоты их регенерации после замораживания/оттаивания.

Таблица 16 – Показатели эффективности регенерации в контроле и после замораживания-оттаивания верхушечных почек микрорастений образцов андийских видов картофеля

	№	Название вида	№ каталога ВИР	Высота над ур. м. мест сбора образца	Регенерационная способность в контроле, -LN, %	Регенерационная способность после оттаивания, (+LN), %
Образцы диплоидных ($2n=2x=24$) культурных видов <i>S. stenotomum</i>, <i>S. phureja</i>						
1	1	<i>S. stenotomum</i>	10194	3700	95,8±4,2	69,0±5,5
2	2	<i>S. stenotomum</i>	16911	3950	86,3±5,7	63,9±5,4
3	3	<i>S. stenotomum</i>	11020	н/д	86,9±10,3	80,0±2,9
4	4	<i>S. stenotomum</i>	9048	3750	69,9±1,1	57,5±5,2
5	5	<i>S. stenotomum</i>	16596	н/д	92,5±3,8	43,3±8,8
6	6	<i>S. stenotomum</i>	1664	н/д	76,7±3,3	43,3±3,3
		$X\pm m_x$			84,7±3,9	59,5±5,9
7	1	<i>S. phureja</i>	1817	3690	84,5±3,6	60,0±5,8
8	2	<i>S. phureja</i>	5642	3500	90,9±0,0	60,0±10,0
9	3	<i>S. phureja</i>	21564	н/д	83,0±1,7	45,0±2,9
10	4	<i>S. phureja</i>	9836	3500	76,7±3,3	36,7±6,7
		$X\pm m_x$			83,8±2,9	50,4±5,8
		$X\pm m_x(2n=2x=24)$	N=10		84,3±2,5	55,9±4,3
Образцы триплоидного ($2n=3x=36$) культурного вида <i>S. chaucha</i>						
11	1	<i>S. chaucha</i>	24679	3300	68,6±9,6	30,6±4,0
12	2	<i>S. chaucha</i>	24689	3550	90,9±9,1	38,2±7,7
13	3	<i>S. chaucha</i>	24690	3800	77,8±14,7	46,9±5,1
14	4	<i>S. chaucha</i>	24698	3880	84,5±10,8	31,1±14,5
15	5	<i>S. chaucha</i>	25000	3330	88,9±11,1	43,7±7,8
16	6	<i>S. chaucha</i>	24678	3300	56,7±3,3	32,7±1,5
17	7	<i>S. chaucha</i>	24682	3300	86,7±2,0	27,7±5,4
18	8	<i>S. chaucha</i>	24674	3700	77,1±2,9	62,2±2,2
		$X\pm m_x(2n=3x=36)$	N=8		78,9±4,0	39,1±4,1
Образцы тетраплоидного ($2n=4x=48$) культурного вида <i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigenum</i>						
19	1	ssp. <i>andigenum</i>	1789	2614	78,9±1,0	37,4±8,1
20	2	ssp. <i>andigenum</i>	1763	н/д	76,7±3,3	44,3±2,9
21	3	ssp. <i>andigenum</i>	1770	н/д	73,3±3,3	36,1±16,9
22	4	ssp. <i>andigenum</i>	3172	2800	86,7±2,0	61,7±2,4
		$X\pm m_x(2n=4x=48)$	N=4		78,9±2,8	50,1±5,9
Образцы триплоидного ($2n=3x=36$) культурного вида <i>S. juzepczukii</i> (в происхождении которого участвовал дикорастущий вид картофеля <i>S. acaule</i>)						
23	1	<i>S. juzepczukii</i>	25027	3740	91,7±8,3	53,4±0,8
24	2	<i>S. juzepczukii</i>	25015	3700	86,7±3,3	86,2±1,6
25	3	<i>S. juzepczukii</i>	25019	3820	87,0±3,2	67,0±3,2
		$X\pm m_x(2n=3x=36)$	N=3		88,4±1,6	68,8±9,5
Образцы тетраплоидного ($2n=4x=48$) дикорастущего вида <i>S. acaule</i>						
26	1	<i>S. acaule</i>	23005	3100	78,3±1,7	29,0±2,6
27	2	<i>S. acaule</i>	23004	3500	76,7±3,3	51,7±1,7
28	3	<i>S. acaule</i>	9814	3650	77,1±2,9	50,0±10,0
		$X\pm m_x(2n=4x=48)$	N=3		77,4±0,5	43,6±7,3

Примечания: Приведены данные по регенерационной способности верхушечных почек микрорастений, учтенные на 8 неделе после оттаивания эксплантов. н/д – нет данных о точке сбора образца. Числа хромосом для каждого образца, представленного конкретным клоном, были определены ранее (Gavrilenko et al., 2010).

Различия в показателях эффективности регенерации после замораживания/оттаивания между образцами различных видов, проанализированные с использованием критерия Тьюки, оказались не достоверными ($p < 0,05$), не позволив выделить однородные группы для представителей разных видов. В то же время разные виды были представлены различным числом образцов, поэтому влияние фактора «видовая принадлежность» можно было оценить для представителей только двух видов (*S. chaucha* и *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*), поскольку для каждого из них было изучено около 10-ти генотипов. Регенерационная способность образцов *S. chaucha* ($39,1 \pm 4,1\%$) статистически не отличалась от аналогичного показателя образцов *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* ($40,0 \pm 3,8\%$) ($t_{st} = 0,57 < 1,96$). Образцы диплоидных видов *S. stenotomum* и *S. phureja* также не отличались по показателям регенерации после оттаивания, частота посткриогенной регенерации составила $59,5 \pm 5,9\%$ и $50,4 \pm 5,8\%$, соответственно. Образцы других видов, представленные единичными генотипами, в статистическом обсчете не участвовали. Интересно отметить, что в нашем исследовании уровень посткриогенной регенерации селекционных сортов картофеля ($47,5 \pm 2,1\%$) достоверно не отличался от такового у образцов *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* ($40,0 \pm 3,8\%$) ($t_{st} = 1,7 < 1,96$). Эти результаты согласуются с данными других авторов, изучавших влияние видовых особенностей на способность к посткриогенному восстановлению у представителей других таксономических групп (Harvengt et al., 2004; Panis et al., 2005).

Регенерационная способность 10-ти образцов диплоидных видов (*S. stenotomum* и *S. phureja*) в среднем составила $55,9 \pm 4,3\%$, 10-ти триплоидных образцов (*S. chaucha* и *S. juzepczukii*) – $45,3 \pm 5,7\%$; средняя частота регенерации 14-ти тетраплоидных образцов (*S. tuberosum* ssp. *tuberosum* и *S. tuberosum* ssp. *andigenum*) составила $36,9 \pm 3,4\%$. Можно заключить, что различия в способности к посткриогенной регенерации у групп образцов разного уровня пloidности были не существенны ($p > 0,05$). Судя по литературным данным, полученным при криоконсервации большего числа образцов, регенерационная способность триплоидов, так же, как и в нашей работе, достоверно не отличалась от тетраплоидов (Panta et al., 2015; Vollmer et al., 2016).

Не исключено, что образцы различного эколого-географического происхождения, адаптированные к действию различных абиотических стрессоров, могут отличаться и по криорезистентности. Сравнение показателей эффективности регенерации после оттаивания было проведено в двух контрастных группах образцов (1) и (2):

(1) чилийские образцы, собранные на высоте менее 200 метров над ур. м. в районе острова Чилоэ, и прилегающей прибрежной материковой части Чили, эффективность регенерации которых варьировала от 31,9 до 70,8%, в среднем составив $51,0 \pm 3,5\%$, см. табл. 15;

(2) образцы андийских видов, собранные в высокогорных районах Анд на высотах от 3300 до 3950 метров над ур. м.:

(2a) 14 образцов трех родственных культурных видов с известными координатами и высотами точек их сбора, включая 3 образца *S. stenotomum*, 3 образца *S. phureja*, 8 образцов *S. chaucha*. В этой группе уровень регенерации после оттаивания варьировал от 30,6 до 80,0%, в среднем составив $47,2 \pm 3,9\%$ (см. табл. 16);

(2б) 6 образцов двух высокогорных родственных видов, включая 3 образца культурного гибридогенного вида *S. juzepczukii* и 3 образца дикорастущего вида *S. acaule*, эффективность посткриогенной регенерации которых варьировала от 29,0 до 86,2%, в среднем составив $60,4 \pm 7,7\%$ (см. табл. 16).

Оказалось, что уровень посткриогенной регенерации чилийских аборигенных сортов (группа 1) и высокогорных андийских видов картофеля (группы 2a, 2б и 2) достоверно ($p < 0,05$) не отличались.

Наши результаты согласуются с данными исследователей из Перуанского генбанка картофеля (Panta et al., 2015; Vollmer et al., 2016) которые указывают на отсутствие достоверных различий в посткриогенной регенерации между группами образцов, собранных в высокогорных областях и в прибрежных районах. В то же время, в недавней работе Vollmer et al. (2017), выполненной в той же лаборатории, получены противоположные результаты – у высокогорных образцов уровень регенерационной способности после оттаивания был существенно выше, чем у образцов картофеля из прибрежных районов. Таким образом, данный вопрос требует дальнейших исследований.

Таким образом, для образцов культурных видов картофеля, представленных селекционными и аборигенными южноамериканскими сортами, получены следующие результаты. Показана достоверная ($p \leq 0,05$) корреляция двух показателей посткриогенного восстановления изученных образцов: процентов жизнеспособности эксплантов и частоты их регенерации. Не выявлено статистически значимых ($p \leq 0,05$) отличий в уровне посткриогенной регенерации образцов разного уровня ploидности, различного эколого-географического происхождения и образцов различных видов картофеля.

В нашей работе выявлено существенное ($p \leq 0,05$) влияние генотипа на способность к посткриогенному восстановлению в разных группах образцов культурных видов картофеля, подтвержденное данными однофакторного дисперсионного анализа для выборки из 20 изученных селекционных сортов и для выборки из 28 аборигенных сортов. У тетраплоидных сортов картофеля эти показатели варьировали в широких пределах - от минимальных значений у сорта Ильинский ($26,7 \pm 3,3\%$) и Удача ($30,0 \pm 5,8\%$) до максимальных значений у сорта Импала ($73,3 \pm 3,3\%$) (см. табл. 15). Среди образцов ди-, три- и тетраплоидных культурных видов

картофеля также были выявлены отдельные генотипы с высокими (до 86,2%) и низкими (27%) показателями регенерации после оттаивания (см. табл. 15, 16). Эти результаты согласуются с данными других авторов (Kaczmarczyk et al., 2008; Gonsales-Arno, 2014; Niino, Valle-Arizaga, 2015; Bamberg et al., 2016).

Изучение связи показателей *in vitro* морфогенеза и посткриогенного восстановления

Сорта малины и ежевики были оценены по эффективности размножения на разных питательных средах (см. табл. 10). В случае образцов малины и ежевики значимых корреляций между показателями посткриогенного восстановления со значениями КМР не отмечено.

Другие закономерности выявлены для образцов картофеля. Как отмечено в разделе «материал исследований», микрорастения 20 селекционных сортов картофеля были получены из ВНИИКХ им. Лорха. Интересно отметить, что селекционные сорта картофеля в Банке здоровых семян картофеля ВНИИКХ им. Г. А. Лорха от Е. В. Овэс, которая предоставила нам свои результаты многолетней оценки этих сортов по нескольким показателям *in vitro* морфогенеза: 1 – продолжительность периода от черенкования до формирования микрорастениями 4–6 междоузлий; 2 – продолжительность фазы активного роста микрорастений (=фазы регенерации, фазы соответствия микрорастений стандартным характеристикам, т.е. период, позволяющий реализовать микрорастения, использовать для повторного черенкования или высадки в защищенный грунт); 3 – продолжительность всего вегетационного периода микрорастений до формирования ими микроклубней (или до полного отмирания). Кроме того, учитывали «возраст мериклона» – продолжительность периода с момента введения меристем в культуру *in vitro* – в зависимости от сорта этот период варьировал от 0,6 до 4,6 лет (данные Е.В. Овэс). Все 20 сортов были включены в программу по криоконсервации. Таким образом, у нас появилась возможность сопоставить данные по способности сортов к посткриогенной регенерации и их способности к морфогенезу *in vitro*. Эти исследования опубликованы в совместной статье (Ухатова Ю. В. Криоконсервация селекционных сортов картофеля в ВИРе / Ю. В. Ухатова, Е. В. Овэс, Н. Н. Волкова, Т. А. Гавриленко // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – Санкт-Петербург. – 2017. – Т. 178. – С. 13–20).

Выявлена существенная ($p \leq 0,05$) отрицательная корреляция между показателями *in vitro* морфогенеза (1, 2, 3) исходных микрорастений и показателями эффективности посткриогенного восстановления (выживаемости и регенерационной способности) изученных 20 селекционных сортов. Срок пребывания материала в культуре *in vitro* не оказывал значительного влияния ни на перечисленные выше показатели онтогенеза микрорастений, ни на эксплантов их способность к посткриогенному восстановлению (Ухатова и др., 2017).

Формирование криоколлекций малины, ежевики, картофеля в ВИРе

С использованием модифицированного метода дроплет-витрификации в 2010 году в ВИРе были начаты работы по созданию криоколлекции образцов культурных видов картофеля (Shvachko, Gavrilenko, 2011; Dunaeva et al. 2011; Shvachko, 2012). В последние годы проводятся исследования по оптимизации указанного выше метода, предложен оптимизированный протокол криоконсервации «DV-biotech» (Ukhatova et al., 2017), с использованием которого криоколлекция ВИР пополняется новыми сортами картофеля и образцами других культур (малина, ежевика) (Ухатова и др., 2016, Ukhatova et al., 2017).

Вопросы о стандартах и регламенте закладки образцов на криохранилище и организации криоколлекций растений активно обсуждаются в литературе. Наиболее часто в генбанках уровень посткриогенной регенерации 40% считается минимально допустимым для надежного сохранения образцов *in cryo* (Keller et al., 2011; Volk et al., 2016; Bamberg et al., 2016). Однако некоторые исследователи при закладке образцов на хранение в криобанки допускают минимальный порог посткриогенной регенерации в 20% (Dussert et al., 2003; Vollmer et al., 2017). Таким образом, минимальные значения посткриогенной регенерации четко не регламентированы, однако они имеют большое значение для определения числа сохраняемых *in cryo* эксплантов каждого коллекционного образца.

Исходя из вышесказанного, образцы изученной нами выборки были дифференцированы на три группы:

- А) образцы с высоким уровнем регенерационной способности после оттаивания – выше 40%;
- Б) образцы, уровень регенерации которых составил 21–39%;
- В) образцы, посткриогенная регенерационная способность которых была ниже 20%. Для таких образцов необходимо увеличивать число эксплантов, заложенных на криохранилище, поскольку при таком уровне регенерации 90 эксплантов не гарантируют надежного посткриогенного восстановления эксплантов сохраняемого образца из каждой пробирки.

Согласно полученным нами данным, из 17 сортов малины и ежевики 82,3% можно отнести к группе А, 11,8% – к группе Б и 5,9% (один сорт) – к группе В (см. табл. 14). Из 55 изученных абортгенных и селекционных сортов картофеля 41 (75%) можно отнести к группе А, и 14 (25%) – к группе Б (см. табл. 15, 16).

Согласно рекомендациям Dussert et al. (2003) и Volk et al. (2016), мы закладывали на хранение в криобанк по 90 эксплантов (в 9 криобанках) каждого образца. Такой подход позволяет не только долгосрочно сохранять образец в криобанке, но и периодически изымать по необходимости часть материала для мониторинга регенерационной способности данного образца спустя один год, 10 и 25 лет криохранилища.

В результате проведенной работы 65,8% (48 из 73 образцов) образцов малины, ежевики и картофеля были заложены на длительное хранение в криобанк ВИР в соответствии с рекомендованными в настоящее время стандартами (90 эксплантов на образец, уровень посткриогенной регенерации выше 40%). Практическим результатом выполненных исследований является уточнение регламента закладки на длительное хранение в криобанке ВИР образцов малины, ежевики и картофеля для их надежного сохранения при сверхнизких температурах (рис. 9).

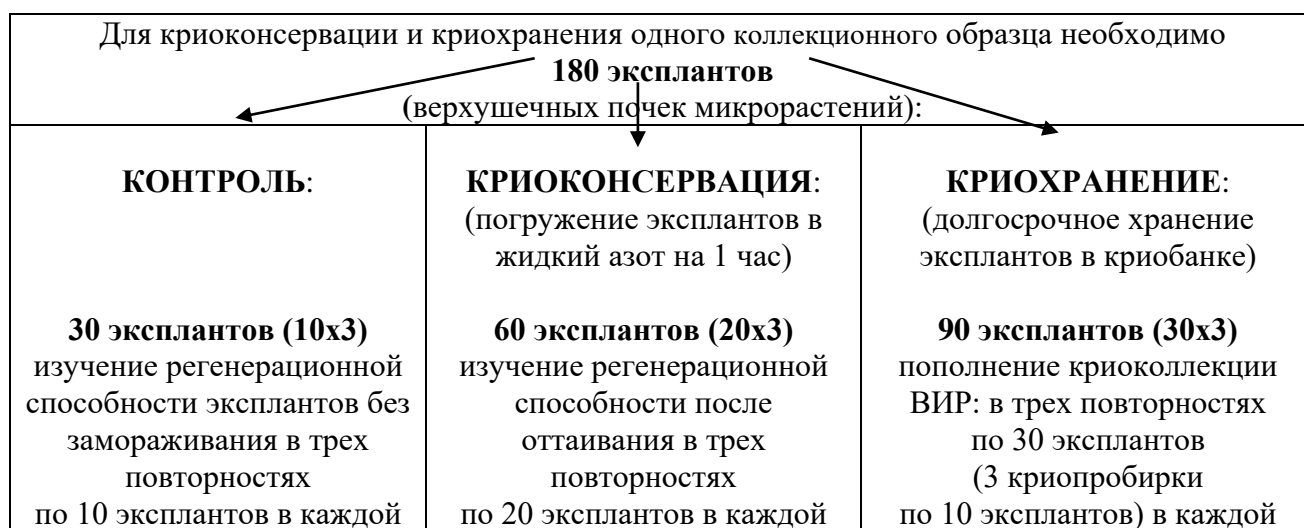


Рисунок 9 – Регламент для проведения экспериментов по криоконсервации и криохранению.

3.5. Оценка эффективности оздоровления микрорастений малины от вируса RBDV при использовании различных методов противовирусной терапии: химиотерапии, комплексной термо-химиотерапии и криотерапии на основе протокола «DV-biotech»

Отобранные по результатам ИФА клоны микрорастений двух сортов Новокитаевская и Самарская Плотная, содержащих вирус RBDV, маркировали и размножали черенкованием для проведения последующих опытов по оздоровлению их от вирусной инфекции с использованием методов криотерапии, химиотерапии и комплексной терапии (см. раздел 2.2.3.). Результаты экспериментов представлены в таблице 17.

