

ПРИЛОЖЕНИЯ

к статье Т.А. Гавриленко, Н.А. Швачко, Н.Н. Волковой, Ю.В. Ухатовой

«Модифицированный метод дроблет-витрификации для криоконсервации апексов *in vitro* растений картофеля»

Приложение 1

Модификации оригинального протокола дроблет-витрификации (Panis et al., 2005), разработанные в разных генбанках для создания криоколлекций картофеля

Этап	Оригинальный протокол – INIBAP, Бельгия (Panis et al., 2005)	NAC, NAAS, RDA, Корея* (Kim et al., 2006; Yoon et al., 2006)	CIP, Перу* (Panta et al., 2014, 2015; Vollmer et al., 2017)	USPG, США (Bamberg et al., 2016)	ВИР, Россия (Дунаева и др., 2011; наст. работа)	
1	Культивирование (микроразмножение)	На твердой среде MS без гормонов – – – 30 г/л сахарозы, 3 г/л гелерита, при 25 ± 2 °С на постоянном свете, 4 недели	На твердой среде MS без гормонов – – – 30 г/л сахарозы, 2.2 г/л фитогель при 24 °С, фотопериоде 16/8, 3–7 недель	На твердой среде MS без гормонов – – – 25 г/л сахарозы, 2.8 г/л фитогель при 22 °С, фотопериоде 16/8, 3–4 недели	На твердой среде MS без гормонов – – – 30 г/л сахарозы, 2.2 г/л фитогель при 24 °С, фотопериоде 16/8, 4–8 недель	На твердой среде MS без гормонов – – – 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара при 22 ± 2 °С, фотопериоде 16/8, 3–4 недели
	Предобработка исходных микрорастений	На MS с 0.5 г/л активированного угля, 10 мг/л аскорбиновой к-ты – 4 недели; затем – на MS без гормонов, с 60 г/л сахарозы, при 25 °С, фотопериоде 16/8 – еще 4 недели	Этап отсутствует	MS без гормонов с 24 г/л сахарозы, 3 недели, холодное закаливание – 1 неделя при 6 °С, фотопериоде 16/8, 3 недели	Этап отсутствует	Этап отсутствует
2	Изоляция эксплантов	Апикальные меристемы	Пазушные почки (1.0–2.0 мм)	Апексы микропобегов 1.8–2.5 мм длиной	Апексы микропобегов 0.6–1.3 мм длиной	Апексы микропобегов 1.8–2.5 мм длиной
	Предобработка эксплантов – инкубация в жидких средах	LS при КТ до 5–7 ч	MS без гормонов со 102.6 г/л сахарозы – 8 ч, затем – в MS с 239 г/л сахарозы при КТ 18 ч	MS с 0.04 мг/л кинетина, 0.1 мг/л ГК, 2.8 г/л фитогель, 24 г/л сахарозы (MMP) при КТ около 1 ч	MS без гормонов со 102.6 г/л сахарозы – 16–24 ч, затем – в MS с 239 г/л сахарозы при КТ 7–8 ч	MS без гормонов с 30 г/л сахарозы, при КТ, период между изоляцией первого и последнего экспланта – 1 ч
3	Осмопротекция	В растворе LS при КТ 20 мин	Этап отсутствует	В растворе LS при КТ 15 мин	Этап отсутствует	В растворе LS при КТ 20 мин
	Дегидратация	Обработка PVS2 30–50 мин на льду	Обработка PVS2 20 мин	Обработка PVS2 50 мин на льду	Обработка PVS2 20 мин, при КТ	Обработка PVS2 30 мин на льду
	Перенос эксплантов на полоски фольги	По 8 эксплантов в каждую каплю (15 µl PVS2) на полоске фольги (5 × 20 мм)	По одному экспланту в каждую каплю (2.5 µl PVS2); 10 капель на полоске фольги (5 × 20 мм)	По 10 эксплантов в каплю (10–15 µl PVS2) на полоске фольги (5 × 20 мм)	По одному экспланту в каждую каплю (2.5 µl PVS2); 10 капель на полоске фольги (5 × 20 мм)	По одному экспланту в каждую каплю (2.5 µl PVS2); 10 капель на полоске фольги (5 × 20 мм)
4	Глубокое замораживание в жидком азоте (LN)	Погружение полоски фольги с эксплантами в криопробирку с LN на 1 ч	Погружение полоски фольги с эксплантами в криопробирку с LN на 1 ч	Погружение полоски фольги с эксплантами в криопробирку с LN на 24 ч	Погружение полоски фольги с эксплантами в криопробирку с LN на 1 ч	Погружение полоски фольги с эксплантами в криопробирку с LN на 1 ч

