

Evaluation of the effects of cryopreservation on the genetic stability of potato (*Solanum tuberosum*) plantlets and first-generation plants in Arinda and Sante cultivars using molecular markers

Seyed Ali Mirbabaie^{1*} , Morteza Samdaliri¹, Reza Zarghami², Amirabbas Mousavi¹, Ali Eftekhari¹

1. Department of Agronomy, Cha.C., Islamic Azad University, Chaloos, Iran.

2. Department of Tissue and Cell Culture, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.

Correspondence:

Sayed Ali Mirbabaie

Email: mirbabaie56@gmail.com

Received: 23, Sep. 2025

Accepted: 22, May 2026

How to cite:

Mirbabaie, S.A., Samdaliri, M., Zarghami, R., Mousavi, A., & Eftekhari, A. (2025). Evaluation of the effects of cryopreservation on the genetic stability of potato (*Solanum tuberosum*) plantlets and first-generation plants in Arinda and Sante cultivars using molecular markers. *Crop Biotechnology*, 15 (3), 1-12.
(DOI: [10.30473/cb.2026.75874.2019](https://doi.org/10.30473/cb.2026.75874.2019))

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effect of cryopreservation on the genetic and physiological stability of two potato cultivars (Arinda and Sante) at two developmental stages (regenerated plantlets and first-generation plants). Virus-free plantlets were first established under *in vitro* conditions and then subjected to two treatments: (1) *in vitro* maintenance and (2) cryopreservation using the encapsulation-dehydration technique. After recovery and multiplication, a subset of the samples was analyzed at the plantlet stage for molecular evaluation, while the remaining ones were transferred to the greenhouse to produce minitubers and subsequently assessed in the first generation. Following pot cultivation of the minitubers, samples were collected for molecular analyses. Genetic assessment was carried out using 15 pairs of microsatellite markers under a completely randomized design with three replications (10 plants per replicate) at both stages. The results showed no significant genetic variation between plantlets and first-generation plants derived from the two storage methods. Furthermore, physiological evaluations, including survival rate, vegetative growth, and minituber quality, revealed no meaningful differences between treatments. These findings demonstrate that cryopreservation not only maintains genetic fidelity but also does not adversely affect plant performance or reproductive capacity. Overall, the results confirm that cryopreservation using encapsulation-dehydration is a safe and reliable approach for the long-term conservation of potato germplasm without inducing detectable genetic or physiological alterations. This strategy may play a valuable role in breeding programs, germplasm banks, and the large-scale production of virus-free seed potatoes.

KEYWORDS

Cryopreservation, Potato, SSR Markers.



«مقاله پژوهشی»

ارزیابی تأثیر نگهداری انجماد فراسرد بر پایداری ژنتیکی گیاهچه‌ها و نسل اول گیاهان سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) در ارقام آريندا و سائنه با استفاده از نشانگرهای مولکولی

سیدعلی میربابائی^{۱*}، مرتضی سام‌دلیری^۱، رضا ضرغامی^۲، امیرعباس موسوی^۱، علی افتخاری^۱