«А» - Оздоровление микрорастений малины методом криотерапии

Метод капель-витрификации ранее для криотерапии малины не применялся. Известны попытки использования для криотерапии метода инкапсуляции-дегидратации, однако они оказались неуспешными (Wang et al., 2008). В настоящей работе для оздоровления от RBDV микрорастений двух сортов малины (Новокитаевская и Самарская Плотная) использован модифицированный метод капель-витрификации «DV-biotech». Эксперименты по

оздоровлению методом криотерапии проводили в трех повторностях, по 20 эксплантов в каждой. Перед началом проведения экспериментов по криотерапии микрорастения были индивидуально протестированы на наличие RBDV методом ОТ-ПЦР, так же, как и по окончании этих работ: методом ОТ-ПЦР тестировали клонально размноженные регенеранты.

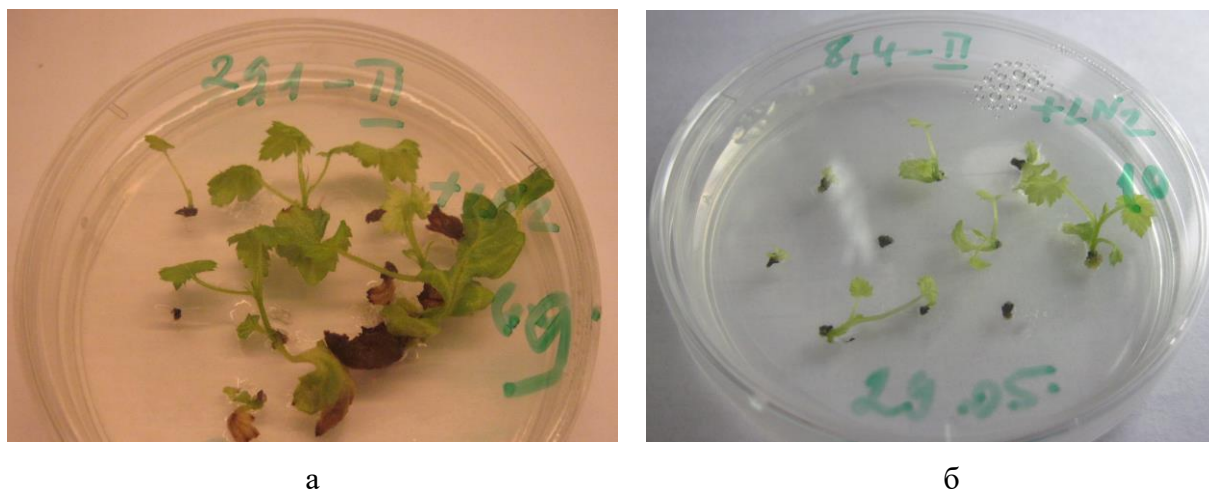


Рисунок 10 – Посткриогенные регенеранты сорта Самарская плотная (а) и Новокитаевская (б) на 8-ой неделе культивирования после криотерапии.

В экспериментах по криотерапии оба сорта проявили сравнительно высокий уровень жизнеспособности (60% Новокитаевская, 72,9% – Самарская Плотная) и регенерационной способности после замораживания/оттаивания (рис. 10): (43,3% – Новокитаевская 55,2% - Самарская плотная). Однако, среди протестированных 14 криорегенерантов обоих сортов не было выявлено ни одного оздоровленного микрорастения (табл. 17).

Таблица 17 – Результаты криотерапии, химио- и комплексной терапии микрорастений малины от вируса RBDV

Сорт	Число растений (клонов) выживших после терапии / число оздоровленных от RBDV клонов		
	А Криотерапия	Б Химиотерапия	В Комплексная терапия
Самарская плотная	7 / 0	8 / 0	3 / 3
Новокитаевская	7 / 0	6 / 0	2 / 1
Итого	14 / 0	14 / 0	5 / 4
% оздоровления	0%	0%	80,0%

К настоящему времени нам не удалось получить свободные от RBDV формы среди посткриогенных регенерантов малины, что подтверждает литературные данные об

использовании с той же целью других методов криоконсервации – инкапсуляции-витрификации на единичных сортах малины (Wang et al., 2008; Wang, Valkonen, 2009).

«Б»- Оздоровление микрорастений малины методом химиотерапии

При использовании метода химиотерапии (Б) для оздоровления микрорастений малины от RBDV проводили культивирование растительного материала на питательной среде с 30 мг/л рибавирина в течение трех циклов по 4 недели каждый; детали подробно описаны в разделе «материалы и методы» (с. 62). Для оздоровления методом химиотерапии использовали по 15 микрорастений каждого сорта. По окончании проведения экспериментов по химиотерапии микрорастения были индивидуально протестированы на наличие RBDV методом ИФА.

В варианте химиотерапии (Б) было отмечено замедление развития микрорастений по сравнению с контролем (среда без рибавирина). Как видно из таблицы 17, среди протестированных выживших 14 микрорастений не было выявлено ни одного оздоровленного клона. Наши данные дополняют результаты, полученные в отделе биотехнологии ВИР на большей выборке сортов малины с вирусом RBDV (Антонова и др., 2015), и вместе указывают на неэффективность использования метода химиотерапии (30 мг/л рибавирина в питательной среде) для оздоровления микрорастений малины от вируса RBDV. Кроме того, химиотерапия с применением других препаратов (рибавирин, азацитидин, дицианамид), судя по литературным данным, также оказалась неэффективной для оздоровления микрорастений малины от вируса RBDV (Pūrola et al., 2009).

«В» - Оздоровление микрорастений малины методом комплексной термо- химиотерапии

При использовании метода комплексной терапии для оздоровления микрорастений малины от RBDV растительный материал культивировали на питательной среде с 30 мг/л рибавирина в течение трех циклов по 4 недели каждый в термокамере при 35°C, с фотопериодом 16 часов. Для оздоровления микрорастений методом комплексной терапии использовали 15 клонов каждого сорта. Детали экспериментов подробно описаны в разделе «2.2.3.». По окончании проведения экспериментов по антивирусной терапии полученные микрорастения были индивидуально протестированы на наличие RBDV методом ИФА. Те микрорастения, у которых RBDV по данным ИФА не был выявлен, дополнительно тестировали методом ОТ-ПЦР. Полученные результаты ИФА и ОТ-ПЦР не противоречили друг другу.

В варианте комплексной терапии (В), проводимой в течение 1-3 месяцев, большая часть микрорастений обоих сортов погибла, и к концу экспериментов выжило только три микрорастения сорта Самарская Плотная и два микрорастения сорта Новокитаевская. После окончания комплексной терапии (В) у всех трех выживших микрорастений сорта Самарская Плотная и одного из двух выживших микрорастений сорта Новокитаевская, RBDV не был выявлен (см. табл. 17). В варианте комплексной терапии средний по двум сортам процент

оздоровления микрорастений малины от RBDV составил 80%. Оздоровленные клоны сортов Новокитаевская и Самарская Плотная в дальнейшем поддерживались индивидуально в культуре *in vitro*. Важно отметить, что в нашей работе сравнение эффективности трех разных методов оздоровления микрорастений от RBDV (криотерапии, химиотерапии, комплексной терапии) было проведено на одних и тех же сортах, более того, - на одних и тех же клонах.

Для оценки значимости различий в эффективности оздоровления от RBDV между вариантами А и В, Б и В был использован точный критерий Фишера, поскольку исследуемые выборки имели небольшие размеры из-за низкой жизнеспособности и гибели микрорастений в вариантах антивирусной терапии Б и В. Точный критерий Фишера, рассчитанный в программе StatSoft Statistica, модуль «Непараметрическая статистика», показал, что различия между вариантами А и В, Б и В были достоверными ($p=0,0013$).

Наши данные дополняют результаты работы Антоновой с коллегами (2015), в которой на большей выборке сортов малины продемонстрирована эффективность комплексной термо-химиотерапии для оздоровления микрорастений малины от RBDV. Необходимо учитывать, что метод комплексной термо- химиотерапии приводит к высокой частоте гибели микрорастений, поэтому в такой вариант антивирусной терапии следует включать большое число исходных генотипов.

Таким образом, метод комплексной термо- химиотерапии, позволяющий получить до 80% свободных от вируса микрорастений, может быть предложен для оздоровления микрорастений малины от RBDV.

3.6. Изучение эффективности оздоровления микрорастений картофеля от вируса скручивания листьев картофеля (PLRV) методами комплексной термо-химиотерапии и криотерапии на основе оптимизированного протокола «DV-biotech»

Отобранные по результатам ИФА клоны микрорастений чилийских сортов картофеля, содержащих вирус скручивания листьев картофеля PLRV, маркировали и размножали черенкованием для проведения последующих опытов по оздоровлению их от вирусной инфекции методами криотерапии и комплексной терапии.

«А» – Оздоровление микрорастений аборигенных чилийских сортов картофеля методом криотерапии

Метод капель-витрификации впервые применен для криотерапии картофеля с целью оздоровления микрорастений от PLRV. Для инициации работ по криотерапии картофеля использовали микрорастения одного образца – к-7540_ВСЛК, у которого методом ИФА был диагностирован PLRV. Эксперименты по оздоровлению методом криотерапии проводили в

трех повторностях, по 20 эксплантов на каждую. Детали методики описаны в разделе «материалы и методы» (с. 64).

В экспериментах по криоконсервации образец чилийского аборигенного сорта картофеля *S. tuberosum* к-7450_ВСЛК проявил сравнительно высокий уровень жизнеспособности и регенерационной способности – 76,5 и 46,7%, соответственно (рис. 11).



Рисунок 11 – Криорегенеранты клона чилийского аборигенного сорта картофеля *S. tuberosum* к-7450_ВСЛК на 8-ой неделе культивирования после криотерапии.

У 14 посткриогенных регенерантов, выбранных из трех разных повторностей опыта, была изолирована РНК для проведения индивидуального ОТ-ПЦР анализа.

Как показали результаты ОТ-ПЦР-анализа, после проведенной криотерапии для 13 (92,9%) из 14 протестированных криорегенерантов был определен безвирусный статус (рис. 12). Оздоровленные клоны в дальнейшем поддерживались индивидуально в культуре *in vitro*.

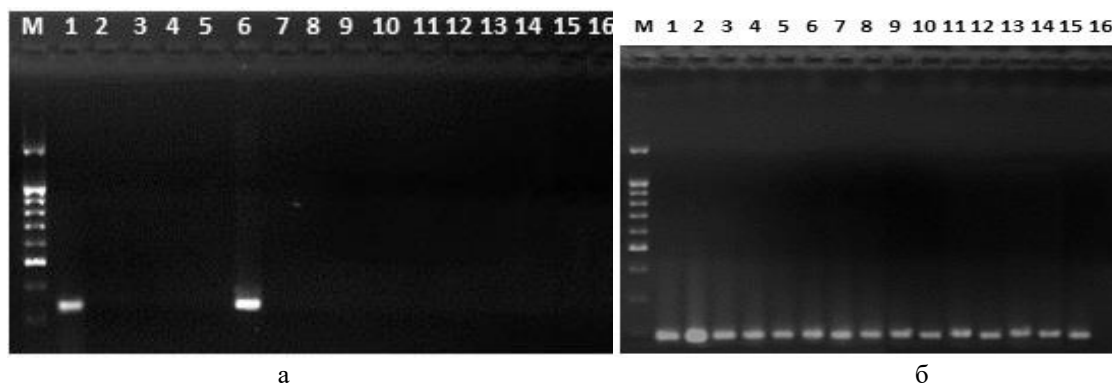


Рисунок 12 – Тестирование *in vitro* растений клона к-7450-ВСЛК на наличие вируса PLRV при помощи метода ОТ-ПЦР (вариант опыта – оздоровление методом криотерапии):
 а – ПЦР с праймерами, специфичными к последовательностям генома PLRV,
 б – ПЦР с праймерами, специфичными к последовательности гена белка тубулина;
 М – маркер молекулярного веса; 1 – исходное микрорастение (до криотерапии), 2-15 – посткриогенные регенеранты, 16 – вода.

Полученные результаты указывают, что метод криотерапии на основе дроблет-витрификации эффективен для оздоровления микрорастений картофеля от вируса PLRV.

«Б»- Оздоровление микрорастений аборигенных чилийских сортов картофеля методом комплексной термо- химиотерапии

Отобранные по результатам ИФА клоны микрорастений 14 чилийских сортов картофеля, содержащих вирус PLRV, маркировали и размножали черенкованием для проведения последующих опытов по оздоровлению их от вирусной инфекции методом комплексной терапии. Растительный материал культивировали на питательной среде МС с 30 мг/л рибавирина в течение трех циклов по 4 недели каждый в термокамере при 35°C. Для оздоровления использовали от 15 до 20 микрорастений каждого образца – всего около 200 микрорастений. Детали экспериментов подробно описаны в разделе 2.2.3. (с. 63–64).

В процессе оздоровления методом комплексной химио- и термотерапии у каждого образца выжили только единичные растения (от одного до трех), т.е. меньше 10% исходных микрорастений. У 19 выживших микрорастений 14 образцов была изолирована РНК для проведения ОТ-ПЦР анализа с праймерами, специфичными к последовательностям генома PLRV. Результаты проведенного тестирования подтвердили безвирусный статус 12 (63,2%) из 19 микрорастений, которые относились к 8 коллекционным образцам. У оставшихся 7 клонов шести коллекционных образцов (36,8%) вирус PLRV сохранился (табл. 18). Оздоровленные микрорастения сортов в дальнейшем поддерживались индивидуально в культуре *in vitro*.

Таблица 18 – Результаты оздоровления образцов аборигенных чилийских сортов (*S. tuberosum*) от PLRV методом комплексной термо- химиотерапии (по данным ОТ-ПЦР-анализа)

№ п/п	Образец, к-ВИР	Число растений (клонов)	
		выживших после терапии	оздоровленных от PLRV
1	7528	2	2
2	3407а	2	2
3	7586	3	3
4	10648	2	0
5	7568	1	1
6	24602	1	1
7	3446	1	0
8	2117 (В-206)	1	1
9	7583	1	1
10	3488	1	0
11	7529	1	0
12	2148 (Юз-8973)	1	1
13	3456	1	0
14	7573	1	0
	ВСЕГО	19	12 (63,2%)

Оценка различий в эффективности двух методов оздоровления микрорастений картофеля от вируса PLRV, проведенная на основе подсчета коэффициента Стьюдента, показала достоверно более высокую ($p \leq 0,05$) эффективность криотерапии по сравнению с комплексной термо- химиотерапией (рис. 13).

Отметим, что полученные результаты сравнимы с литературными данными по эффективности метода комбинированной термо- химиотерапии: Dhital et al. (2007) получили более 60% оздоровленных от PLRV микрорастений картофеля. При этом S. P. Dhital с соавторами (2007) использовали три и более циклов терапии, длившихся 30 – 36 дней каждый и/или вводили в питательную среду дополнительные реагенты (рибавирин дополнен ацетилсалициловой кислотой) (Dhital et al., 2007).

В нашей работе был впервые применен метод капель-витрификации для криотерапии микрорастений картофеля от PLRV. Выбор данного метода объясняется тем, что его использование позволяет получить высокие показатели посткриогенного восстановления, что было подтверждено нашими исследованиями по криоконсервации (раздел 3.4., с. 79–87).

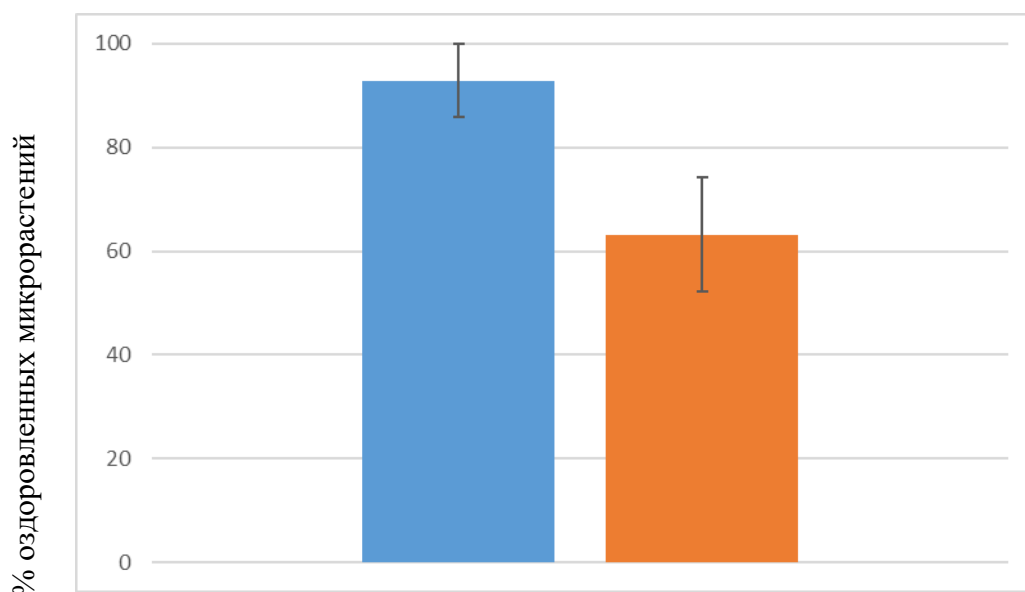


Рисунок 13 – Сравнение эффективности методов оздоровления микрорастений образцов аборигенных чилийских сортов (*S. tuberosum*) от вируса PLRV: криотерапии (слева) и комплексной термо- химиотерапии (справа).

Согласно полученным нами результатам, эффективность метода криотерапии на основе протокола криоконсервации «DV-biotech» (92,9%) достоверно ($p < 0,05$) превышала соответствующие показатели в варианте использования комплексной термо- химиотерапии (63,2%). Подчеркнем, что использование метода криотерапии имеет ряд преимуществ, поскольку позволяет в одних и тех же экспериментах проводить оздоровление образца от

вирусных инфекций и его криоконсервацию. Таким образом, полученные нами результаты и литературные данные указывают на эффективность метода криотерапии в отношении вируса PLRV и позволяют рекомендовать метод криотерапии для оздоровления микрорастений картофеля от PLRV.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Коллекции вегетативно размножаемых культурных растений сильно поражаются вирусами и другими патогенами в процессе длительного поддержания в полевых генбанках. Для сохранения генофонда сортов, гибридов и селекционных клонов наряду с полевыми коллекциями необходимо создавать дублетные *in vitro* и криоколлекции, позволяющие сохранять оздоровленные от патогенов образцы вегетативно размножаемых культур в контролируемых условиях среды. Разработка новых и совершенствование существующих методов оздоровления растений от вирусных инфекций важны и для развития современного семеноводства, которое основано на производстве высококачественного безвирусного посадочного материала. Настоящая работа направлена на совершенствование методов криоконсервации и оздоровления от вирусных болезней образцов вегетативно размножаемых культур из коллекции ВИР на примере малины, ежевики, картофеля.

Для включения образцов *in vitro* коллекции, представленной генетически разнообразным материалом, в программы по криоконсервации необходимо первоначально оценить их способность к «эффективному клональному микроразмножению» (Reed, 1990) и подобрать условия для получения в кратчайшие сроки достаточного количества исходных микрорастений (источников эксплантов).