Окончание таблицы

Этап	Оригинальный протокол – INIBAP, Бельгия (Panis et al., 2005)	NAC, NAAS, RDA, Корея* (Kim et al., 2006; Yoon et al., 2006)	CIP, Перу* (Panta et al., 2014, 2015; Vollmer et al., 2017)	USPG, США (Bamberg et al., 2016)	ВИР, Россия (Дунаева и др., 2011; наст. работа)
5 Быстрое оттаивание	В RS (MS с 410.4 г/л сахарозы) при КТ 15 мин	В RS (MS с 273.6 г/л сахарозы) на 30 с при 40 °С, затем – при КТ 30 мин	В RS (MS с 410.4 г/л сахарозы) при КТ 20 мин	В RS (MS с 273.6 г/л сахарозы) при КТ, время не указано	В RS (MS с 410.4 г/л сахарозы) при КТ 15 мин
6 Посткриогенное восстановление	На фильтровальной бумаге, на среде MS с 10 мг/л аскорбиновой кислоты, 102.6 г/л сахарозы, 3 г/л гелерита, через два дня – перенос на среду MS с 2.2 мг/л БАП, 0.2 мг/л ИУК, 1 мг/л аскорбиновой кислоты, 30 г/л сахарозы. Вся первая неделя – в темноте	На среде MS с 30 г/л сахарозы, 0.3 мг/л зеатина, 0.05 мг/л ИУК, 0.05 мг/л ГК, 1.8 мг/л фитогеля, при 24 °С, 1 неделю – при пониженном освещении, затем – при 24 °С, фотопериод 16/8	На среде MS с 0.04 мг/л кинетина, 0.1 мг/л ГК (среда MMP) с ежедневно понижающимся уровнем сахарозы (со 102.6 до 24 г/л), 2.8 г/л фитогеля. Вся первая неделя – в темноте, затем на MMP с 24 г/л сахарозы, при 22 °С, фотопериод 16/8	На твердой MS (M519) – состав не указан	На MS с 0.5 мг/л зеатин-рибозида, 0.5 мг/л ИУК, 0.2 мг/л ГК, 30 г/л сахарозы, 7 г/л агара, при 22 °С, фотопериод 16/8
Сроки оценки регенерационной способности	В конце 3-й и 6-й недели	В конце 4-й и 6-й недели	В конце 3-й и 6-й недели	В конце 5-й и 8-й недели	В конце 3-й, 6-й, 8-й недели
Продолжительность всего цикла криоконсервации, включая период посткриогенной регенерации	18 недель	9–13 недель	11–13 недель	13–16 недель	11–12 недель
Число образцов в криобанке	1536	130	1533	280	230
Число криопробирок, число эксплантов на один образец, которые передаются в криобанк на дли- тельное хранение	от 150 эксплантов в 15 криопробирках (по 10 эксплантов в одной криопробирке)	от 100 эксплантов в 10 криопробирках (по 10 эксплантов в одной криопробирке)	от 100 эксплантов в 10 криопробирках (по 7 эксплантов в одной криопробирке)	Не указано	90 эксплантов в 9 криопробирках (по 10 эксплантов в одной криопробирке)

Примечание. КТ – комнатная температура; АУ – активированный уголь; LN – жидкий азот; MS – питательная среда Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962); LS и PVS2 – растворы для криоконсервации (состав указан в тексте статьи); фотопериод 16/8 – 16 ч свет, 8 ч темнота.

*Основные этапы протоколов перуанского и корейского генбанков были опубликованы ранее в работе (Niino, Valle Arizaga, 2015).

Приложение 2

Форма протокола для учета данных по жизнеспособности и регенерационной способности
эксплантов в экспериментах по криоконсервации

Вариант опыта	Число эксплантов	Неделя	Номер в каталоге ВИР, название вида, сорта		
			Число эксплантов		
Повторность			I	II	III
Дата					
Контроль, -LN		0			
		3			
		6			
		8			
Контроль, %					
Криоконсервация, +LN Число жизнеспособных эксплантов		0			
		3			
		6			
		8			
Уровень жизнеспособности, %					
Криоконсервация, +LN Число эксплантов с регенерантами		0			
		3			
		6			
		8			
Уровень посткриогенной регенерации, %					