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی تأثیر انجماد فراسرد بر ثبات ژنتیکی و فیزیولوژیکی دو رقم سیب‌زمینی (آريندا و سائنه) در دو مرحله رشد (گیاهچه‌های باززایی شده و گیاهان نسل اول) انجام شد. گیاهچه‌های عاری از ویروس ابتدا در شرایط درون شیشه تولید شدند و سپس تحت دو تیمار شامل (۱) نگهداری در شرایط درون شیشه‌ای و (۲) انجماد فراسرد به روش کپسوله سازی و دهیدراته سازی قرار گرفتند. پس از باززایی و تکثیر، بخشی از نمونه‌ها در مرحله گیاهچه برای ارزیابی مولکولی استفاده شدند و بخش دیگر به گلخانه انتقال یافتند تا مینی‌تیوبر تولید و در نسل اول مورد ارزیابی قرار گیرند. پس از کاشت مینی‌تیوبرها در قالب کشت گلدانی، نمونه‌برداری برای آزمایش‌های مولکولی انجام شد. تحلیل ژنتیکی با ۱۵ جفت نشانگر ریزماهواره و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (۱۰ گیاه در هر تکرار) در هر دو مرحله صورت گرفت. نتایج نشان داد که هیچ‌گونه تنوع ژنتیکی قابل‌توجهی میان گیاهچه‌ها و گیاهان نسل اول حاصل از دو روش نگهداری مشاهده نشد. همچنین ارزیابی‌های فیزیولوژیکی، از جمله درصد بقا، رشد رویشی و کیفیت مینی‌تیوبرها، تفاوت معنی‌داری را بین تیمارها نشان نداد. این یافته‌ها بیانگر آن است که روش انجماد فراسرد علاوه بر حفظ تنوع ژنتیکی، بر عملکرد و توان زایشی گیاهان نیز اثر منفی ندارد. در مجموع، نتایج تأیید می‌کنند که انجماد فراسرد با روش کپسوله سازی و دهیدراته سازی روشی ایمن و کارآمد برای نگهداری بلندمدت ژرمپلاسِم سیب‌زمینی است، بدون آن‌که تغییرات ژنتیکی یا فیزیولوژیکی قابل‌مشاهده‌ای ایجاد نماید. این موضوع می‌تواند نقش مهمی در برنامه‌های به‌نژادی، بانک‌های ژن و تولید بذر عاری از ویروس ایفا نماید.

واژه‌های کلیدی

انجماد فراسرد، سیب‌زمینی، نشانگر SSR.

۱. گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد چالوس، دانشگاه آزاد اسلامی، چالوس، ایران.
۲. بخش تحقیقات کشت بافت و سلول، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، ایران.

نویسنده مسئول:

سیدعلی میربابائی

رایانامه: mirbabaie56@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۰۱

استناد به این مقاله:

میربابائی، سیدعلی؛ سام‌دلیری، مرتضی؛ ضرغامی، رضا؛ موسوی، امیرعباس و افتخاری، علی (۱۴۰۴). ارزیابی تأثیر نگهداری انجماد فراسرد بر پایداری ژنتیکی گیاهچه‌ها و نسل اول گیاهان سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) در ارقام آريندا و سائنه با استفاده از نشانگرهای مولکولی، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۵ (۳)، ۱-۱۲.

(DOI: [10.30473/cb.2026.75874.2019](https://doi.org/10.30473/cb.2026.75874.2019))



مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) به‌عنوان یکی از سه محصول اساسی برتر جهان، نقشی کلیدی در امنیت غذایی جهانی و کاهش فقر ایفا می‌کند (Devaux *et al.*, 2014; Niino & Arizaga, 2015). این محصول با داشتن شاخص برداشت بالاتر نسبت به غلات، در سطحی معادل ۲۰,۷ میلیون هکتار در سراسر جهان کشت می‌شود و سالانه ۴۳۷ میلیون تن تولید دارد، یعنی به‌طور متوسط ۲۰,۹ تن در هکتار. این گیاه منبع قابل‌توجهی از ترکیبات مغذی نظیر کربوهیدرات، فیبر، ویتامین و مواد معدنی بوده و نقش مهمی در تأمین امنیت غذایی و تغذیه به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه ایفا می‌کند (Batoool *et al.*, 2020). با بیش از ۴۰۰۰ رقم کشت شده در سطح جهان، سیب‌زمینی به‌دلیل عملکرد بالا، یکنواختی اندازه غده‌ها و کاربرد گسترده در صنایع غذایی و دارویی، از ارزش اقتصادی و کشاورزی بالایی برخوردار است (Mushtaq & Alwutayd, 2025). سیب‌زمینی یکی از محصولات اساسی در تأمین امنیت غذایی به‌شمار می‌آید و به‌دلیل عملکرد بالا و ارزش تغذیه‌ای مطلوب، می‌تواند جایگزین مناسبی برای غلات باشد (Hu *et al.*, 2025). توسعه کشت این محصول، رویکردی پایدار و کارآمد برای مقابله با تهدید فزاینده گرسنگی پنهان در جهان به‌شمار می‌رود (Singh *et al.*, 2021). با توجه به پیش‌بینی رشد جمعیت جهانی، به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه، نقش سیب‌زمینی در تأمین امنیت غذایی بیش از پیش اهمیت می‌یابد (Devaux *et al.*, 2021).