В соответствии со схемой В.-М. Reed (1990) проведена оценка способности к эффективному клональному микроразмножению 65 сортов малины и ежевики из *in vitro* коллекции ВИР. В среднем в группе образцов ежевики значения коэффициентов микроразмножения (КМР) на питательной среде №1 были существенно выше, чем у изученной выборки образцов малин. 90% образцов ежевики проявили способность к «эффективному микроразмножению» к концу 6 недели культивирования на этой среде. Образцы малины были более требовательными к составу питательных сред; для 42% сортов малины требовалось двухэтапное культивирование на разных средах для достижения значений $KMP \geq 3$. Продемонстрировано существенное влияние генотипа на способность образцов малины и ежевики к «эффективному микроразмножению». На основании полученных результатов выполнено структурирование *in vitro* коллекции представителей рода *Rubus* и отобраны генотипы с высокими значениями КМР для вовлечения их в эксперименты по криоконсервации.

В настоящее время метод дроплет-витрификации (DV), разработанный (Panis et al., 2005) широко используется для криоконсервации *in vitro* образцов многих культурных видов – представителей более 10 семейств; при этом используются различные модификации данного метода (Panis et al., 2016). О криоконсервации образцов рода *Rubus* на основе различных модификаций оригинального метода DV сообщается в нескольких публикациях, однако ряд

важных деталей протоколов криоконсервации в статьях либо не уточнен, либо выявляются значительные противоречия методик, разработанных в разных лабораториях и часто апробированных лишь на единичных образцах. В нашей работе было установлено, что вариант обработки верхушечных почек микрорастений малины раствором криопротекторов PVS2 в течение 30 минут является оптимальным – эти условия обуславливают наиболее высокую частоту формирования криорегенерантов. Продемонстрирована достоверно более высокая способность к посткриогенному восстановлению верхушечных почек *in vitro* растений по сравнению с пазушными.

На основании анализа литературных данных по использованию метода капель-витрификации и его модификаций, а также полученных нами результатов по оптимизации продолжительности обработки эксплантов раствором криопротекторов PVS2, был предложен оптимизированный протокол «DV-biotech» для криоконсервации образцов малины и ежевики.

С использованием протокола «DV-biotech» изучена способность к посткриогенной регенерации у 17 сортов малины и ежевики. Различия в уровне посткриогенной регенерации между сортами малины и ежевики были недостоверны. Выявлено существенное влияние генотипа на уровень посткриогенной регенерации этих образцов.

Тот же «DV-biotech» протокол был использован для криоконсервации 58 образцов картофеля - 35 образцов 5 культурных видов (*S. tuberosum ssp. tuberosum*, *S. tuberosum ssp. andigenum*, *S. stenotomum*, *S. phureja*, *S. chaucha*, *S. juzepczukii*), 20 селекционных сортов и трех образцов дикого вида *S. acaule*. Как и в предыдущей серии экспериментов установлена значимая корреляция двух показателей посткриогенного восстановления изученных образцов: жизнеспособности эксплантов после оттаивания и частоты их регенерации. Выявлено существенное влияние типа экспланта на уровень посткриогенной регенерации образцов картофеля - показатели посткриогенного восстановления у верхушечных почек микрорастений были существенно выше таковых у пазушных. Установлено достоверное влияние генотипа на регенерационную способность эксплантов после замораживания-оттаивания по результатам изучения всей выборки из 55 образцов культурных видов картофеля и в трех разных группах - селекционных сортов, аборигенных чилийских и аборигенных андийских сортов. В то же время не выявлено статистически значимых отличий в уровне посткриогенной регенерации образцов разных культурных видов, образцов разного уровня ploидности и различного эколого-географического происхождения, что согласуется с данными исследователей из генбанка картофеля CIP, Перу (Panta et al., 2015; Vollmer et al., 2016).

В рамках выполняемых исследований параллельно с изучением способности образцов коллекции к посткриогенному восстановлению выполнялись работы по закладке материала на длительное хранение в криобанк ВИР. 66% (48 из 73) образцов малины, ежевики и картофеля

были заложены на длительное хранение в криобанк ВИР в соответствии с рекомендованными в настоящее время стандартами - 90 эксплантов на образец, уровень посткриогенной регенерации выше 40%. В результате выполненных работ был уточнен регламент закладки на длительное хранение в криобанке ВИР образцов малины, ежевики и картофеля для их надежного сохранения при сверхнизких температурах с учетом повторностей, контролей и оценки регенерационной способности эксплантов после оттаивания. Данный регламент может быть применен при формировании криоколлекций других вегетативно размножаемых культур.

Важным элементом длительного надежного сохранения образцов вегетативно размножаемых культур в коллекциях является фитосанитарный статус сохраняемого растительного материала. Исследования, направленные на совершенствование методов оздоровления растений от вирусов актуальны как для генбанков, так и для решения задач селекции и семеноводства. Как известно, вирусные болезни вызывают снижение качества посадочного материала (Упадышев, 2011; Мытницкая и др., 2012; Анисимов и др., 2016, 2017).

В рамках настоящей работы проведена оценка эффективности оздоровления микрорастений малины от RBDV с использованием различных методов антивирусной терапии: химиотерапии, комплексной термо-химиотерапии и криотерапии на основе протокола «DV-biotech». Применение методов криотерапии и химиотерапии для оздоровления *in vitro* растений малины от RBDV оказалось не эффективным. Продемонстрирована возможность получения оздоровленных от RBDV микрорастений малины при использовании метода комплексной терапии, включающей обработку микрорастений, культивируемых на среде с рибавирином (30 мг/л), повышенной температурой (35°C).

Изучена эффективность оздоровления микрорастений картофеля от PLRV при использовании метода криотерапии и комплексной термо-химиотерапии. Показано, что эффективность оздоровления микрорастений картофеля от PLRV методом криотерапии была существенно ($p \leq 0,05$) выше, чем при использовании метода комплексной термо-химиотерапии. Полученные результаты позволяют рекомендовать метод криотерапии для оздоровления микрорастений картофеля от PLRV.

Использование метода криотерапии имеет ряд преимуществ, поскольку позволяет в одних и тех же экспериментах проводить оздоровление образца от определенных вирусных инфекций и его криоконсервацию для длительного хранения при сверхнизких температурах.

ВЫВОДЫ

1. Продемонстрировано существенное влияние генотипа на способность образцов малины и ежевики к «эффективному микроразмножению». На основании полученных результатов выполнено структурирование *in vitro* коллекции представителей рода *Rubus*.

2. Установлено, что вариант обработки верхушечных почек микрорастений малины раствором криопротекторов PVS2 в течение 30 минут является оптимальным – эти условия обуславливают наиболее высокую частоту формирования криорегенерантов. Продемонстрирована достоверно более высокая способность к посткриогенному восстановлению верхушечных почек *in vitro* растений по сравнению с пазушными. На основании полученных результатов, а также анализа литературных данных предложен оптимизированный протокол «DV-biotech» для криоконсервации образцов малины и ежевики.

3. Установлено существенное влияние генотипа на регенерационную способность после замораживания-оттаивания у образцов малины и ежевики. Различия в частоте регенерации эксплантов после оттаивания у образцов этих двух групп были не достоверными.

4. Изучена способность к посткриогенному восстановлению у 55 образцов пяти культурных видов картофеля. Установлено существенное влияние генотипа на регенерационную способность после замораживания-оттаивания у образцов культурных видов картофеля. Не выявлено статистически значимых отличий в уровне посткриогенной регенерации у образцов разных видов, образцов разного уровня ploидности и различного эколого-географического происхождения.

5. Показано, что применение методов криотерапии и химиотерапии для оздоровления *in vitro* растений малины от RBDV не эффективно. Продемонстрирована возможность получения оздоровленных от RBDV микрорастений малины при использовании метода комплексной терапии, включающей обработку микрорастений, культивируемых на среде с рибавирином, повышенной температурой (35°C).

6. Установлено, что эффективность оздоровления микрорастений картофеля от PLRV методом криотерапии была существенно выше, чем при использовании метода комплексной термо-химиотерапии.

Практические рекомендации:

1. Для криоконсервации сортов, гибридов и селекционных клонов малины, ежевики, картофеля рекомендуется использовать оптимизированный протокол «DV-biotech».
2. Предложенный регламент закладки образцов на длительное хранение может быть использован при пополнении криоколлекций образцов картофеля, малины и ежевики, а также других вегетативно размножаемых культур.
3. Метод криотерапии на основе протокола «DV-biotech» можно рекомендовать для оздоровления микрорастений картофеля от вируса PLRV.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

- 2-ip – изопентиладенин;
- dNTP – дезоксинуклеозид трифосфат;
- LN – жидкий азот;
- LN – варианты опытов по криоконсервации с погружением эксплантов в жидкий азот;
- +LN – контрольный вариант криоконсервации, без погружения эксплантов в жидкий азот
- LS – Loading solution, погружающий раствор;
- PVS2 – витрифицирующий раствор 2;
- PVS3 – витрифицирующий раствор 3;
- RS – Rewarming solution, раствор для оттаивания;
- r_s – коэффициент ранговой корреляции Спирмена;
- TDZ – тидиазурон;
- t_{st} – коэффициент Стьюдента;
- БАП – 6-бензилоаминопурин;
- ГК – гибберелловая кислота;
- ДМСО – диметилсульфоксид;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ЖС – жидкая среда, без агара;
- ИМК – индолил-3-масляная кислота;
- ИУК – индолил-3-уксусная кислота;
- ИФА – иммуноферментный анализ;
- КМР – коэффициент микроразмножения;
- КТ – комнатная температура (20°C);
- МС – питательная среда Мурасиге-Скуга ();
- МСТo – питательная среда Мурасиге-Скуга с добавлением фитогормонов по прописи Towill, 1983;
- ½МС – среда Мурасиге-Скуга с половинным составом минеральных солей;
- НУК – альфа-нафтилуксусная кислота;
- ОТ – обратная транскрипция;
- ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- РНК – рибонуклеиновая кислота;
- РС – регенерационная способность;
- AgMV – вирус мозаики резухи;
- PLRV – вирус скручивания листьев картофеля;

PMTV – вирус метельчатости верхушек картофеля;
 PVA – вирус картофеля A;
 PVM – вирус картофеля M;
 PVS – вирус картофеля S;
 PVV – вирус картофеля V;
 PVX – вирус картофеля X;
 PVY – вирус картофеля Y;
 RBDV – вирус кустистой карликовости малины;
 RpRSV – вирус кольцевой пятнистости малины;
 SLRSV – вирус латентной кольцевой пятнистости земляники;
 TBRV – вирус черной кольцевой пятнистости томата;
 TRV – вирус погрешковости табака;

Методы криоконсервации:

Dg – дроплет-метод;
 DV – дроплет-витрификация;
 ED – инкапсуляция-дегидратация;
 EV – инкапсуляция-витрификация;
 gelled DV – гелевая дроплет-витрификация;
 SF – медленное замораживание;
 Vi – витрификация;

Генбанки и научные организации:

ARD – Agricultural Research and Development, Испания;
 CAES – Central Agricultural Experiment Station, Hokkaido Research Organization, Япония;
 CIP – International Potato Center, Международный центр картофеля, Перу;
 CRI – Crop Research Institute, Чехия;
 EVIKA – Estonian Research Institute of Agriculture, Эстония;
 FRI – Fruit Research Institute, Сербия;
 INIFAP – National Genetic Resources Center, National Forestry, Crops and Livestock Research Institute, Мексика;
 IPBB - Institute of Plant Biology and Biotechnology at National Center of Biotechnology, Алматы, Казахстан;
 IPK – Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Германия;
 MTT ARF – MTT Agrifood Research Finland, Plant Production Research, Финляндия;
 NAC – National Agrobiodiversity Center, Южная Корея;
 NBPGR – National Bureau of Plant Genetic Resources, Индия;

NCGR – National Clonal Germplasm Repository, Корвалис, США;

NCGRP – National Center for Genetic Resources Preservation, США;

NGC – National Genebank of China, Китай;

NLGRP – National Laboratory for Genetic Resources Preservation, Форт Колинс, США;

USPG – US Potato Genebank, США;

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

ВНИИКХ – Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства им. Г. А. Лорха;

ВСТИСП – Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства;

ИФР – Институт физиологии растений имени К. А. Тимирязева.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуваси, И. Создание коллекции *in vitro* оздоровленных растений малины – *Rubus idaeus* L. / И. Абдуваси // Научно-технический бюллетень ВИР. – 1994. – № 233. – С. 75–76.
2. Анисимов, Б. В. Вирусные болезни и их контроль в семеноводстве картофеля / Б. В. Анисимов // 2014. – С. 12–18.
3. Анисимов, Б. В. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / Б. В. Анисимов, Г. Л. Белов, Ю. А. Варицев, С. Н. Еланский, Г. К. Журомский, С. К. Завриев, В. Н. Зейрук, В. Г. Иванюк, М. А. Кузнецова, М. П. Пляхневич, К. А. Пшеченков, Е. А. Симаков, Н. П. Склярова, А. И. Усков, И. М. Яшина // М. – Картофелевод. – 2009. – 272 с.
4. Антонова О.Ю. Оздоровление микрорастений трех культурных видов картофеля (*Solanum tuberosum* L., *S. phureja* Juz. & Buk. и *S. stenotomum* Juz. & Buk.) от вирусов методом комплексной термо-химиотерапии / О.Ю. Антонова, О.В. Апаликова, Ю.В. Ухатова, Е.А. Крылова, О.Ю. Шувалов, А.Р. Шувалова, Т.А. Гавриленко // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Т.52. – №1. – С. 95–104.
5. Антонова, О. Ю. Оздоровление малины от вируса кустистой карликовости (RBDV) методом комплексной терапии в культуре *in vitro* / О. Ю. Антонова, С. Е. Дунаева, Ю. В. Ухатова, Н. Ю. Камылина, Н. А. Долганова, О. В. Лисицына, Т. А. Гавриленко // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – Т. 29. – № 7. – С. 61–64.
6. Атабеков, И. Г. Биотехнологические методы в безвирусном растениеводстве / И. Г. Атабеков, М. Э. Тальянский // В сб.: Достижения сельскохозяйственной науки. – М. – 1987. – С. 121–136.
7. Атрощенко, Г. П. Научные основы ускоренного оздоровления и размножения смородины при производстве элиты / Г. П. Атрощенко : автореф. дис. ... док. с.-х. наук. – Мичуринск, 1995. – 59 с.
8. Атрощенко, Г. П. Оценка сортов ремонтантной малины по основным хозяйственным признакам в условиях Ленинградской области / Г. П. Атрощенко, Г. В. Щербакова // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. – 2015. – № 39. – С. 24–28.
9. Атрощенко, Г. П. Хозяйственно-биологическая оценка сортов ремонтантной малины в условиях Ленинградской области / Г. П. Атрощенко, Г. В. Щербакова // Современное садоводство. – 2013. – № 4 (8). – С. 29–33.
10. Белоус, А. М. Криобиология / А. М. Белоус, В. И. Грищенко // Киев, 1994. – 432 с.
11. Бойко, В. В. Использование ингибиторов вирусной инфекции при оздоровлении картофеля / В. В. Бойко, Т. В. Зейрук // Защита картофеля от болезней и вредителей: науч. тр. НИИ картофельного хозяйства. – М. – 1984. – С.48–52.

12. Бондус, Р. А. Изучение устойчивости коллекционных сортов картофеля к вирусным болезням в лесостепи Украины / Р. А. Бондус, О. П. Таран, Л. Т. Мищенко, С. А. Павлик // Живые и биокосные системы. – 2014. – № 9. – URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-9/article-29>.
13. Букасов, С. М. Принципы систематики картофеля / С. М. Букасов // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – Л., 1978, – Т. 62. – С. 3–35.
14. Бутенко, Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р. Г. Бутенко // М.: Наука, 1964. – 272 с.
15. Бьядовский, И. А. Влияние различных концентраций 6-бензиламинопурина и тидиазурона на коэффициент размножения клоновых подвоев яблони и груши в культуре *in vitro* / И. А. Бьядовский // Плодоводство и ягодоводство России. – 2013. – Т. 37. – № 1. – С. 52–56.
16. Вержук, В. Г. Влияние криоконсервации на жизнеспособность побегов яблони / В. Г. Вержук, Н. Г. Тихонова, Н. И. Савельев, Д. С. Дорохов // Плодоводство и ягодоводство России. – 2011. – Т. 28. – № 1. – С. 88–91.
17. Вержук, В. Г. Влияние света и концентрации сахарозы в среде проращивания на проращение пыльцы яблони / В. Г. Вержук, Г. И. Филипенко, А. В. Павлов, И. В. Поротников, Д. Д. Бондарук // Путь науки. – 2016. – № 3. – С. 14–19.
18. Вержук, В. Г. Криоконсервация вегетативных почек черешни и вишни с использованием криопротекторов / В. Г. Вержук, Г. И. Филипенко, А. В. Павлов // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – Т. 29. – № 7. – С. 65–67.
19. Вержук, В. Г. Разработка методов криосохранения генетических ресурсов растений плодовых и ягодных культур / В. Г. Вержук, Г. И. Филипенко, Н. Г. Тихонова, А. С. Жестков, Ю. В. Лупышева, Н. А. Пупкова, Е. В. Михайлова, Н. И. Савельев, Д. С. Дорохов // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – Санкт-Петербург. – 2009. – Т. 166. – С. 353–357.
20. Власов, Ю. И. Вирусные и микоплазменные болезни растений / Ю. И. Власов. М. : Колос, 1992. – 208 с.
21. Власов, Ю. И. Сельскохозяйственная вирусология / Ю. И. Власов, Э. И. Ларина // Учебники и учеб. пособия для высш. с.-х. учеб. Заведений. – М.: Колос. – 1982. – 239 с.
22. Власов, Ю. И. Сельскохозяйственная фитовирусология / Ю.И. Власов, Э.И. Ларина, Э.В. Трускинов // СПб-Пушкин: ФГБНУ ВИЗР. – 2016. – 236 с.
23. Вовк, В. В. Использование цитокининов ряда дифенилмочевины при микроклональном размножении межвидовых ремонтантных форм малины / В. В. Вовк, В. В. Заякин, И. Я. Нам, И. В. Казаков // Сельскохозяйственная биотехнология. – 1999. – № 5. – С. 52–56.