مرکز بین‌المللی سیب‌زمینی^۱ در کشور پرو، مجموعه جهانی و امانی سیب‌زمینی‌های کشت شده را مدیریت می‌کند. ژرمپلاس^۲م این مجموعه بنا به درخواست مختلف جهت اهداف پژوهشی، اصلاح نژاد و آموزشی، تحت نظارت معاهده بین‌المللی منابع ژنتیکی گیاهی غذا و دارو^۳ توزیع می‌شود (FAO, 2009). تعداد ۴۳۸۸ نمونه

شناسنامه‌دار سیب‌زمینی در این مجموعه به صورت درون شیشه نگهداری می‌شوند تا پس از عاری‌سازی از ویروس‌ها، ژرمپلاس^۲م باقی بماند و بتواند بدون انتقال بیماری به سایر کشورها جابه‌جا شود (Vollmer *et al.*, 2017). اگرچه نگهداری *in vitro* (درون شیشه) از آلودگی جلوگیری می‌کند، اما حفظ چنین مجموعه بزرگی نیازمند منابع قابل توجه است. یکی از راهکارهای کاهش هزینه‌ها در عین حفظ ایمنی ژرمپلاس^۲م، پشتیبان‌گیری از مجموعه در یک بانک انجماد فراسرد^۴ است. در واقع، انجماد فراسرد^۴ می‌تواند روش اصلی نگهداری برای مواد ژنتیکی باشد که از نظر ژنتیکی منحصر به فردند اما به ندرت مورد نیاز قرار می‌گیرند. نوک شاخساره‌ها را می‌توان از حالت نگهداری در نیتروژن مایع خارج کرده و بازرایی نموده تا به گیاهچه تبدیل شوند و در صورت نیاز برای پژوهش یا توزیع مورد استفاده قرار گیرند.

در دو دهه گذشته، دستورالعمل انجماد فراسرد برای ده‌ها نوع محصول توسعه یافته و بسیاری از مؤسسات پژوهشی ژنتیک گیاهی دارای بانک‌های انجماد فراسرد هستند که صدها تا هزاران شناسنامه را حفظ می‌کنند (Pritchard, 2016). انجماد فراسرد یکی از روش‌های مهم و کاربردی برای نگهداری بلندمدت منابع ژنتیکی سیب‌زمینی است. این روش نسبت به نگهداری در مزرعه یا کشت درون شیشه، نیاز به فضای کمتر و هزینه پایین‌تری دارد و همچنین خطر آلودگی یا بروز تغییرات ژنتیکی را کاهش می‌دهد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که گیاهان سیب‌زمینی بازرایی‌شده پس از انجماد فراسرد معمولاً ثبات ژنتیکی خود را حفظ می‌کنند. بنابراین، انجماد فراسرد می‌تواند به‌عنوان روشی مطمئن و مکمل سایر روش‌های ذخیره‌سازی، نقش مهمی در حفاظت ژنوتیپ‌ها، گونه‌های وحشی و دسترسی‌های ارزشمند ایفا کند (Niino & Arizaga, 2015). گیاهانی مانند گلدن پینت‌براش (*Castilleja levisecta* Greenm.) (Salama *et al.*, 2018)، توس سیاه گیلای (*Betula*

3. Cryobank
4. Cryopreservation

1. International Potato Center
2. International Treaty for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture

lenta L. (Rathwell et al., 2016) و گونه به شدت در معرض خطر اندروکالوا مرواریدی (*Androcalva perlaria* Wilk.) (Whiteley et al., 2016) همگی از طریق ذخیره سازی انجمادی دوباره به زیستگاه های طبیعی خود بازگردانده شده اند.

نشانگرهای ریزماهوره^۵ یا توالی های تکراری ساده^۶ (SSR) واحدهای تکراری دو تا شش تایی از نوکلئوتیدها هستند که در ژنوم بیشتر یوکاریوت ها پراکنده هستند (Zane et al., 2002). این توالی های تکراری در سراسر ژنوم یوکاریوت ها پخش شده اند و بر اساس یک سیستم نشانگر ژنتیکی مبتنی بر واکنش های زنجیره ای پلیمراز^۷ (PCR) چند آلی و هم بارز هستند. معمولاً نواحی کناری ریزماهوره ها در بین گونه های مختلف به صورت حفاظت شده باقی مانده اند. به دلیل توانایی بالای این نشانگر در نشان دادن چند شکلی، توارث هم بارز و فراوانی نسبی در ژنوم از این نشانگر جهت تجزیه و تحلیل های ژنتیکی استفاده می شود (Su et al., 2025). بررسی ها نشان داده اند که هرچند این مارکرها تنها بخش بسیار کوچکی از ژنوم را ارزیابی می کنند، اما برای سنجش ثبات کافی هستند (Harding, 2004). همچنین مطالعات متعددی روی گیاهان مختلف از جمله سیب زمینی (Zarghami et al., 2008)، انجام شده که همگی نشان دهنده ی حفظ ثبات ژنتیکی پس از انجماد فراسرد بوده اند.

از این رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر انجماد فراسرد به روش کپسوله-دهیدراته بر پایداری ژنتیکی گیاهچه ها و گیاهان نسل اول دو رقم سیب زمینی آریندا و سانته طراحی و اجرا شد تا کارایی این روش به عنوان رویکردی مؤثر در حفظ بلندمدت ژرم پلاسما ارزیابی شود.

روش شناسی پژوهش

تولید گیاهچه های عاری از ویروس

در این پژوهش، از دو رقم سیب زمینی آریندا و سانته، تهیه شده از پژوهشکده بیوتکنولوژی متابولیت های ثانویه (اصفهان) استفاده شد. به منظور اطمینان از عاری بودن

گیاهان از ویروس پیش از انجام ریزازدیادی، ابتدا گلدان های حاوی این ارقام به مدت پنج هفته در فیتوترون با شرایط دمایی ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی ۶۰ تا ۶۵ درصد و شدت نور ۲۰۰۰ لوکس قرار گرفتند. آبیاری در این مدت برحسب نیاز انجام شد. سپس میزبم ها در سن سه تا پنج هفتگی به اندازه ۰/۳ تا ۰/۵ میلیمتر جدا سازی و در محیط کشت پایه مورا شینگ و اسکوگ^۸ حاوی اکسین نفتالین استیک اسید NAA (۰/۱ میلی گرم بر لیتر)، ژیرلین (۰/۲ میلی گرم بر لیتر) و کینتین (۰/۱ میلی گرم بر لیتر) کشت داده شدند. پس از رشد گیاهچه ها، آزمون ELISA برای اطمینان از ویروس زدایی کامل نمونه ها انجام گرفت. در ادامه از ساقه های عاری از ویروس، قطعه های تک گره ای جدا شده و در محیط جامد مورا شینگ و اسکوک بدون هورمون با ترکیب ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۴ گرم بر لیتر آگار و pH برابر ۵/۷ کشت شدند. نمونه های کشت شده به مدت ۳۰ روز در اتاق رشد با دمای ۲۳ تا ۲۴ درجه سانتی گراد، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۲۰۰۰ لوکس نگهداری شدند.

اعمال تیمارهای نگهداری بلندمدت

برای اعمال تیمار انجماد فراسرد، گیاهچه های رشد یافته پس از پنج هفته به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد پیش سرد شدند. سپس از قطعات نوک ساقه نمونه برداری انجام شد. فرایند انجماد فراسرد بر اساس روش ضرغامی و همکاران (۲۰۰۸)، به روش کپسوله سازی و دهیدراته سازی انجام شد (Zarghami et al., 2008). در این روش، قطعات نوک ساقه در محلول آلزینات سدیم ۳ درصد (وزنی/حجمی) حاوی یون Ca^{2+} ۲۰ میلی مولار کپسوله شد، در این روش از محلول کلسیم با غلظت ۲۰ میلی مولار استفاده شد تا جابجایی یون سدیم با کلسیم در آلزینات سدیم اتفاق افتاده و کپسول تشکیل شود. در ادامه محتویات گیاهی به مدت ۳ روز در محیط پیش کشت حاوی ترکیب غلظت های مختلف ساکارز (۰/۲۵ تا ۱