24. Вовк, В. В. Оптимизация селекционного процесса и ускоренное размножение межвидовых ремонтантных форм малины методом *in vitro* / В. В. Вовк : дис. ... канд. с.-х. наук. Брянск, 2000. – 127 с.
25. Волкова, Л. А. Восстановление цитогенетических и физиологических характеристик популяции клеток люцерны после криогенного хранения / Л. А. Волкова, В. В. Урманцева, А. Б. Бургутин, А. М. Носов // Физиология растений. – 2015. – Т. 62. – № 5. – С. 720–728.
26. Высоцкая, О. Н. Криоконсервация меристем малины (*Rubus idaeus* L.) изолированных из растений *in vitro* / О. Н. Высоцкая, А. И. Мохаммед, Р. Г. Бутенко // Известия АН. Серия биология. – 1999. – №1. – С.25–29.
27. Высоцкая, О. Н. Способ криосохранения меристем, изолированных из растений малины красной (*Rubus idaeus* L.) *in vitro* / О. Н. Высоцкая, А. С. Попов // Патент РФ № 2248121. – Бюлл. Изобретений. – 2005. – № 8. – Ч. II. – С. 338.
28. Высоцкий В.А. Регенерационная способность изолированных меристематических верхушек черной смородины и вишни и методы получения из них целых растений / В.А. Высоцкий // Дисс.... канд. биол. наук. – 1978. – 165 с.
29. Высоцкий, В. А. Клональное микроразмножение растений / В. А. Высоцкий // Культура клеток растений и биотехнология. – 1989. – С. 91–102.
30. Высоцкий, В.А. Длительное сохранение *in vitro* ягодных растений рода *Rubus* sp / В. А. Высоцкий // В книге: Хранение и использование генетических ресурсов садовых и овощных культур. Сборник тезисов докладов и сообщений международной научно-практической конференции. – 2015а. – С. 128–129.
31. Высоцкий, В. А. Совершенствование методов сохранения ценных генотипов плодовых и ягодных культур *in vitro* / В. А. Высоцкий // Плодоводство и ягодоводство России. – 2015б. – Т. 41. – С. 69–73.
32. Высоцкий, В. А. Появление уклоняющихся форм при длительном культивировании ягодных растений *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. 2016. Т. XXXXV. С. 54–57.
33. Высоцкий, В. А. Изменение регенерационной способности эксплантов представителей рода *Rubus* в зависимости от числа субкультивирований *in vitro* / В. А. Высоцкий, М. Т. Упадышев // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. – 2016. – № 12. – С. 185–187.
34. Высоцкий, В. А. Регенерационная способность эксплантов рода *Rubus* L. различного происхождения / В. А. Высоцкий, М. Т. Упадышев // Садоводство и виноградарство. 2015. № 4. С. 24–29.

35. Гавриленко, Т. А. Использование методов биотехнологии для сохранения генетических ресурсов вегетативно размножаемых культурных растений в контролируемых условиях среды / Т. А. Гавриленко, С. Е. Дунаева, О. Ю. Антонова, Н. А. Швачко, А. Р. Шувалова, Ю. В. Ухатова, Л. Е. Шувалова, Г. И. Пендинен, Е. А. Крылова, Н. Н. Волкова, О. В. Апаликова, М. М. Черепко, А. Е. Малафеева // Материалы VIII Московского Международного Конгресса «Биотехнология: Состояние и Перспективы Развития» 17-20 Марта 2015 г. – М. : ЗАО «Экспо-биохим-технологии». – РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2015. – Т. 2. – С. 25–26.
36. Гавриленко, Т. А. Стратегия долгосрочного сохранения генофонда вегетативно размножаемых сельскохозяйственных растений в контролируемых условиях среды / Т. А. Гавриленко, С. Е. Дунаева, Э. В. Трускинов, О. Ю. Антонова, Г. И. Пендинен, Ю. В. Лупышева, В. В. Роговая, Н. А. Швачко // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2007. – Т. 164. – С. 273–283.
37. Гавриленко, Т. А. Создание устойчивых к вирусам растений картофеля на основе традиционных подходов и методов биотехнологии / Т. А. Гавриленко, Е. В. Рогозина, О. Ю. Антонова // В кн.: Идентифицированный генофонд растений и селекция. – С-Петербург, 2005. – С. 644–662.
38. Гиричев, В. С. Коллекции плодовых, ягодных и декоративных растений как инструмент повышения эффективности селекционного процесса / В. С. Гиричев, В. А. Высоцкий, Л. А. Марченко, Л. В. Алексеенко, А. А. Данилова, А. В. Артюхова // Сельскохозяйственная биология. – 2012. – № 5. – С. 48–53.
39. Дунаева, С. Е. Сохранение генетического разнообразия вегетативно размножаемых культур растений в контролируемых условиях среды в ВИРе / С. Е. Дунаева, О. Ю. Антонова, Г. И. Пендинен, Н. А. Швачко, Т. А. Гавриленко // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – Санкт-Петербург. – 2012. – Т. 169. – С. 245–256.
40. Дунаева, С. Е. Коллекции плодовых и ягодных культур *in vitro* (стратегия создания и хранение / С. Е. Дунаева, Т. А. Гавриленко // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2007. – Т. 161. – С. 10–19.
41. Дунаева, С. Е. *In vitro* коллекция малин и ежевик и идентификация образцов по изоферментным спектрам / С. Е. Дунаева, Н. В. Кудрякова, Л. Л. Малышев, Ю. В. Лупышева, Т. А. Гавриленко // Аграрная Россия. – 2005. – № 2. – С. 49–55.
42. Дунаева, С. Е. Сохранение вегетативно размножаемых культур в *in vitro* и криоколлекциях: методические указания / С. Е. Дунаева, Г. И. Пендинен, О. Ю. Антонова, Н. А. Швачко, Н. Н. Волкова, Т. А. Гавриленко // под. ред. Т. А. Гавриленко. – СПб. : ГНУ ВИР Россельхозакадемии, 2011. – 64 с.

43. Евдокименко, С. Н. Кустистая карликовость малины: проблемы и пути решения / С. Н. Евдокименко, М. Т. Упадышев, И. А. Якуб, К. В. Метлицкая // Плодоводство и ягодоводство России: Сб. науч. работ / ГНУ ВСТИСП Рос-сельхозакадемии. – М. – 2013. Т. XXXVI, Ч. 1. С. 167–174.
44. Иванова-Ханина, Л. В. Влияние генотипа и гормонального состава питательной среды на интенсивность роста микропобегов малины в культуре *in vitro* // Научный журнал КубГАУ. – 2015. – № 108 (04). – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2015/04/pdf/73.pdf>.
45. Иванова-Ханина, Л. В. Влияние гормонального состава питательной среды на интенсивность роста малины в культуре *in vitro* / Л. В. Иванова-Ханина // Вісник аграрної науки Причорномор'я. – 2013. – Вип. 3. – С. 128–135.
46. Казаков, И. В. Малина и ежевика / И. В. Казаков. – Москва : Фолио, 2001. – 252 с.
47. Киру, С. Д. Мобилизация, сохранение и изучение генетических ресурсов культивируемого и дикорастущего картофеля / С. Д. Киру, Е. В. Рогозина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – Т. 21 (1). – С. 7–15. DOI 10.18699/VJ17.219.
48. Клоконос, Н. П. Получение безвирусного посадочного материала ягодных культур / Н. П. Клоконос // Микроразмножение и оздоровление растений в промышленном плодоводстве и цветоводстве. – 1989. – С. 23–25.
49. Кондрашова, Ю. Ф. Разработка методики анализа вируса кустистой карликовости малины с помощью реакции амплификации по механизму катящегося кольца / Ю. Ф. Кондрашова : дис. ... канд. биол. наук. – Москва, 2016. – 204 с.
50. Костина, Л. И. Картофель Чили / Л. И. Костина – СПб, ВИР, 2016. – 72 с.
51. Лебенштейн, Г. Вирус скручивания листьев картофеля. В сб. Вирусные и вирусоподобные болезни и семеноводство картофеля / под ред. Г. Лебенштейна, Ф. Х. Бергера, А. А. Бранта, Р. Х. Лоусона (пер. Э. В. Трускинова). – 2005. – С. 14–19.
52. Леонова, Н. С. Применение бактериальной эндонуклеазы для оздоровления картофеля от вирусов / Н. С. Леонова, Н. И. Салганик // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 1991. – № 5. – С. 25–28.
53. Лутова, Л. А. Биотехнология высших растений / Л. А. Лутова. – СПб., 2003. – 228 с.
54. Лутова, Л. А. Генетика развития растений / Л. А. Лутова, Т. А. Ежова, И. Е. Додуева, М. А. Осипова // Учебник под редакцией академика РАН С. Г. Инге-Вечтомова. – СПб., 2011. – 432 с.
55. Макаров, С. С. Влияние регуляторов роста на органогенез растений при клональном микроразмножении княженики арктической (*Rubus arcticus* L.) [Электронный ресурс] / С. С. Макаров, И. Б. Кузнецова, В. С. Смирнов // Лесохоз. информ. : электрон. сетевой журн. – 2017. – № 2. – С. 103–108. URL:<http://lhi.vniilm.ru/> (13/07/2017).

56. Макарова, С. С. Устойчивость картофеля к вирусам: современное состояние и перспективы / С. С. Макарова, В. В. Макаров, М. Э. Тальянский, Н. О. Калинина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – Т. 21 (1). – С. 62–73. DOI 10.18699/VJ17.224.
57. Манжулин, А. В. Методы криоконсервации апексов для сохранения сортов картофеля / А. В. Манжулин, Р. Г. Бутенко // Исследования по клеточной селекции картофеля. – Научн. тр. – М., 1984. – С. 28–31.
58. Манжулин, А. В. Оценка растений-регенерантов, полученных из апексов картофеля после глубокого замораживания на сохранение генетической стабильности / А. В. Манжулин, И. М. Яшина, Е. А. Ладыгина // Сельскохозяйственная биология. – 1985. – №10. – С.53–56.
59. Медведев, С. С. Биология развития растений / С. С. Медведев, Е. И. Шарова // Учебник – Нижневартовск : Изд-во Нижневарт. гос. ун-та., 2014. – Т. 2. Рост и морфогенез. – 326 с.
60. Медведев, С. С. Физиология растений: учебник / С. С. Медведев. – СПб. : БХВ-Петербург, 2012. – 512 с.
61. Митрофанова, И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур / И. В. Митрофанова.: автореф. дис. ... докт. биол. наук. Ялта, 2007. – 40 с.
62. Молканова, О. И. Биотехнологические аспекты культивирования *in vitro* некоторых перспективных сортов ягодных культур / О.И. Молканова // В сборнике: Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира. Материалы Международной научной конференции, посвященной 85-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. В 2-х частях. – 2017а. – С. 272–274.
63. Молканова, О. И. Использование биотехнологических методов для размножения и сохранения редких видов растений / О.И. Молканова // Бюллетень Главного ботанического сада. – 2017б. – № 1 (203). – С. 42–48.
64. Морозова, З. Р. Применение бактериальных рибонуклеаз и эндонуклеазы семеноводстве картофеля / З. Р. Морозова // Биологические науки. – 1992. – Вып. 338. – № 2. – С. 128–134.
65. Мытницкая, Ю. Ф. Передача вируса кустистой карликовости малины при семенном и вегетативном размножении / Ю. Ф. Мытницкая, Е. В. Немцова, В. В. Заякин, И. Я. Нам, С. Н. Евдокименко // Вестник Брянского государственного университета. – Брянск. – 2012. – № 4 (2). – С. 189–192.
66. Нам, И. Я. Оптимизация применения регуляторов роста и развития растений в биотехнологиях *in vitro* / И. Я. Нам. : автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 2004. –42 с.

67. Нам, И. Я. Оптимизация метода клонального микроразмножения для ускоренной селекции межвидовых ремонтантных форм малины / Нам И. Я., В. В. Заякин, В. В. Вовк и др. // Сельскохозяйственная биология. – 1998. – №3. – С. 51–56.
68. Немцова, Е. В. Оптимизация диагностики вируса кустистой карликовости малины методом RT-PCR / Е. В. Немцова : дисс. ... канд. биол. наук. – Брянск, Российский государственный аграрный университет. 2009. – 163 с.
69. Немцова, Е. В. Скрининг вируса кустистой карликовости малины методом RT-PCR *in vitro* и в полевом материале / Е. В. Немцова, В. В. Заякин, И. В. Казаков, С. Н. Евдокименко, И. Я. Нам // Сельскохозяйственная биология. – 2007. – № 5. – С. 119–123.
70. Немцова, Е. В. Характеристика изолятов вируса кустистой карликовости малины, распространенных в Брянской области // Е. В. Немцова, Ю. Ф. Мытницкая, В. В. Заякин, И. Я. Нам // Вестник Брянского государственного университета. – 2015. – № 2. – С. 425–429.
71. Ненько, Н. И. Особенности водного режима сортов яблони различной ploидности в связи с адаптацией к засухе / Н. И. Ненько, Г. К. Киселева, А. В. Караваева, Е. В. Ульяновская // Плодоводство и виноградарство юга России. [Электронный ресурс]. – Краснодар : СКЗНИИСиВ, 2015. – № 31 (01). – С. 98–109. – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/15/01/11>.
72. Носов, А. М. Биотехнологические коллекции растений и криобанки – важная часть национального банка-депозитария живых систем / А. М. Носов, В. М. Юрин, Е. В. Спиридович, О.Н. Высоцкая, В. Н. Решетников // В сборнике: Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира. Материалы Международной научной конференции, посвященной 85-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. В 2-х частях. – 2017. – С. 284–290.
73. Анисимов, Б. В. Семеноводство картофеля: современные технологии, нормативное регулирование, проверка качества / Б. В. Анисимов, Е. А. Симаков, С. В. Жевора, Е. В. Овэс, С. Н. Зебрин, В. Н. Зейрук, А. В. Митюшкин, А. И. Усков, С. М. Юрлова, А. А. Журавлёв, О. С. Хутинаев, Е. Г. Блинков, С. И. Логинов, В. С. Чугунов. – Чебоксары, 2017. – 36 с.
74. Малько, А. М. Технологический процесс производства оригинального, элитного и репродукционного семенного картофеля / А. М. Малько, Ю. Н. Николаев, Д. Н. Говоров, В. С. Макарова, М. И. Мельникова, Б. В. Анисимов, Е. А. Симаков, С. В. Жевора, Е. В. Овэс, С. Н. Зебрин, В. Н. Зейрук, А. В. Митюшкин, А. И. Усков, С. М. Юрлова, А. А. Журавлев, В. С. Чугунов // Практическое руководство. – Москва, 2017. – 64 с.

75. Овэс, Е.В. Формирование и поддержание банка здоровых сортов картофеля в полевой культуре в чистых фитосанитарных условиях / Е. В. Овэс, Е. А. Симаков, Б. В. Анисимов, В. В. Бойко, Н. А. Гаитова, Н. А. Фенина // В сб.: Методы биотехнологии в селекции и семеноводстве картофеля. Материалы международной научно-практической конференции. Сборник научных трудов. Сер. "Картофелеводство" Всероссийский НИИ картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха. – 2014. – С. 117–128.
76. Овэс, Е. В. Банк здоровых семян картофеля (БЗСК) в полевой культуре и *in vitro* (каталог) / Е. В. Овэс, А. И. Усков, Н. А. Гаитова, В. В. Бойко, Н. А. Фенина, О. С. Колесова, И. В. Шмыгля. – М.: ФГБНУ ВНИИКХ, 2016. – 15 с.
77. Оразбаева, Г. К. Клональное размножение растений красной малины (*Rubus idaeus* L.) *in vitro* / Г. К. Оразбаева, И. Л. Майсупова, В. Т. Хасанов, В. К. Швидченко // Вестник науки КазАТУ им. С. Сейфуллина. – 2012. – № 1 (72). – С. 140–149.
78. Орлова, С. Ю. Биологические особенности и селекционная ценность сортов вишни в условиях Северо-Запада России / С. Ю. Орлова : дис. ... канд. биол. наук. – СПб., 2002. – 193 с.
79. Попов, А. С. Криосохранение растений и их клеток / А. С. Попов // Ветеринарная патология. – 2008. – № 2. – С. 158–160.
80. Попов, А. С. Некоторые механизмы криповреждений клеток растений *in vitro* и особенности из криосохранения / А. С. Попов // Физиология растений. – 1993. – Т. 40. – № 3. С. 485–496.
81. Приходько, Ю. Н. О видовом составе и распространенности вирусов малины в европейской части России / Ю. Н. Приходько // Плодоводство и ягодоводство России. – М., 1997. – Т. 4. – С. 96–102.
82. Рейфман, В. Г. Физиолого-биохимические свойства вирусов, поражающих картофель, и приемы оздоровления семенного материала на Дальнем Востоке / В. Г. Рейфман, Р. В. Гнутова, С. А. Романова // Сельскохозяйственная биология. – 1996. – № 3. – С. 93–106.
83. Роговая, В. В. Адвентивная регенерация вишни в культуре *in vitro* / В. В. Роговая, Л. Ю. Новикова, Т. А. Гавриленко // Известия Российского Государственного Педагогического Университета им. А.И. Герцена. – 2007. – С. 164–172.
84. Рогозина, Е. В. Сравнительное изучение способов оздоровления картофеля от вирусов в культуре ткани / Е. В. Рогозина. : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. – СПб., 1991. – 18 с.
85. Рогозина, Е. В. Широко распространенные и потенциально опасные для российского агропроизводства возбудители вирусных болезней картофеля / Е. В. Рогозина, Н. В. Мироненко, О. С. Афанасенко, Ю. Мацухито // Вестник защиты растений. – 2016. – № 4 (90). – С. 24–33.

86. Рябцева, Т.В. Оздоровление картофеля методом химиотерапии в культуре *in vitro* / Т. В. Рябцева, В. И. Куликова, О. Г. Илькевич // Международный научно-исследовательский журнал. – 2015. – № 10-3 (41). – С. 66–68.
87. Система гель-документации GelDoc (BioRad, USA).
88. Сковородников, Д. Н. Особенности клонального микроразмножения *in vitro* и ускорение селекции новых ремонтантных форм малины / Д. Н. Сковородников : автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Брянск, 2004. – 20 с.
89. Сковородников, Д. Н. Особенности клонального микроразмножения ежевики и малино-ежевичных гибридов / Д. Н. Сковородников, Н. В. Милехина, Ю. Н. Орлова // Вестник Брянского государственного университета. – 2015. – № 3. – С. 417–420.
90. Соболева, А. Г. Регенерация и трансформация ремонтантных форм малины / А. Г. Соболева : автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2004. – 19 с.
91. Соловых, Н. В. Размножение *in vitro* растений рода *Rubus* / Н. В. Соловых, С. А. Муратова // Сибирский вестник с.-х. науки. – 2011. – № 1. – С. 32–39.
92. Соловых, Н. В. Эффективность использования различных цитокининов для клонального размножения *in vitro* растений рода *Rubus* / Н. В. Соловых // Плодоводство и ягодоводство России. – 2013. – Т. 37. – № 1. – С. 316–321.
93. Сорокин, А. А. Совершенствование приемов семенного и вегетативного размножения жимолости синей / А. А. Сорокин. : дис. ... канд. с.-х. наук. – СПб., 2002. – 142 с.
94. Стандарты молекулярного веса «100 bp+1500» фирмы СибЭнзим (<http://russia.sibenzyme.com/>).
95. Стрыгина, О. В. Микроразмножение малины / О. В. Стрыгина // Микроразмножение и оздоровление растений в промышленном плодоводстве и цветоводстве. – 1989. – С. 32–37.
96. Таварткиладзе, О. К. 2007. Размножение ежевики в культуре *in vitro* / О. К. Таварткиладзе, Н. А. Вечернина // Известия Алтайского государственного университета. Биологические науки.: электронный журнал. – № 3 (55). – Режим доступа к журн.: <http://izvestia.asu.ru/2007/3/biol/TheNewsOfASU-2007-3-biol-06.pdf> (13/07/2017)
97. Технология получения оздоровленного от вирусов посадочного материала плодовых и ягодных культур. Москва, 2013.– 92 с.
98. Тихонова, К. О. Диагностика вирусного поражения малины с помощью ИФА и методы ее оздоровления / К. О. Тихонова, М. Т. Упадышев, В. И. Донецких, А. Д. Петрова // В сб.: Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии. – 2014. – С. 5–6.
99. Тихонова, К. О. Закономерности оздоровления малины от вредоносных вирусов с применением современных биотехнологических и вирусологических методов / К. О. Тихонова, М. Т. Упадышев, К. В. Метлицкая, В. И. Донецких // Мат-лы Международной

- научно-практической конференции «Методы и технологии в селекции растений и растениеводстве» – Киров. – НИИСХ Северо-Востока. – 2015. – С. 468–471.
100. Трускинов, Э. В. Оздоровление картофеля от вирусных болезней методом культуры меристемных тканей / Э. В. Трускинов // Сельскохозяйственная биология. – 1976. – Т. 11. – № 2. – С. 250–255.
101. Трускинов, Э. В. Оздоровление клоновой коллекции картофеля в культуре ткани / Э. В. Трускинов, Е. В. Рогозина // Физиология растений. – 1997. – Т. 43. – С. 432–439.
102. Трускинов, Э. В. Поддержание и хранение коллекционных образцов картофеля в условиях *in vitro* // Методические указания, Л.: ВИР, 1987. – 39 с.
103. Трускинов, Э. В. Стратегия и тактика борьбы с вирусными болезнями растений на примере картофеля / Э. В. Трускинов // Живые и биокосные системы. – 2014. – № 9. – С. 4
104. Уланович, К. А. Влияние генотипа на размножение элитных форм малины *in vitro* / К. А. Уланович, Д. Н. Сквородников // В сб.: Развитие научной, творческой и инновационной деятельности молодежи. Материалы V Всероссийской научно-практической заочной конференции молодых ученых. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации; ФГБОУ ВПО «Курганская государственная сельскохозяйственная академия имени Т. С. Мальцева». Курган – 2014. – С. 97–98.
105. Упадышев, М. Т. Вирусные болезни и современные методы оздоровления плодовых и ягодных культур / М. Т. Упадышев : автореф. дис. ... док. с.-х. наук. – Москва, 2011. – 46 с.
106. Упадышев, М. Т. Диагностика вирусных болезней малины / М. Т. Упадышев, К. В. Метлицкая, К. О. Тихонова // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2014. – Вып. 15. – С. 326–329.
107. Упадышев, М. Т. Закономерности распространения вредоносных вирусов в агроценозах малины и земляники садовой / М. Т. Упадышев, К. В. Метлицкая, А. Д. Петрова, К. О. Тихонова // Плодоводство и ягодоводство России. – 2015. – Т. 41. – С. 366–370.
108. Упадышев, М. Т. Клональное микроразмножение и особенности регенерации растений ежевики и малины черной *in vitro* / М. Т. Упадышев : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. – М., 1991. – 21 с.
109. Упадышев, М. Т. Новый способ оздоровления ягодных и плодовых культур от вирусов методом магнитотерапии / М. Т. Упадышев, В. И. Донецких // Доклады РАСХН. – 2008. – № 4. – С. 12–15.
110. Упадышев, М. Т. Размножение ежевики и малины черной методом культуры тканей / М. Т. Упадышев, В. А. Высоцкий // Садоводство и виноградарство. – 1991. – № 6. – С. 24–27.
111. Упадышев, М. Т. Распространенность вирусных болезней плодовых и ягодных культур и

- современные методы борьбы с ними / М. Т. Упадышев, К. В. Метлицкая, К. О. Тихонова, В. И. Донецких, Г. Ю. Упадышева, И. А. Бьядовский, А. Д. Петрова // Живые и биокосные системы. – 2014в. – № 9. – URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-9/article-22>.
112. Упадышев, М. Т. О распространенности вирусных болезней малины в Центральном регионе России / М. Т. Упадышев, К. В. Метлицкая, К. О. Тихонова, С. Н. Евдокименко // Плодоводство и ягодоводство России: Сб. науч. Работ. – ГНУ ВСТИСП Россельхозакадемии. М. – 2014а. – Т. XXXVIII. – Ч. 2. – С. 184–190.
113. Усков, А. И. Разработка методов лабораторного контроля для рутинного и экспресс-тестирования семенного картофеля / А. И. Усков, Ю. А. Варицев, Г. П. Варицева, Д. В. Кравченко, П. А. Галушка, Е. В. Овэс, Б. В. Анисимов, Ю. Ф. Дрыгин, А. Н. Блинцов, А. П. Осипов, В. Г. Григоренко, И. П. Андреева, И. Г. Атабеков // В сб.: Методы биотехнологии в селекции и семеноводстве картофеля. Материалы международной научно-практической конференции. Сборник научных трудов. Сер. "Картофелеводство" 2014. С. 169-174.
114. Ухатова Ю.В. Кримоконсервация селекционных сортов картофеля в ВИРе / Ю.В. Ухатова, Е.В. Овэс, Н.Н. Волкова, Т.А. Гавриленко // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – Санкт-Петербург. – 2017. – Т.178. – С. 13–20.
115. Ухатова, Ю. В. Кримоконсервация образцов культурных видов картофеля из коллекции ВИР / Ю. В. Ухатова, Н. А. Швачко, Т. А. Гавриленко // Картофелеводство: Материалы международной научно-практической конференции «Развитие новых технологий селекции и создание отечественного конкурентоспособного семенного фонда картофеля», 2016 г. – ФГБНУ ВНИИКХ; под ред. С. В. Жеворы. – М., 2016. – С. 22–27.
116. Швачко, Н. А. Изучение генетического разнообразия сортов картофеля отечественной селекции на основе SSR-анализа и совершенствование методов *ex situ* сохранения сортового генофонда в контролируемых условиях / Н. А. Швачко. : автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб. : ВИР, 2012. – 25 с.
117. Юзепчук, С. В. К вопросу о происхождении картофеля / С. В. Юзепчук, С. М. Букасов // Труды Всесоюзного съезда по генетике, селекции, семеноводству и племенному животноводству. – 1929. – Т. 3. – С. 593–611.
118. Юшев, А. А. Коллекция генетических ресурсов плодовых и ягодных растений: сохранение, пополнение, изучение: методические указания / А. А. Юшев, А. А. Сорокин, О. А. Тихонова, С. Ю. Орлова, Е. Н. Кислин, О. Е. Радченко, Н. А. Пупкова, А. В. Шлявас // под ред. А. А. Юшева, И. Г. Чухиной. – СПб. : Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова, 2016. – 90 с.

119. Якуб, И. А. Оценка ремонтантных сортов малины по устойчивости к антракнозу и комплексу вирусов RBDV И TBRV / И. А. Якуб, С. Н. Евдокименко // Материалы X-ой Международной научной конференции «Агроэкологические аспекты устойчивого развития АПК». – Брянск : Изд.-во Брянской ГСХА, 2013. – С. 202–205.
120. Abbas, A. Use of hot water-thermotherapy to free potato tubers of potato leaf roll virus (PLRV) / A. Abbas, M. Arif1, A Ali // Int. J. Life. Sci. Scienti. Res. – 2016. – Vol. 2. – Is. 2. – Pp. 155–162.
121. Accatino, J. A. Virus desconocido en dos variedades de papa (*Solanum tuberosum*) autoctonas de Chile / J. A. Accatino // Agric. Tee. – 1966. – Vol. 26. – Pp. 85–86.
122. Anderson W. C. Tissue culture propagation of red and black raspberries / W. C. Anderson // Acta Hort. – 1979. – Vol. 112. – Pp. 13–20.
123. Anonymous. Annual Report of the ICAR-National Bureau of Plant Genetic Resources 2014-2015 / ICAR-NBPGR, Pusa Campus, New Delhi, India, 210+x p.
124. Arakawa, T. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis / T. Arakawa, J. F. Carpenter, Y. A. Kita, J. H. Crowe // Cryobiology. – 1990. – Vol. 27. – Pp. 405–415.
125. Awan, A. R. *In Vitro* Elimination of Potato Leaf Roll Polerovirus from Potato Varieties / A. R. Awan, S. M. Mughal, Y. Iftikhar // European Journal of Scientific Research. – 2007. – Vol. 18. – No. 1. – Pp. 155–164.
126. Bădărău, C. L. Effect of some therapies on potato plantlets infected with potato virus X (PVX) / C. L. Bădărău, N. Chiru // Journal of EcoAgriTourism. – 2014. – Vol. 10. – Pp. 11–17.
127. Bamberg, J. B. *In vitro* technology at the US Potato Genebank / J. B. Bamberg, M. W. Martin, J. Abad, M. M. Jenderek, J. Tanner, D. J. Donnelly, M. K. Nassar, R. E. Veilleux, R. G. Novy // In Vitro Cell.Dev.Biol. – Plant. – 2016. – DOI 10.1007/s11627-016-9753-x.
128. Barandalla, L. Conservation of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars by cryopreservation / L. Barandalla, I. Sánchez, E. Ritter, J. I. Ruiz de Galarreta // Span J Agric Res. – 2003. – Vol. 1. – Pp. 9–13.
129. Barbara, D. J. Occurrence and distribution of Raspberry bushy dwarf virus in commercial *Rubus* plantations in England and Wales / D. J. Barbara, A. Morton, S. Ramcharan, I. W. Cole, A. Phillips, V. H. Knight // Plant Pathol. – 2001. – Vol. 50. – Pp. 747–754.
130. Benson, E. E. Cryoconserving algal and plant diversity: historical perspectives and future challenges // In: Fuller B, Lane N, Benson EE (eds.) Life in the frozen state. – 2004. – CRC Press, London. – Pp. 299–328.
131. Benson, E. E. Cryopreservation theory // In: Reed BM (ed.) Plant cryopreservation: a practical guide. – 2008. – Springer, New York. – Pp. 15–32.

132. Benson, E. E. Developmental competence and ploidy stability in plants regenerated from cryopreserved potato shoot-tips / E. E. Benson, M. Wilkinson, A. Todd, U. Ekuere, J. Lyon // *CryoLetters*. – 1996. – Vol. 17. – Pp. 119–128.
133. Bouafia, S. Cryopreservation of potato shoot tips by encapsulation-dehydration / S. Bouafia, N. Jelti, G. Lairy, A. Blanc, E. Bonnel, J. Dereuddre // *Potato Research*. – 1996. – Vol. 39. – Pp. 69–78.
134. Boxus P. Rapid production of virus free strawberry by *in vitro* culture / P. Boxus // *Acta Hort*. – 1976 – Vol. 66. – Pp. 35–38.
135. Brison, M. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. Prunus rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus / M. Brison, M. T. Boucaud, A. Pierronnet, F. Dosba // *Plant Sci*. – 1997. – Vol. 123. – Pp. 189–196.
136. Brunt, A. A. Tobamo- and Tobamo-like Viruses / A. A. Brunt // In: *Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed Potatoes*. G. Loenbenstein, P. H. Berger, A. A. Brunt, R. H. Lawson eds. – Kluwer Academic Publishers. – The Netherlands. – 2001. – Pp. 121–134.
137. Carli, C. Aphids infesting potato crop in the highlands of Uzbekistan / C. Carli, B. Baltaev // *Potato Journal*. – 2008. – Vol. 35. – Pp. 134–140.
138. Cassells, A. C. The elimination of potato viruses X, Y, S and M in meristem and explant cultures of potato in the presence of Virazole / A. C. Cassells, R. D. Long // *Potato Res*. – 1982. – Vol. 25. – Pp. 165–173.
139. Chamberlain, C. J. First report of Raspberry bushy dwarf virus in *Rubus multibracteatus* from China / C. J. Chamberlain, J. Kraus, P. D. Kohnen, C. E. Finn, R. R. Martin // *Plant Disease*. – 2003. – Vol. 87. – P. 603.
140. Chang, Y. Extended cold acclimation and recovery medium alteration improve regrowth of *Rubus* shoot tips following cryopreservation / Y. Chang, B.-M. Reed // *CryoLetters*. – 1999. – Vol. 20. –Pp. 371–376.
141. Condello, E. Cryopreservation of *in vitro* axillary buds of apple following the droplet-vitrification method / E. Condello, E. Caboni, E. André, B. Piette, P. Druart, R. Swennen, B. Panis // *CryoLetters*. – 2011a. – Vol. 32. – Is. 2. – Pp. 175–185.
142. Condello, E. Raspberry cryopreservation by droplet vitrification technique / E. Condello, D. Ruzić, B. Panis, E. Caboni // *Acta Hort*. 2011b. – Vol. 918. –Pp. 965–969. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.918.127
143. Coste, A. *In vitro* propagation and cryopreservation of Romanian endemic and rare *Hypericum* species / A. Coste, A. Halmagyi, A. L. Butiuc-Keul, C. Deliu, G. Coldea, B. Hurdu // *Plant Cell Tiss Organ Cult*. – 2012. – Vol. 110. – Pp. 213–226.

144. Cruz-Cruz, C. A. Biotechnology and conservation of plant biodiversity / C. A. Cruz-Cruz, M. T. Gonzalez-Arnao, F. Engelmann // Resources. – 2013. – Vol. 2. – Pp. 73–95.
145. Danci, O. Influence of ribavirin on potato plants regeneration and virus eradication / O. Danci, L. Erdei, L. Vidacs, M. Danci, A. Baci, I. David, F. Berbentea // J. of Horticulture, Forestry and Biotechnology. – 2009. – Vol. 13. – Pp. 421–425.
146. Daubeny, H. Effects of raspberry bushy dwarf virus on yield and cane growth in susceptible red raspberry cultivars / H. Daubeny, J. Freeman, R. Stace-Smith // Hort Science. – 1982. – Vol. 17. – Pp. 645–647.
147. De Bokx, J. A. Potato virus Y / J. A. De Bokx, H. Hutinga // AAB Descriptions of Plant Viruses. – 1981. – No. 242.
148. Debergh, P. C. Micropropagation / P. C. Debergh, P. E. Read // Micropropagation - technology and application. P. C. Debergh and R. H. Zimmerman (eds.). – 1991. – Pp. 1–13.
149. Debnath, S. C. Clonal propagation of dwarf raspberry (*Rubus pubescens* Raf.) through *in vitro* axillary shoot proliferation / S. C. Debnath // Plant Growth Reg. – 2004. – Vol. 43. – Pp. 179–186.
150. Dereuddre, J. Resistance of alginate-coated axillary shoot tips of pear tree (*Pyrus communis* L. cv. Beurré Hardy) *in vitro* plantlets to dehydration and subsequent freezing in liquid nitrogen: effects of previous cold hardening / J. Dereuddre, C. Scottez, Y. Arnaud, M. Duron // Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. – 1990. – Vol. 310. – Série III. – Pp. 317–323.
151. Dewi, I. S. Therapy cycling to eliminate high-titered, multiple virus infection *in vitro* potato plantlets / I. S. Dewi, S. A. Slack // Bul. Agron. – 1994. – Vol. 22. – No. 2. – Pp. 35–43.
152. Dhital, S. P. Utilization of shoot cuttings for elimination of PLRV and PVY by thermotherapy and chemotherapy from potato (*Solanum tuberosum* L.) // S. P. Dhital, B. M. Sakha, H. T. Lim // Nepal Journal of Science and Technology. – 2007. – Vol. 7. – Pp. 1–6.
153. DiFonzo, C. D. Integrated Management of PLRV and PVY in Seed Potato, with Emphasis on the Red River Valley of Minnesota and North Dakota / C. D. DiFonzo, D. W. Ragsdale, E. B. Radcliffe // In: IPM World Textbook (E.B. Radcliffe Ed). – University of Minnesota. – USA. – 1996.
154. Dussert, S. Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections / S. Dussert, F. Engelmann, M. Noirot // CryoLetters. – 2003. – Vol. 24. – Pp. 149–160.
155. Engelmann, F. Cryopreservation of clonal crops: a review of key parameters / F. Engelmann // Acta Horticult. – 2014. – Vol. 1039. – Pp. 31–39.
156. Evans, A. Aphids and aphid-borne virus disease in potatoes (Technical note T492) / A. Evans // The Scottish Agricultural College. – 2000.

157. Fabre, J. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoots tips / J. Fabre, J. Dereuddre // *CryoLetters*. – 1990. – Vol. 11. – Pp. 413–426.
158. Faccioli, G. Control of potato viruses using meristem and stem-cutting cultures, thermotherapy and chemotherapy / G. Faccioli // In: *Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed Potatoes*. G. Loenbenstein, P. H. Berger, A. A. Brunt, R. H. Lawson eds. – Kluwer Academic Publishers. – The Netherlands. – 2001. – Pp.365–390. DOI: 10.1007/978-94-007-0842-6_28
159. Faccioli, G. Eradication of Potato virus Y and Potato leafroll virus by chemotherapy of infected potato stem cuttings / G. Faccioli, M.C. Colalongo // *Phytopathol Mediterr*. – 2002. – Vol. 41. – Pp.76–78.
160. Faltus, M. Establishment of cryobank of potato and hop apices in the Czech Republic / M. Faltus, A. Bilavčík, J. Zámečník, P. Svoboda, J. Domkarova // *AgriFood Res Working Pap*. – 2008. – Vol. 153. – Pp. 65–66.
161. FAO. Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rev. ed. Rome. – 2014. –182 pp.
162. Feng, C. Production of pathogen-free horticultural crops by cryotherapy of *in vitro*-grown shoot tips / C. Feng, R. Wang, J. Li, B. Wang, Z. Yin, Z. Cui, B. Li, W. Bi, Z. Zhang, M. Li, Q.C. Wang // In: Lombardi M., Ozudogru E. A., Jain S. M. (eds.) *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants, Methods in Molecular Biology*. – 2013. – Springer, New York. – Vol. 994. – Pp. 463–482.
163. Folgado, R. Differential protein expression in response to abiotic stress in two potato species: *Solanum commersonii* Dun and *Solanum tuberosum* L. / R. Folgado, B. Panis, K. Sergeant, J. Renault, R. Swennen, J. F. Hausman // *Int. J. Mol. Sci.*– 2013. – Vol. 14. – Pp. 4912–4933.
164. Folgado, R. Changes in sugar content and proteome of potato in response to cold and dehydration stress and their implications for cryopreservation / R. Folgado, K. Sergeant, J. Renault, R. Swennen, J. F. Hausman, B. Panis // *J. Proteomics*. – 2014. – Vol. 98. – Pp. 99–111.
165. Folgado, R. Unravelling the effect of sucrose and cold pretreatment on cryopreservation of potato through sugar analysis and proteomics / R. Folgado, B. Panis, K. Sergeant, J. Renault, R. Swennen, J. F. Hausman // *Cryobiology*. – 2015. – Vol. 71. – Pp. 432–441. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2015.09.006.
166. Forsline, P. L. Development of base and active collections of *Malus* germplasm with cryopreserved dormant buds / P. L. Forsline, J. R. McFerson, W. F. Lamboy, L. E. Towill // *Acta Hort*. 1999. – Vol. 484. – Pp. 75–78.
167. Gallard, A. Cryopreservation of *Pelargonium* apices by droplet-vitrification / A. Gallard, B. Panis, N. Dorion, R. Swennen, A. Grapin // *Cryo Lett*. – 2008. – Vol. 29. – Pp. 243–251.