7. Polymerase Chain Reaction
8. Murashige and Skoog (MS) medium

5. Microsatellite
6. Simple Sequence Repeats

بود. آبیاری برحسب نیاز و تغذیه گیاهان با کود NPK (فرمول ۲۰-۲۰-۲۰، برند ETNAFERT) انجام شد. پس از ۱۲۰ روز رشد، مینی تیوبرهای تشکیل شده از هر گیاه برداشت گردید. این مینی تیوبرها برای طی دوره خواب به اتاقک رشد با دمای 24 ± 1 درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی 85 ± 5 درصد و تاریکی به مدت دو تا سه ماه منتقل شدند. پس از جوانه زنی و رسیدن طول جوانه ها به ۱ سانتی متر، مینی تیوبرهای جوانه زده در گلدان کاشته شدند تا گیاهان نسل اول تولید شوند. در مرحله ۸ برگی، نمونه برداری از برگ گیاهان انجام و نمونه ها تا زمان انجام ارزیابی های ژنتیکی و فیزیولوژیکی در فریزر -۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. این آزمایش با گیاهان حاصل از هر دو روش نگهداری (انجماد فراسرد و کشت درون شیشه ای) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (هر تکرار شامل ۱۰ گیاه) برای هر رقم انجام شد.

ارزیابی ثبات ژنتیکی گیاهچه ها و گیاهان نسل اول
پس از پودر کردن برگ های گیاهچه ها و گیاهان نسل اول در نیتروژن مایع با استفاده از هاون چینی، بافت های پودر شده برگ ۱۰ گیاه در هر تکرار (برای هر روش نگهداری یعنی گیاهان شاهد، گیاهچه های حاصل از انجماد فراسرد و گیاهان نسل اول) با هم مخلوط شدند تا نمونه نماینده هر تکرار برای استخراج DNA آماده شود. برای استخراج، ۱۰۰ میلی گرم از بافت انتخاب و روش CTAB به کار گرفته شد (Borges et al., 2019). ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ (Thermo Nanodrop 2000C) و الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد در حضور نردبان مولکولی ۱۰۰۰ باز انجام شد. پس از تأیید کیفیت، DNA نمونه ها برای واکنش PCR با آغازگرهای SSR مورد استفاده قرار گرفتند تا ثبات ژنتیکی در گیاهچه ها و گیاهان نسل اول به صورت هم زمان ارزیابی شود PCR با استفاده از ۱۵ جفت آغازگر SSR انجام شد (جدول ۱). غلظت اولیه DNA های استخراج شده در بازه ۷۵۳ تا ۴۳۴۶ نانوگرم در ماکرولیتر بود که همگی تا غلظت نهایی ۵۰ نانوگرم در ماکرولیتر رقیق شدند. ترکیب واکنش PCR

مولار) قرار گرفتند. سپس دانه های آلژینات به مدت ۲ تا ۴ ساعت در محیط کشت استریل و تحت جریان هوای استریل زیر هود و دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد خشک شدند. پس از این مرحله، دانه های آلژینات حاوی قطعات نوک ساقه به تیوب های استریل ۲ میلی لیتری منتقل و به مدت ۳ ماه در نیتروژن مایع نگهداری شدند. برای بازیابی، تیوب ها به حمام آب ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل و سپس در محیط کشت مناسب قرار گرفتند. تیمار شاهد شامل کشت قطعات نوک ساقه در شرایط درون شیشه بدون نگهداری فراسرد بود. در طی این دوره، ریزنمونه ها هر ۲۸ روز به تعداد سه بار واکنش شدند تا گیاهچه ها در شرایط درون شیشه ای تکثیر یابند. آزمایش با دو رقم سیب زمینی (آریندا و ساتنه)، در دو روش نگهداری (فراسرد و درون شیشه) و با سه تکرار (هر تکرار شامل ۲۰ ریزنمونه) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. رشد ریزنمونه ها به مدت ۸ هفته ادامه یافت. در پایان دوره، از برگ ۱۰ گیاهچه حاصل از بازیابی با روش فراسرد نمونه برداری شد و نمونه ها تا زمان استخراج DNA در فریزر -۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. همچنین ۱۰ گیاهچه دیگر از هر تکرار برای تولید نسل اول به گلخانه منتقل شدند. استخراج DNA برای هر دو مرحله (گیاهچه و نسل اول) به طور هم زمان انجام شد.