168. Gallard, A. Limited elimination of two viruses by cryotherapy of *Pelargonium* apices related to virus distribution / A. Gallard, R. Mallet, M. Chevalier, A. Grapin // *CryoLetters*. – 2011. – Vol. 32. – Is. 2. – Pp. 111–122.
169. Ganeshan, S. Cryopreservation of pollen / S. Ganeshan, P. E. Rajasekharan, S. Shashikumar, W. Decruze // In: Reed BM (ed.) *Plant cryopreservation: a practical guide*. – 2008. – Springer, New York. – Pp. 443–464.
170. Gavrilenko, T. A microsatellite and morphological assessment of the Russian National Potato Collection / T. Gavrilenko, O. Antonova, A. Ovchinnikova, L. Novikova, E. Krylova, N. Mironenko, G. Pendinen, A. Islamshina, N. Shvachko, S. Kiru, L. Kostina, O. Afanasenko, D. Spooner // *Genetic Resources and Crop Evolution*. – 2010. – Vol. 57. – No. 8. – Pp. 1151–1164.
171. Gavrilenko, T. Genetic diversity and origin of cultivated potatoes based on plastid microsatellite polymorphism / T. Gavrilenko, O. Antonova, A. Shuvalova, E. Krylova, N. Alpatyeva, D. Spooner, L. Novikova // *Genetic Resources and Crop Evolution*. – 2013. – Vol. 60. – Pp. 1997–2015.
172. Genebank Standards. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. International Plant Genetic Resources Institute. – Rome. – 1994.
173. Golmirzaie, A. M. Advances in potato cryopreservation at CIP / A. M. Golmirzaie, A. Panta // In: Engelmann F, Takagi H (eds.) *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. – 2000. – Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba. – Pp. 250–254.
174. Gonzalez-Arno, M. T. Advances in Cryogenic Techniques for the Long-Term Preservation of Plant Biodiversity / M. T. Gonzalez-Arno, M. E. Martinez-Montero, C. A. Cruz-Cruz, F. Engelmann // Chapter 8 in: © Springer International Publishing Switzerland Ahuja M. R., Ramawat K. G. (eds.), *Biotechnology and Biodiversity, Sustainable Development and Biodiversity*. – 2014. – Vol. 4. – Pp. 129–170. DOI 10.1007/978-3-319-09381-9_8.
175. Gonzalez-Arno, M. T. Development and large-scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops // M. T. Gonzalez-Arno, A. Panta, W. M. Roca, R. H. Escobar, F. Engelmann // *Plant Cell Tissue Organ Cult*. – 2008. – Vol. 92. – Pp. 1–13.
176. Graham, J. Genotype-specific regeneration from a number of *Rubus* cultivars / J. Graham, L. Lasi, S. Millan // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 1997. – Vol. 48. – Pp. 167–173.
177. Griffiths, H. M. Effect of chemical and heat therapy on virus concentration in *in vitro* plantlets / H. M. Griffiths, S. A. Slack, J. H. Dodds // *Can. J. Bot*. – 1990. – Vol. 68. – Pp. 1515–1521. DOI: 10.1139/b90-193

178. Gul, Z. Incidence of potato viruses in different districts of Khyber pakhtunkhawa / Z. Gul, A. A. Khan, A. U. R. Khan, Z. Khan // Pakistan. J. plant pathol. – 2013. – Vol. 2. – Pp. 32–36.
179. Gupta, S. Cryopreservation of shoot tips of blackberry and raspberry by encapsulation-dehydration and vitrification / S. Gupta, B. M. Reed // CryoLetters. – 2006. – Vol. 27. – Pp. 29–42.
180. Halmagyi A. Plant regeneration from *Rosa* shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method / A. Halmagyi, I. Pinker // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2006. – Vol. 84. – Is. 2. – Pp. 100129–100137.
181. Halmagyi, A. Plant regrowth from potato shoot tips cryopreserved by a combined vitrification-droplet method / A. Halmagyi, C. Deliu, A. Coste // CryoLetters. – 2005. – Vol. 26. – Pp. 313–322.
182. Harvengt, L. Establishment of a cryopreserved gene bank of European elms / L. Harvengt, A. Meier-Dinkel, E. Dumas, E. Collin // Can. J. For. Res. – 2004. – Vol. 34. – Pp. 43–55. DOI: 10.1139/X03-193.
183. Hawkes, J. G. The potato. Evolution, biodiversity, genetic resources / J. G. Hawkes // Belhaven Press. – London. – 1990. – 259 pp.
184. Heldak, J. Detection of potato virus S by RT-PCR in potato regenerants derived from *in vitro* heat-treated shoot tips / J. Heldak // Acta fytotechnica et zootechnica. – 2001. – 4. – Pp. 275–277.
185. Helliot, B. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.) / B. Helliot, B. Panis, Y. Poumay, R. Swenen, P. Lepoivre, E. Frison // Plant Cell Rep. – 2002. – Vol. 20. – Pp. 1117–1122.
186. Hirai, D. Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation vitrification / D. Hirai, A. Sakai // Potato Research. – 1999. – Vol. 42. – Pp. 153–160.
187. Hirai, D. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification / D. Hirai, A. Sakai // In: Engelmann F, Takagi H (eds.) Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. – 2000. – Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba
188. Hirai, D. Gelled droplet vitrification improves recovery of cryopreserved potato germplasm / D. Hirai // CryoLetters. – 2011. – Vol. 32. – Pp. 287–296.
189. Höfer, M. Cryopreservation of winter-dormant apple buds: establishment of a duplicate collection of *Malus* germplasm / M. Höfer // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2015. DOI 10.1007/s11240-015-0735-1.
190. IPGRI. Cryopreservation of tropical plant germplasm / Current research progress and applications // Engelmann F., Takagi H. (eds.). – 2000. – 496 pp.

191. Isac, V. The occurrence of Raspberry bushy dwarf virus in raspberry field trials in Romania / V. Isac, M. Isac, P. Mladin // *Acta Hort.* – 2008. – Vol. 780. – Pp. 49–53.
192. Isogai, M. First report of raspberry yellows disease caused by raspberry bushy dwarf virus in Japan / M. Isogai, M. Yoshida, H. Imanishi, N. Yoshikawa // *J.Gen.PlantPathol.* – 2012. – Vol. 78. – Pp. 360–363.
193. Jeffries, C. J. Potato / C. J. Jeffries // *FAO/IPGRI technical guidelines for the safe movement of germplasm.* – 1998. – No. 19. – FAO and IPGRI. – Rome.
194. Jenderek, M. M. Shoot tip cryopreservation of *Solanum tuberosum* germplasm / M. M. Jenderek, B. D. Ambruzs, C. G. Andre, J. Laufman, D. D. Ellis // *Meeting Abstract. American Society of Horticultural Science.* – 2010. – Palm Desert, California, August 2-5 2010. – P.78.
195. Jenderek, M. M. Cryopreserved storage of clonal germplasm in the USDA National Plant Germplasm System / M. M. Jenderek, B.-M. Reed // *In Vitro Cell.Dev.Biol. – Plant.* – 2017. DOI 10.1007/s11627-017-9828-3
196. Jeremović, D. Raspberry bushy dwarf virus – a grapevine pathogen in Serbia / D. Jeremović, S. Paunović // *Pestic. Phytomed. (Beograd).* – 2011. – Vol. 26. – Is. 1. – Pp. 55–60.
197. Jianming, B. Can cryopreservation eliminate the Potato virus X (PVX) and Potato spindle tuber viroid (PSTVd)? / B. Jianming, C. Xiaoling, L. Xinxiong, G. Huachun, X. Xia, Z. Zhie // *Bioscience Methods.* – 2012. – Vol. 3. – Is. 5. – Pp. 34–40. DOI: 10.5376/bm.2012.03.0005.
198. Jones, A. T. Comparisons of some properties of two laboratory variants of Raspberry bushy dwarf virus (RBDV) with those of three previously characterized RBDV isolates / A. T. Jones, W. J. McGavin, M. A. Mayo, J. E. Angel-Diaz, S. O. Karenlampi, H. Kokko // *European Journal of Plant Pathology.* – 2000. – Vol. 106. – No. 7. – Pp. 623–632.
199. Jones, A. T. Important virus diseases of cane fruit crops and their control. *Integrated Plant Protection in Orchards – Soft Fruits IOBC* / A.T. Jones // *wprs Bull.* – 2003. – Vol. 26. – No. 2. – Pp. 169–175.
200. Jones, R. Virus disease problems facing potato industries worldwide: viruses found, climate change implications rationalizing virus strain nomenclature and addressing the potato virus Y issue / R. Jones // *In: The Potato, botany, production and uses.* Navarre R., Pavec M. (Eds). – 2014. – Washington State University. – Pp. 202–225.
201. Kaczmarczyk, A. Current issues in plant cryopreservation / A. Kaczmarczyk, B. Funnekotter, A. Menon, P. Y. Phang, A. Al-Hanbali, E. Bunn, R. L. Mancera // *In: Katkov II (ed.) Current frontiers in cryobiology.* – InTech, Rijeka. – 2012. – Pp. 417–438. DOI: 10.5772/32860. ISBN 978-953-51-0191-8.

202. Kaczmarczyk, A. Influence of alternating temperature preculture on cryopreservation results for potato shoot tips / A. Kaczmarczyk, N. Shvachko, Y. Lupysheva, M.-R. Hajirezaei, E. R. J. Keller // *Plant Cell Rep.* – 2008. – Vol. 27. – Pp. 1551–1558.
203. Kaczmarczyk, A. Physiological, biochemical, histological and ultrastructural aspects of cryopreservation in meristematic tissue of potato shoot tips / A. Kaczmarczyk // *Dissertation.* – 2008. – 100 pp.
204. Kaczmarczyk, A. Potato Shoot Tip Cryopreservation. A Review / A. Kaczmarczyk, V.-M. Rokka, E. R. J. Keller // *Potato Research.* – 2011. – Pp. 45–79.
205. Kassanis, B. Potato tuber freed from Leaf roll virus by heat / B.Kassanis // *Nature.* – 1949. – Vol. 164. – Pp. 881.
206. Keller, E. R. J. Cryopreservation and *In Vitro* Culture – State of the Art as Conservation Strategy for Genebanks / E. R. J. Keller, A. Senula, Ch. Zanke, M. Grübe, A. Kaczmarczyk // *Acta Hort.* – 2011. – Vol. 918. – Pp. 99–111.
207. Keller, E. R. J. Cryopreservation of herbaceous dicots / E. R. J. Keller, A. Senula, A. Kaczmarczyk // In: Reed BM (ed.) *Plant cryopreservation: a practical guide.* – Springer, New York. – 2008. – Pp. 281–332.
208. Keller, E. R. J. Experience in large-scale cryopreservation and links to applied research for safe storage of plant germplasm / E. R. J. Keller, M. Grübe, M.-R. Hajirezaei, M. Melzer, H.-P. Mock, H. Rolletschek, A. Senula, K. Subbarayan // *Acta Hort.* – 2016. – Vol. 1113. – Pp. 239-250. DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1113.36.
209. Khiutti, A. Characterization of resistance to *Synchytrium endobioticum* in cultivated potato accessions from the collection of Vavilov Institute of Plant Industry (VIR) collection // A. Khiutti, O. Afanasenko, O. Antonova, O. Shuvalov, L. Novikova, E. Krylova, N. Chalaya, N. Mironenko, D. M. Spooner, T. Gavrilenko // *Plant Breeding.* – 2012. – Vol. 131. – Pp. 744–750.
210. Kim, H. H. Cryobanking of Korean *Allium* germplasm collections: results from a 10 year experience / H. H. Kim, E. Popova, D. J. Shin, J. Y. Yi, C. H. Kim, J. S. Lee, M. K. Yoon, F. Engelmann // *CryoLetters.* – 2012a. – Vol. 33. – Pp. 45–57.
211. Kim, H. H. Cryopreservation of garlic germplasm collections using the droplet-vitrification technique / H. H. Kim, J. K. Lee, H. S. Hwang, F. Engelmann // *CryoLetters.* – 2007. – Vol. 28. – Pp. 471–482.
212. Kim, H. H. Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species: critical factors in droplet vitrification / H. H. Kim, J. W. Yoon, Y. E. Park, E. G. Cho, J. K. Sohn, T. S. Kim, F. Engelmann // *CryoLetters.* – 2006. – Vol. 27. – Pp. 223–234.

213. Kim, H. H. Development of a droplet-vitrification protocol for cryopreservation of *Rubia akane* (Nakai) hairy roots using a systematic approach / H. H. Kim, E. Popova, D. J. Shin, et al. // *CryoLetters*. – 2012б. – Vol. 33. Pp. 506–517
214. Kim, H. H. Development of alternative loading solutions in droplet-vitrification procedures / H. H. Kim, Y. G. Lee, S. U. Park, S. C. Lee, H. J. Baek, J. G. Gwag, E. G. Cho, F. Engelmann // *CryoLetters*. – 2009a. – Vol. 30. – Pp. 291–299.
215. Klein, R. E. Eradication of potato viruses X and S from potato shoot-tip cultures with ribavirin / R. E. Klein, C. H. Livingston // *Phytopathology*. – 1983. – Vol. 73. – Is. 7. – Pp. 1049–1050. DOI: 10.1094/Phyto-73-1049.
216. Kovalchuk, I. Cryopreservation of raspberry cultivars: testing techniques for long-term storage of Kazakhstan's plant germplasm / I. Kovalchuk, T. Turdiev, S. Kushnarenko, I. Rakhimbaev, B. M. Reed // In: Turuspekov Y (ed.) *Kazakhstan Plant Science and Biotechnology*. – The Asian and Australasian J of Plant Sci and Biotech. – 2010. – Vol. 4 (Special Issue 1). – Pp. 1–4.
217. Kovalchuk, I. Y. Cryopreservation and cold storage of fruit, berry crops and grape germplasm in Kazakhstan / I. Y. Kovalchuk, T. T. Turdiev, G. K. Usanova, G. A. Madiyeva, N. I. Chukanova, Reed B. M. // In: *Proceedings Plant biology and biotechnology international conference*. – 2014. – May 28-30. – Almaty, Kazakhstan. – P. 43.
218. Lambardi, M. Advances in the cryopreservation of fruit plant germplasm at the CNRIVALSA Institute of Florence / M. Lambardi, C. Benelli, D. De Carlo, A. Previati // *Acta Hort*. – 2009. – Vol. 839. – Pp. 237–244.
219. Lamoureux, D. Investigation of genetic diversity in Russian collections of raspberry and blue honeysuckle / D. Lamoureux, A. Sorokin, I. Lefèvre, S. Alexanian // *Plant Genet Resour*. – 2011. – Vol. 9. – Is. 2. – Pp. 202–205.
220. Le Bras, C. Cryopreservation of ex-vitro grown *Rosa chinensis* 'Old Blush' buds using droplet-vitrification and encapsulation-dehydration / C. Le Bras, P. H. Le Besnerais, L. Hamama, A. Grapin // *Plant Cell Tiss Organ Cult*. – 2014. – Vol. 116. – P. 235–242. DOI 10.1007/s11240-013-0400-5.
221. Lee, Y. G. Improved cryopreservation of Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) using droplet-vitrification / Y. G. Lee, E. Popova, H. Y. Cui, H. H. Kim, S. U. Park, C. H. Bae, S. C. Lee, F. Engelmann // *CryoLetters*. – 2011. – Vol. 32. – Is. 6. – Pp. 487–497.
222. Lefèvre, I. Evaluation and comparison of nutritional quality and bioactive compounds of berry fruits from *Lonicera caerulea*, *Ribes* L. species and *Rubus idaeus* grown in Russia / I. Lefèvre, J. Ziebel, C. Guignard, A. Sorokin, O. Tikhonova, N. Dolganova, L. Hoffmann, P. Eyzaguirre, J. F. Hausman // *Journal Berry Res*. – 2011. – Vol. 1. – Pp. 159–167.

223. Limantseva, L. Characterization of resistance to *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1 in cultivated and wild potato species accessions / L. Limantseva, N. Mironenko, O. Shuvalov, O. Antonova, A. Khiutti, L. Novikova, O. Afanasenko, D. Spooner, T. Gavrilenko // *Plant Breeding (Wiley)*. – 2014. – Vol. 133. – Is. 5. – Pp. 660–665.
224. Lizarraga, R. Tissue culture for elimination of pathogens / R. Lizarraga, A. Panta, U. Jayasinghe, J. Dodds // *CIP Research Guide 3. – International Potato Center (CIP)*. – Lima, Peru. – 1991. – 21 pp.
225. Loebenstein, G. Potato leaf roll virus (PLRV; Genus Polerovirus; Family Luteoviridae) / G. Loebenstein // In: *Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed Potatoes*. G. Loebenstein, P. H. Berger, A. A. Brunt, R. H. Lawson (eds.) – Kluwer Academic Publishers. – The Netherlands. – 2001. – Pp. 69–75.
226. Lopez-Delgado, H. Salicylic acid enhances heat tolerance and potato virus X (PVX) elimination during thermotherapy of potato microplants / H. Lopez-Delgado, M. E. Mora-Herrera, H. A. Zavaleta-Mancera, M. Cadena-Hinojosa, I. M. Scott // *Am. J. Potato Res.* – 2004. – Vol. 81. – Is. 3. – Pp. 171–176. DOI: 10.1007/BF02871746
227. Mahmoud, S. Y. M. Evaluation of some therapies to eliminate Potato Y potyvirus from potato plants / S. Y. M. Mahmoud, M. H. Hosseney, M. H. Abdel-Ghaffar // *Int. J. Virol.* – 2009. – Vol. 5. – Is.2. – Pp. 64–76. DOI: 10.3923/ijv.2009.64.76.
228. Marco-Medina, A. Cryopreservation of *Thymus moroderi* by droplet vitrification / A. Marco-Medina, J. L. Casas, R. Swennen, B. Panis // *CryoLetters*. – 2010. – Vol. 31. – Pp. 14–23.
229. Martinez-Montero, M. E. Cryobionomics: evaluating the concept in plant cryopreservation / M.E. Martinez-Montero, K. Harding // In: D. Barh et al. (eds.) *PlantOmics: the omics of plant science*, Springer India. – 2015. – Pp. 655–682. DOI 10.1007/978-81-322-2172-2_23.
230. Matsumoto, T. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia Japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration / T. Matsumoto, A. Sakai, K. Yamada // *Plant Cell Rep.* – 1994. – Vol. 13. – Pp. 442–446.
231. Mavrič Pleško I. Biological, serological and molecular characterisation of Raspberry bushy dwarf virus from grapevine and its detection in the nematode *Longidorus juvenilis* / I. Mavrič Pleško, M. Viršček Marn, S. Sirca, G. Urek // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2009. – Vol. 123. – Pp. 261–268.
232. McNicol, R. J. *In vitro* regeneration of *Rubus* from leaf and stem segments // R. J. McNicol, J. Graham // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 1990. – Vol. 21. – Pp. 45–50.
233. Medina, C. Occurrence and distribution of viruses in commercial plantings of *Rubus*, *Ribes* and *Vaccinium* species in Chile / C. Medina, J.T. Matus, M. Zuniga, C. San-Martin, P. Arce-Johnson // *Chile Inv. Agr.* – 2006. – Vol. 33. – Pp. 19–24.

234. Menon, A. Cold-induced changes affect survival after exposure to vitrification solution during cryopreservation in the south-west Australian Mediterranean climate species *Lomandra sonderi* (*Asparagaceae*) / A. Menon, B. Funnekotter, A. Kaczmarczyk, E. Bunn, S. Turner, R. L. Mancera // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2014. DOI 10.1007/s11240-014-0538-9.
235. Milusheva, S. First report on identification of Raspberry bushy dwarf virus in red raspberry (*Rubus idaeus* L.) in Bulgaria / S. Milusheva, K. Koumanov, G. Kornov // *Third Congress of Virology.* October 25-27. 2012. – Sofia. Proceedings and Abstract. – Pp. 127–131.
236. Morel, G. T. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus / G.T. Morel, C. Martin // *C R Acad Sci III.* – 1952. – Vol. 235. – Pp. 1324–1325.
237. Murrant, A. F. Raspberry ringspot and associated diseases of *Rubus* caused by raspberry ringspot and tomato black ring viruses / A. F. Murrant // In: *Virus diseases of small fruits* (Ed. by R. H. Converse). – USDA Agriculture Handbook. – 1987. – Vol. 631. – Pp. 211–220.
238. Murrant, A. F. Spread of Raspberry bushy dwarf virus by pollination, its association with crumbly fruit and problems of control / A. F. Murrant, J. Chambers, A. T. Jones // *Ann. Appl. Biol.* – 1974. – Vol. 77. – Pp. 271–281.
239. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol Plantarum.* – 1962. – Vol. 15. – Pp. 473–497.
240. Nascimento, L. C. Stock indexing and potato virus Y elimination from potato plants cultivated *in vitro* / L.C. Nascimento, G. Pio-Ribeiro, L. Willadino, G.P. Andrade // *Scientia Agricola.* – 2003. – Vol. 60. – Is. 3. – Pp. 525–530. DOI: 10.1590/S0103-90162003000300017.
241. Nasir, I. A. Strategies to control potato virus Y under *in vitro* conditions / I. A. Nasir, B. Tabassum, Z. Latif, M. A. Javed, M. S. Haider, M. A. Javed, T. Husnain // *Pak. J. Phytopathol.* – 2010. – Vol. 22. – Is. 1. – Pp. 63–70.
242. Nicot, N. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress / N. Nicot, J. F. Hausman, L. Hoffmann, D. Evers // *J. Exp. Bot.* – 2005. – Vol. 56(421). – Pp. 2907–2914. DOI: 10.1093/jxb/eri285.
243. Nicuță, D. Aspects regarding the *in vitro* multiplication of the *Rubus hirtus* L. species / D. Nicuță, G. Rotilă, Ș. Ciobanu // *Studii și Cercetări Biologie.* – 2014. – Vol. 23. – Is. 1. – Pp. 79–84.
244. Niino, T. Cryopreservation for preservation of potato genetic resources / T. Niino, M. Valle Arizaga // *Breed Sci.* – 2015. – Vol. 65. – Is. 1. – Pp. 41–52.
245. Nishizawa, S. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification / S. Nishizawa, A. Sakai, Y. Amano, T. Matsuzawa // *Plant Sci.* – 1993. – Vol. 91. – Is. 1. – Pp. 67–73. DOI:10.1016/0168-9452(93)90189-7

246. Nukari, A. Cryopreservation of horticultural plants at MTT / A. Nukari, M. Uosukainen, J. Laamanen, S. Rantala // In: Grapin A., Keller E. R. J., Lynch P. T., Panis B., Revilla Bahillo A., Engelmann F. (eds.). Proceeding of the final meeting COST Action 871 CryoPlanet “Cryopreservation of crop species in Europe”. – 2011. – Pp. 93–97.
247. Nukari, A. Cryopreservation techniques and their application in vegetatively propagated crops in Finland / A. Nukari, M. Uosukainen, V. M. Rokka, K. Antonius, Q. Wang, J. P. T. Valkonen // Agricultural and Food Science. – 2009. – Vol. 18. – Pp. 117–128.
248. Operational Genebank manual of IPK. – Gatersleben. – 2011.
249. Ovchinnikova, A. Taxonomy of cultivated potatoes (*Solanum* section *Petota*: *Solanaceae*) / A. Ovchinnikova, E. Krylova, T. Gavrilenko, T. Smekalova, M. Zhuk, S. Knapp, D. M. Spooner // Bot. J. Linn. Soc. – 2011. – Vol. 165. – Pp. 107–155.
250. Ozudogru, E. A. Cryopreservation of redwood (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.) *in vitro* buds using vitrification-based techniques / E. A. Ozudogru., E. Kirdok, E. Kaya, M. Capuana, C. Benelli, F. Engelmann. – CryoLetters. – 2011. – Vol. 32. – Is. 2. – Pp. 99–110.
251. Paet, C. N. Efficacy of thermotherapy and group culture of isolated potato meristems for the elimination of single and mixed infections of Potato Virus Y, Potato Virus S and Potato Leaf Roll Virus / C. N. Paet, A. B. Zamora // Philipp. J. Crop. Sci. – 1990. – Vol. 15. – Is. 2. – Pp. 113–118.
252. Panis, B. Securing plant genetic resources for perpetuity through cryopreservation / B. Panis, I. Van den Houwe, R. Swennen, J. Rhee, N. Roux // Indian J Plant Genet Resour. – 2016. – Vol. 29. – Is. 3. – Pp. 300–302.
253. Panis, B. Cryopreservation of *Musa* germplasm: 2nd edition / B. Panis // Technical Guidelines No. 9 (F. Engelmann, E. Benson eds). – Bioversity International, Montpellier, France. – 2009. – 51pp.
254. Panis, B. Droplet vitrification of apical meristems: A cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae* // B. Panis, B. Piette, R. Swennen // Plant Sci. – 2005. – Vol. 168. – Pp. 45–55.
255. Panis, B. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees) / B. Panis, M. Lambardi // The role of biotechnology. – 2005. – Pp. 43–54.
256. Panta, A. Development of a PVS2 droplet vitrification method for potato cryopreservation / A. Panta, B. Panis, C. Ynouye, R. Swennen, W. Roca // CryoLetters. – 2014. – Vol. 35. – Is. 3. – Pp. 255–266.
257. Panta, A. Improved cryopreservation method for the long-term conservation of the world potato germplasm collection / A. Panta, B. Panis, C. Ynouye, R. Swennen, W. Roca, D. Tay, D. Ellis // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2015. – Vol. 120. – Pp. 117–125.

258. Panta, A. Status and impact of the *in vitro* conservation of root and tubers at the International Potato Centre (CIP) / A. Panta, D. Tay, R. Gomez, B. Zea, E. Rojas, R. Simon, W. Roca // Proc. 15th Triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops. – Lima, Peru. – 2009. – Pp. 15–24.
259. Pawłowska, B. Droplet-vitrification cryopreservation of *Rosa canina* and *Rosa rubiginosa* using shoot tips from *in situ* plants / B. Pawłowska, B. Szewczyk-Taranek // Sci Hortic. – 2013. – Vol. 168. – Pp. 151–156. DOI:10.1016/j.scienta.2013.12.016.
260. Peters, D. Potato leafroll virus / D. Peters // AAB Descriptions of Plant Viruses. – 1970. – No. 36.
261. Pinker, I. P. Effects of sucrose preculture on cryopreservation by droplet-vitrification of strawberry cultivars and morphological stability of cryopreserved plants / I. P. Pinker, A. Halmagyi, K. Olbricht // CryoLetters. – 2009. – Vol. 30. – Is. 3. – Pp. 202–211.
262. Poothong, S. Modeling the effects of mineral nutrition for improving growth and development of micropropagated red raspberries / S. Poothong, B.-M. Reed // Sci.Hortic. – 2014. – Vol. 165. – Pp. 132–141.
263. Poothong, S. Increased CaCl₂, MgSO₄, and KH₂PO₄ improve the growth of micropropagated red raspberries / S. Poothong, B.-M. Reed // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2015. – Vol. 51. – Pp. 648–658.
264. Poothong, S. Optimizing shoot culture media for *Rubus* germplasm: the effects of NH₄⁺, NO₃⁻, and total nitrogen / S. Poothong, B.-M. Reed // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant 2016. – Vol. 52 – Is. 3. – Pp. 265–275.
265. Popov A. S. Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences // A. S. Popov, E. V. Popova, T. V. Nikishina, O. N. Vysotskaya // International Journal of Refrigeration. – 2006. – Vol. 29. – № 3. – C. 403–410.
266. Pūpola, N. Occurrence of RBDV in Latvia and virus elimination *in vitro* by chemotherapy / N. Pūpola, L. Lepse, A. Kālel, I. Moročko-Bičevska // Scientific works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture. – 2009. – Vol. 28. – Is. 3. – Pp. 165–172.
267. Reed, B. M. Medium- and long-term storage of *in vitro* cultures of temperate fruit and nut crops / B. M. Reed, Y. Chang // In.: Conservation of plant genetic resources *in vitro*. M. K. Razdan, E. C. Cocking. – 1997. – Vol. 1. – Pp. 67–103.
268. Reed, B. M. Cold acclimation as a method to improve survival of cryopreserved *Rubus* meristems / B. M. Reed // CryoLetters. – 1988. – Vol. 9. – Pp. 166–171.
269. Reed, B. M. Freeze preservation of apical meristems of *Rubus* in liquid nitrogen / B. M. Reed, H. B. Lagerstedt // HortScience. – 1987. – Vol. 22. – Is. 2. – Pp. 302–303.

270. Reed, B. M. Improved survival of *in vitro*-stored *Rubus* germplasm / B. M. Reed // J Amer Soc Hort Sci. – 1993. – Vol. 11. – Pp. 890–895.
271. Reed, B. M. Multiplication of *Rubus* germplasm *in vitro*: a screen of 256 accessions / B. M. Reed // Fruit Varieties Journal. – 1990. – Vol. 44. – Is. 3. – Pp. 141–148.
272. Reed, B. M. Plant cryopreservation: A practical guide / B. M. Reed // Springer, New York. – 2008. – 496 pp.
273. Reed, B. M. Tissue Culture and Cryopreservation / B. M. Reed, J. DeNoma // In: K. Hummer (ed.) Corvallis repository annual report for 2012. – United States Department of Agriculture. – <https://iapreview.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/20721500/AnnualReports/CorvallisAnnualReport2012.pdf>. – P. 29. – Cited 05 Apr 2017.
274. Reed, B.-M. Plant cryopreservation: a continuing requirement for food and ecosystem security / B.-M. Reed // In Vitro Cell.Dev.Biol. – Plant. – 2017. DOI 10.1007/s11627-017-9851-4
275. Reed, B.-M. / *In Vitro* Genebanks for Preserving Tropical Biodiversity // B.-M. Reed, S. Gupta, E. E. Uchendu // Chapter 5 in: M. N. Normah et al. (eds.), Conservation of tropical plant species, © Springer Science+Business Media New York, 2013. – Pp. 77–106. DOI 10.1007/978-1-4614-3776-5_5
276. Rosenberg, V. Overview of *in vitro* Preservation of potato and use of the gene bank material in Estonia / V. Rosenberg, J. Edesi, K. Liiv, K. Kotkas // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. – 2013. – Vol. 67. – No. 3 (684). – Pp. 219–223. DOI: 10.2478/prolas-2013-0038.
277. Ružić, D. Cryopreservation *in vitro* of Blackberry 'Čačanska Bestrna' shoot tips by encapsulation dehydration / D. Ružić, T. Vujović // ActaHort. – 2012. – Vol. 946. – Pp. 5–60. DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.946.5.
278. Ružić, D. *In vitro* conservation of two plant species (*Prunus cerasifera* Ehrh. and *Rubus fruticosus* L.) shoot tips by encapsulation dehydration / D. Ružić, T. Vujović, R. Cerović // Genetika. – 2013. – Vol. 45. – No.1. – Pp. 1–10.
279. Sabanadzovic, S. Idaeovirus. Unassigned Genus / S. Sabanadzovic, R. R. Martin // In: C. Tidona, G. Darai (eds.). – The Springer Index of Viruses. – 2011. – Pp. 2005–2009. DOI 10.1007/978-0-387-95919-1.
280. Sakai, A. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification / A. Sakai, S. Kobayashi, I. Oiyama // Plant Cell Rep. – 1990. – Vol. 9. – Is. 1. – Pp. 30–33. DOI:10.1007/bf00232130.
281. Sakai, A. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols / A. Sakai, D. Hirai, N. Takao // In: B. M. Reed (ed.). Plant cryopreservation: A practical guide. – Springer, USA. – 2008. – Pp. 33–51.

282. Sakai, A. Potentially valuable cryogenic procedures for cryopreservation of cultured plant meristems / A. Sakai // Razdan M.K., Cocking E.C. (eds.). Conservation of plant genetic resource *in vitro*. – Science Publishers. – USA. – 1997. – Pp. 53–66.
283. Sakai, A. Survival of the twig of woody plants at -196°C / A. Sakai // Nature. – 1960. – Vol. 185. – Pp. 393–394.
284. Sanchez, G. E. Response of selected *Solanum* species to virus eradication therapy / G. E. Sanchez, S. A. Slack, J. H. Dodds // Am. Potato J. – 1991. – Vol. 68. – Pp. 299–315. DOI: 10.1007/BF02853668.
285. Sant, R. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions / R. Sant, B. Panis, M. Taylor, A. Tyagi // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2008. – Vol. 92. – Pp. 107–111.
286. Schäfer-Menuhr, A. Langzeitlagerung alter Kartoffelsorten durch Kryokonservierung der Meristeme in flüssigem Stickstoff / A. Schäfer-Menuhr, H. M. Schumacher, G. Mix-Wagner // Landbauforschung Völkenrode. – 1994. – Vol. 44. – Pp. 301–313.
287. Shvachko, N. Cryopreservation of potato landraces using droplet-vitrification method / N. Shvachko, T. Gavrilenko // In: Proceeding of COST Action 871 Cryopreservation of crop species in Europe Final meeting. Grapin A., Keller J., Lynch P., Panis B., Revilla A., Engelmann F. (eds.). –Angers. – 2011. – Pp. 135–137.
288. Singh, B. Effect of Antiviral Chemicals on *In Vitro* Regeneration Response and Production of PLRV-Free Plants of Potato / B. Singh // J. Crop Sci. Biotech. – 2015. – Vol. 18. – Is. 5. – Pp. 341–348. DOI. No. 10.1007/s12892-015-0069-x
289. Singh, R. P. Development of the molecular methods for potato virus and viroid detection and prevention / R. P. Singh // Genome. – 1999. – Vol. 42. – Pp. 592–604.
290. Souza, F. V. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes / F. V. Souza, K. Ergun, L. Vieria De Jesus, E. H. De Souza, V. Amorim, D. M. Skogerboe, T. Matsumoto, A. A. Alves, C. Ledo, M. M. Jenderek // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2016. – Vol. 124. – Pp. 351–360. DOI 10.1007/s11240-015-0899-8.
291. Spooner, D. M. Systematics, diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated potatoes / D. M. Spooner, M. Ghislain, R. Simon, S. H. Jansky, T. Gavrilenko // Botanical Review. – 2014. – Vol. 80. – Is. 4. – Pp. 283–383.
292. Spak, J. Epidemiology of raspberry bushy dwarf virus in the Czech Republic // J. Spak, D. Kubelkova' // J. Phytopathol. – 2000. – Vol. 148. – Pp. 371–377.
293. Steponkus, P. L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation / P. L. Steponkus // Annu Rev Plant Phys. – 1984. –Vol. 35. – Is. 1. – Pp. 543–584. DOI:10.1146/annurev.pp.35.060184.002551

294. Tannoury, M. Cryopreservation by vitrification of coated shoot-tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultured *in vitro* / M. Tannoury, J. Ralambosoa, M. Kaminski, J. Dereuddre // Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. – Paris. – 1991. – Vol. 313. – Série III. – Pp. 633–638.
295. Towill, L. E. Cryopreservation of dormant buds / L. E. Towill, D. D. Ellis // In: B. M. Reed (ed.). Plant cryopreservation: A practical guide. – Springer, USA. – 2008. – Pp. 421–442.
296. Towill, L. E. Cryopreservation of *Malus* germplasm using a winter vegetative bud method: results from 1915 accessions / L. E. Towill, P. L. Forsline, C. Walters, J. W. Waddell, M. J. Laufmann // CryoLetters. – 2004. – Vol. 25. – Pp. 323–334.
297. Towill, L. E. Improved survival after cryogenic exposure of shoot tips derived from *in vitro* plantlet cultures of potato / L. E. Towill // Cryobiology. – 1983. – Vol. 20. – Pp. 567–573.
298. Tsvetkov, I. Application of vitrification-derived cryotechniques for long-term storage of poplar and aspen (*Populus* spp.) germplasm / I. Tsvetkov, C. Benelli, M. Capuana, A. De Carlo, M. Lambardi // Agr. Food Sci. – 2009. – Vol. 18. – Pp. 160–166.
299. Uchendu, E. E. Antioxidant and anti-stress compounds improve regrowth of cryopreserved *Rubus* shoot tips / E. E. Uchendu, M. Muminova, S. Gupta, B. M. Reed // In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant. – 20106. – Vol. 46. – Pp. 386–393. DOI 10.1007/s11627-010-9292-9
300. Uchendu, E. E. Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation / E. E. Uchendu, S. W. Leonard, M. G. Traber, B. M. Reed // Plant Cell Reports. – 2010a. – Vol. 29. – Pp. 25–35.
301. Ukhatova, Y. V. Cryopreservation of red raspberry cultivars from the VIR *in vitro* collection using a modified droplet-vitrification method / Y. V. Ukhatova, S. E. Dunaeva, O. Y. Antonova, O. V. Apalikova, K. S. Pozdniakova, L. Y. Novikova, L. E. Shuvalova, T. A. Gavrilenko // In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant. – 2017. – DOI:10.1007/s11627-017-9860-3
302. Valasevich, N. Molecular characterisation of Raspberry bushy dwarf virus isolates from Sweden and Belarus / N. Valasevich, N. Kukharchyk, A. Kvarnheden // Arch Virol. – 2011. – Vol. 156. – Pp. 369–374.
303. Valkonen, J. P. T. Natural genes and mechanisms for resistance to viruses in cultivated and wild potato species (*Solanum* spp.) / J. P. T. Valkonen // Pl. Breed. – 1994. – Vol. 112. – Pp. 1–16.
304. Valle Arizaga, M. Improvement to the D cryo-plate protocol applied to practical cryopreservation of *in vitro* grown potato shoot tips / M. Valle Arizaga, O. F. Villalobos Navarro, C. R. Castillo Martinez, E. J. Cruz Gutiérrez, H. A. López Delgado, S. Yamamoto, K. Watanabe, T. Niino // The Horticulture Journal Preview. – 2017. – Vol. 86. – Pp. 222–228.

305. Volk, G. M. High viability of dormant *Malus* buds after 10 years of storage in liquid nitrogen vapor / G. M. Volk, J. Waddell, R. Bonnart, L. Towill, D. Ellis, M. Luffmann // *CryoLetters*. – 2008. – Vol. 29. – Pp. 89–94.
306. Volk, G. M. Probabilistic viability calculations for cryopreserving vegetatively propagated collections in genebanks / G. M. Volk, A. D. Henk, M. M. Jenderek, C. M. Richards // *Genet Resour Crop Evol.* – 2016. DOI 10.1007/s10722-016-0460-6
307. Vollmer, R. The potato cryobank at the International Potato Center (CIP): a model for long term conservation of clonal plant genetic resources collections of the future / R. Vollmer, R. Villagaray, V. Egusquiza, J. Espirilla, M. Garcia, A. Torres, E. Rojas, A. Panta, N.A. Barkley, D. Ellis // *CryoLetters*. – 2016. – Vol. 37. – Is. 5. – Pp. 318–329.
308. Vollmer, R. A large-scale viability assessment of the potato cryobank at the International Potato Center (CIP) / R. Vollmer, R. Villagaray, J. Cárdenas, M. Castro, O. Chávez, N. L. Anglin, D. Ellis // *In Vitro Cell.Dev.Biol. – Plant*. DOI 10.1007/s11627-017-9846-1
309. Vujović, T. Droplet vitrification of apical shoot tips of *Rubus fruticosus* L. and *Prunus cerasifera* Ehrh / T. Vujović, I. Sylvestre, D.J. Ružić, F. Engelman // *Scientia Horticulturae*. – 2011. – Vol. 130. – Pp. 222–228.
310. Vujović, T. Optimization of droplet vitrification protocol for cryopreservation of *in vitro* grown blackberry shoot tips / T. Vujović, D. J. Ružić, R. Cerović // *Acta Hort.* – 2015. – Vol. 1099. – Pp. 595–601.
311. Wang, B. Potential applications of cryogenic technologies to plant genetic improvement and pathogen eradication / B. Wang, R. R. Wang, Z. H. Cui, W. L. Bi., J. W. Li, B. Q. Li, E. A. Ozudogru, G. M. Volk, Q. C. Wang // *Biotechnology Advances*. – 2014. – Vol. 32. – Pp. 583–595.
312. Wang, Q. C. Combined thermotherapy and cryotherapy for virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips to efficient production of virus-free plants // Q. C. Wang, W. J. Cuellar, M. L. Rajamaki, Y. Hiraka, J. P. T. Valkonen // *Mol Plant Pathol.* – 2008. – Vol. 9. – Is. 2. – Pp. 237–250. DOI:10.1111/j.1364-3703.2007.00456.
313. Wang, Q. C. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration / Q. C. Wang, J. Laamanen, M. Uosukainen, Valkonen J. P. T. // *Plant Cell Rep.* – 2005. – Vol. 24. – Pp. 280–288.
314. Wang, Q. C. Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of Potato leaf roll virus (PLRV) and Potato virus Y (PVY) / Q. C. Wang, Y. Liu, Y. H. Xie, M. You // *Potato Res.* – 2006. – Vol. 49. – Pp. 119–129.

315. Wang, Q. C. Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation / Q. C. Wang, B. Panis, F. Engelmann, M. Lambardi, J. P. T. Valkonen // *Ann. Appl. Biol.* – 2009. – Vol. 154. – Pp. 351–363. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00308>.
316. Wang, Q. C. Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. / Q. C. Wang, M. Munir, P. Li, R. Gafny, I. Sela, E. Tanne // *Plant Sci.* – 2003. – Vol. 165. – Pp. 321–327.
317. Wang, Q. C. Improved recovery of cryotherapy-treated shoot tips following thermotherapy of *in vitro*-grown stock shoots of raspberry (*Rubus idaeus* L.) / Q. C. Wang, J. P. T. Valkonen // *CryoLetters.* – 2009. – Vol. 30. – Is. 3. – Pp. 171–182.
318. Yamamoto, S. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates / S. Yamamoto, T. Rafique, W.S. Priyantha, K. Fukui, T. Matsumoto, T.Niino // *CryoLetters.* – 2011. – Vol. 32. – Pp. 256–265.
319. Yamamoto, S. The aluminum cryo-plate increases efficiency of cryopreservation protocols for potato shoot tips / S. Yamamoto, T. Wunna, M. Rafique, K. Valle Arizaga, E. Fukui, C. Cruz Gutierrez, K. Watanabe, T. Niino // *Am. J. Potato Res.* – 2015. – Vol. 92. – Pp. 250–257.
320. Yamamoto, S. V-cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: case study of mint cryopreservation / S. Yamamoto, T. Rafique, K. Fukui, K. Sekizawa, T. Niino // *CryoLetters.* – 2012. – Vol. 33. – Pp. 12–23.
321. Yang, L. A reexamination of the effectiveness of ribavirin on eradication of viruses in potato plantlets *in vitro* using ELISA and quantitative RT-PCR / L. Yang, B. Nie, J. Liu, B. Song // *Am. J. Potato Res.* – 2014. – Vol. 91. – Is. 3. – Pp. 304–311. DOI: 10.1007/s12230-013-9350-z.
322. Yardımcı, N. Detection of PVY, PVX, PVS, PVA, and PLRV on Different Potato Varieties in Turkey Using DAS-ELISA / N. Yardımcı, H. Çulal Kılıç, Y. Demir // *J. Agr. Sci. Tech.* – 2015. – Vol. 17. – Pp. 757–764.
323. Yoon, J. W. Cryopreservation of cultivated and wild potato varieties by droplet vitrification: effect of subculture of mother-plants and of preculture of shoot tips / J. W. Yoon, H. H. Kim, H. C. Ko, H. S. Hwang, E. S. Hong, E. G. Cho, F. Engelmann // *CryoLetters.* – 2006. – Vol. 27. – Pp. 211–222.
324. Zapata, C. An *in vitro* procedure to eradicate potato viruses X, Y, and S from Russet Norkotah and two of its strains / C. Zapata, J. C. Miller Jr., R. H. Smith // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* – 1995. – Vol. 31. – Is. 3. – Pp. 153–159. DOI: 10.1007/BF02632012.
325. Zayova, E. Comparison of antioxidant activity of the fruits derived from *in vitro* propagated and traditionally cultivated tayberry plants / E. Zayova, I. Stancheva, M. Geneva, M. Petrova, L. Dimitrova // *J Sci Food Agric.* – 2016. – Vol. 96. – Pp. 3477–3483.

326. Zhang, J. *In vitro* conservation and cryopreservation in national genebank of China / J. Zhang, X. Xin, G. Yin, X. Lu, X. Chen // *Acta Hort.* – 2014. – Vol. 1039. – Pp. 309–317.
327. ГОСТ Р 53135-2008 Посадочный материал плодовых, ягодных, субтропических, орехоплодных, цитрусовых культур и чая. Технические условия. – М.: Стандартинформ, 2009. – 45 с.
328. ГОСТ Р 53136-2008 Картофель семенной. Технические условия. – М.: Стандартинформ, 2010. – 10 с.
329. ГОСТ Р 55329-2012 Картофель семенной. Приемка и методы анализа. – М.: Стандартинформ, 2013. – 28 с.
330. Государственная программа развития сельского хозяйства и регулирования рынков сельскохозяйственной продукции сырья и продовольствия на 2013-2020» годы Постановление Правительства РФ от 14.07.2012 N 717 (ред. от 29.07.2017) / Собрание законодательства Российской Федерации, 2012. – №32. – ст. 4549.
331. Воробьев, В. Ф. Стратегия развития садоводства и питомниководства Российской Федерации на период до 2020 года // В. Ф. Воробьев, А. С. Косякин, В. В. Бычков, А. А. Борисова, А. В. Никитин, Е. А. Егоров, Ю. В. Трунов, В. В. Хроменко, С. Н. Коновалов, М. Т. Упадышев, А. Ю. Павлова / Москва, 2012. – 88 с.
332. Набор «Реагент ExtractRNA, #BC032» фирмы Евроген (<http://www.evrogen.ru/>).
333. Набор «Выделение тотальной РНК на магнитных частицах, покрытых SiO₂» фирмы Силекс М (<http://sileks.com/>).
334. Определение высоты над уровнем моря по координатам / Электронный ресурс. – Режим доступа: <http://www.latlong.ru/#3> (01/10/2017).
335. Руководство пользователя по использованию набора реагентов для тестирования на наличие вируса RBDV. URL: <https://orders.agdia.com/Documents/m12.pdf> (дата обращения: 10.05.2014).
336. FAOSTAT <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> 2013; <http://www.mapsofworld.com/world-top-ten/raspberry-producing-countries.html>, 10/03/2017
337. User guide for ELISA Reagent Set SRA 58200/1000 Raspberry bushy dwarf virus. URL: <https://orders.agdia.com/Documents/m12.pdf> (дата обращения: 10.05.2014).

Материал исследований

№ п/п	Название образца	Вид	№ по каталогу К-ВИР или откуда получен образец	Варианты опытов		
				Структурирование	Криоконсервация	Оздоровление от вирусов
1	2	3	4	5	6	7
1	Бабье лето-2	<i>R. idaeus</i> L.		+		
2	Бальзам	<i>R. idaeus</i> L.	К-35447		+	
3	Барнаульская	<i>R. idaeus</i> L.	К-31185	+	+	
4	Белая Спирина	<i>R. idaeus</i> L.	К-8210	+	+	
5	Вислуха	<i>R. idaeus</i> L.	К-8213	+		
6	Глория х НК	<i>R. idaeus</i> L.		+		
7	Грушовка	<i>R. idaeus</i> L.	К-15224	+		
8	Гусар	<i>R. idaeus</i> L.		+		
9	Ивушка	<i>R. idaeus</i> L.		+		
10	Искра	<i>R. idaeus</i> L.	К-31230	+		
11	Каскад	<i>R. idaeus</i> L.	К-35924	+		
12	Кокинская	<i>R. idaeus</i> L.	К-35921		+	
13	Краснокутская	<i>R. idaeus</i> L.	К-39384	+		
14	Красноплодный сеянец	<i>R. idaeus</i> L.	К-8257	+		
15	Любительская	<i>R. idaeus</i> L.	К-31193	+		
16	Марьянушка	<i>R. idaeus</i> L.	К-39375	+		
17	Местная	<i>R. idaeus</i> L.	К-8266	+		
18	Метеор	<i>R. idaeus</i> L.	К-35926	+	+	
19	Надежда	<i>R. idaeus</i> L.	К-24610	+		
20	Новокитаевская	<i>R. idaeus</i> L.	К-29862		+	+
21	Память Горького	<i>R. idaeus</i> L.	К-24621	+		
22	Прогресс	<i>R. idaeus</i> L.	К-8293	+	+	
23	Ранняя сладкая	<i>R. idaeus</i> L.	К-8283	+		

1	2	3	4	5	6	7
24	Самарская плотная	<i>R. idaeus</i> L.	К-40730	+	+	+
25	Скромница	<i>R. idaeus</i> L.	К-35478	+	+	
26	Советская	<i>R. idaeus</i> L.	К-8317	+		
27	Соколенок	<i>R. idaeus</i> L.	К-40483		+	
28	Сормовичка	<i>R. idaeus</i> L.	К-24616	+		
29	Спутница	<i>R. idaeus</i> L.	К-35476		+	
30	Суздальская	<i>R. idaeus</i> L.	К-15014	+		
31	Таганка	<i>R. idaeus</i> L.	К-35471	+		
32	Урожайная	<i>R. idaeus</i> L.	К-11783	+		
33	Шарташская	<i>R. idaeus</i> L.	К-8337	+	+	
34	Bababerry	<i>R. idaeus</i> L.	И-581153	+		
35	Canby	<i>R. idaeus</i> L.	И-588472	+		
36	Chief	<i>R. idaeus</i> L.	И-588249	+		
37	Cornoelles Victoria	<i>R. idaeus</i> L.	К-8247	+		
38	Cumberland	<i>R. occidentalis</i> L.	И-588467	+		
39	Festival	<i>R. idaeus</i> L.	И-576491	+		
40	Mandarin	<i>R. idaeus</i> L.	И-576501	+		
41	Nootka	<i>R. idaeus</i> L.	И-576504	+		
42	Phenix	<i>R. idaeus</i> L.			+	
43	Rubin bulgarsky	<i>R. idaeus</i> L.	И-576507	+		
44	Sentry	<i>R. idaeus</i> L.	И-576509	+		
45	Summit	<i>R. idaeus</i> L.	И-576512	+		
46	Trent	<i>R. idaeus</i> L.	И-76513	+		
47	Viking	<i>R. idaeus</i> L.	И-576515	+		
48	Ashton cross	<i>R. hybrid</i>	И-581145	+	+	
49	Bodega Bay	<i>R. ursinus</i> Cham. and Schldl.	И-576483	+		
50	Boysen	<i>R. hybrid</i>	И-555647	+		
51	Brazos	<i>R. hybrid</i>	И-576484	+		
52	Cascade	<i>R. hybrid</i>	И-576485	+		
53	Cherokee	<i>R. hybrid</i>	И-581139	+		
54	Darrow	<i>R. hybrid</i>	И-588465	+	+	

1	2	3	4	5	6	7
55	Dirksen Thornless	<i>R. hybrid</i>	И-581140	+		
56	Ebano	<i>R. hybrid</i>	И-576489	+		
57	Evergreen Thornless	<i>R. laciniatus</i> Willd.	И-576490	+		
58	Logan Thornless	<i>R. hybrid</i>	И-576497	+		
59	Merton Thornless	<i>R. hybrid</i>	И-581143	+		
60	Nc 861402	<i>R. argutus</i> Link	И-581151	+		
61	Orus 1063	<i>R. hybrid</i>	И-581146	+		
62	Santiam	<i>R. ursinus</i> Cham. and Schldl.	И-576508	+		
63	Silvan	<i>R. hybrid</i>	И-576510	+		
64	Waldo	<i>R. hybrid</i>	И-588478	+		
65	Whitford Thornless	<i>R. argutus</i> Link	И-576516	+	+	
66	Young	<i>R. hybrid</i>	И-576517	+	+	
67	Агава	<i>R. alleghenensis</i> Porter.		+		
68	<i>Rubus axillaris</i>	<i>Rubus axillaris</i>	И-588614	+		
69	<i>Rubus illecebrosus</i>	<i>Rubus illecebrosus</i>	И-588477	+		
70	<i>Rubus parvifolius</i>	<i>Rubus parvifolius</i>	И-588463	+		
71	<i>Rubus pyramidalis</i>	<i>Rubus pyramidalis</i>	И-589009	+		
72	Импала	<i>S. tuberosum</i> ssp <i>tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	
73	Никулинский	<i>S. tuberosum</i> ssp <i>tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	
74	Жуковский ранний	<i>S. tuberosum</i> ssp <i>tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	
75	Gala	<i>S. tuberosum</i> ssp <i>tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	
76	Барин	<i>S. tuberosum</i> ssp <i>tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	
77	Лорх	<i>S. tuberosum</i> ssp <i>tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	
78	Red Scarlett	<i>S. tuberosum</i> ssp <i>tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	
79	Голубизна	<i>S. tuberosum</i> ssp <i>tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	
80	Накра	<i>S. tuberosum</i> ssp <i>tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	
81	Крепыш	<i>S. tuberosum</i> ssp <i>tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	
82	Жигулёвский	<i>S. tuberosum</i> ssp <i>tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	
83	Невский	<i>S. tuberosum</i> ssp <i>tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	
84	Вымпел	<i>S. tuberosum</i> ssp <i>tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	
85	Брянский деликатес	<i>S. tuberosum</i> ssp <i>tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	

1	2	3	4	5	6	7
86	Великан	<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	
87	Фиолетовый	<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	
88	Метеор	<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	
89	Удача	<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	
90	Колобок	<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	
91	Ильинский	<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	ВНИИКХ		+	
92	Importable 55(47)	<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	7540		+	+
93	Mantequilla 79(86)	<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	7576		+	
94		<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	2083		+	
95		<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	7589		+	
96	Amarilla temprana№1	<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	3414		+	
97	Amarilla redonda 45/78	<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	7568		+	+
98		<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	2095		+	
99	Azul 3(57)	<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	7550		+	
100	Morada alargada	<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	7599		+	
101		<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	10648		+	
102		<i>S. stenotomum</i>	10194			
103		<i>S. stenotomum</i>	16911		+	
104		<i>S. stenotomum</i>	11020		+	
105		<i>S. stenotomum</i>	9048		+	
106		<i>S. stenotomum</i>	16596		+	
107		<i>S. stenotomum</i>	1664		+	
108		<i>S. phureja</i>	1817		+	
109		<i>S. phureja</i>	5642		+	
110		<i>S. phureja</i>	21564		+	
111		<i>S. phureja</i>	9836		+	
112		<i>S. chaucha</i>	24679		+	
113		<i>S. chaucha</i>	24689		+	
114		<i>S. chaucha</i>	24690		+	
115		<i>S. chaucha</i>	24698		+	
116		<i>S. chaucha</i>	25000		+	

1	2	3	4	5	6	7
117		<i>S. chaucha</i>	24678		+	
118		<i>S. chaucha</i>	24682		+	
119		<i>S. chaucha</i>	24674		+	
120		<i>S. andigenum</i>	1789		+	
121		<i>S. andigenum</i>	1763		+	
122		<i>S. andigenum</i>	1770		+	
123		<i>S. andigenum</i>	3172		+	
124		<i>S. juzepczukii</i>	25027		+	
125		<i>S. juzepczukii</i>	25015		+	
126		<i>S. juzepczukii</i>	25019		+	
127		<i>S. acaule</i>	23005		+	
128		<i>S. acaule</i>	23004		+	
129		<i>S. acaule</i>	9814		+	
130		<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	7528			+
131		<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	3407a			+
132		<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	7586			+
133		<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	10648			+
134		<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	24602			+
135		<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	3446			+
136		<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	2117 (B-206)			+
137		<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	7583			+
138		<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	3488			+
139		<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	7529			+
140		<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	2148 (Юз-8973)			+
141		<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	3456			+
142		<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i>	7573			+

Примечание: ВНИИКХ – образец получен в виде микрорастений из БЗСК ВНИИКХ им. Лорха в рамках программы «Картофелеводство»