تولید گیاهان نسل اول

تعداد ۱۰ گیاهچه حاصل از هر تکرار در مرحله قبل، به منظور تولید گیاهان نسل اول، به گلخانه منتقل شدند. ابتدا گیاهچه ها در سینی های نشایی حاوی مخلوط پیت و پرلیت با نسبت ۱:۱ کشت شدند. برای سازگاری تدریجی با شرایط محیطی و جلوگیری از تنش رطوبتی، به مدت ۵ روز اولیه رشد، با پوشش پلاستیکی شفاف پوشانده شدند و این پوشش به تدریج برداشته شد. پس از گذشت ۴۰ روز، گیاهچه ها به گلدان های حاوی همان بستر کشت (پیت و پرلیت) منتقل شدند. شرایط رشد در گلخانه شامل دمای ۲۳ تا ۲۴ درجه سانتی گراد، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۲۰۰۰ لوکس

آنالیز داده‌ها

اگرچه مارکرهای SSR از نوع هم‌بارز (Codominant) هستند و امکان تشخیص آلل‌های هتروزیگوت و هموزیگوت را فراهم می‌کنند، با توجه به اینکه هدف پژوهش حاضر ژنوتایپ کردن یا تحلیل ساختار آللی نبوده بلکه صرفاً بررسی وجود یا عدم وجود هرگونه تغییر ژنتیکی در نمونه‌های حاصل از انجماد فراسرد و گیاهان نسل اول حاصل از انجماد در مقایسه با تیمار شاهد بود، روش استاندارد و رایج در چنین مطالعاتی کدگذاری دودویی (۱=حضور باند، ۰=عدم حضور باند) است. این روش در بسیاری از پژوهش‌های مشابه که از SSR برای ارزیابی ثبات ژنتیکی پس از انجماد فراسرد استفاده کرده‌اند نیز به کار رفته است (Li et al., 2017; Agrawal et al., 2014; Vidyagina et al., 2021). علاوه بر این، کدگذاری دودویی خطر تفسیرهای اشتباه ناشی از هم‌پوشانی باندها یا اختلافات بسیار جزئی آللی در ژل پلی‌اکریل‌آمید را کاهش می‌دهد و تمرکز تحلیل را بر پایداری یا تغییر احتمالی باندها قرار می‌دهد. بنابراین الگوهای باندی حاصل از ژل، براساس حضور (۱) یا عدم حضور (۰) باند در هر موقعیت، به صورت داده‌های دودویی (binary) کدگذاری و امتیازدهی شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GenAIEx نسخه ۶.۵ (Peakall & Smouse, 2006) انجام شد.

حجم نهایی ۱۵ ماکرولیتر شامل اجزای زیر بود: ۰/۲۵ ماکرولیتر آنزیم SmarTaq DNA Polymerase (با غلظت ۵ واحد بر میکرولیتر)، ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X (pH 8.4) شامل 500mM KCl, 500mM Tris-HCl 200mM (Ammunium sulfate)، ۰/۵ ماکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۵ ماکرولیتر dNTPs با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۷ ماکرولیتر آغازگر، ۲ ماکرولیتر DNA الگو با غلظت تقریبی ۲۵ نانوگرم بر ماکرولیتر و ۹/۸ ماکرولیتر آب دیوار تقطیر (ddH_2O) برای رساندن حجم نهایی واکنش به ۱۵ ماکرولیتر. برنامه دمایی PCR شامل یک مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه بود. سپس، چرخه اصلی PCR در ۳۵ چرخه به صورت زیر انجام شد: دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها^۱ در دمای اختصاصی برای هر جفت آغازگر (جدول ۱) به مدت ۱ دقیقه و مرحله طولیل سازی^۲ در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه. پس از اتمام چرخه‌ها، یک مرحله نهایی طولیل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه اجرا شد و در نهایت، محصول واکنش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا برای مراحل بعدی آماده گردد. محصولات واکنش PCR بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد همراه با ردبان مولکولی در محدوده ۱۰۰-۱۰۰۰ جفت‌باز الکتروفورز شدند.

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای SSR مورد استفاده جهت سنجش ثبات ژنتیکی دو رقم سیب‌زمینی آریندا و سانت

Table 1. Characteristics of SSR primers used for assessing the genetic stability of two potato cultivars, Arinda and Santé

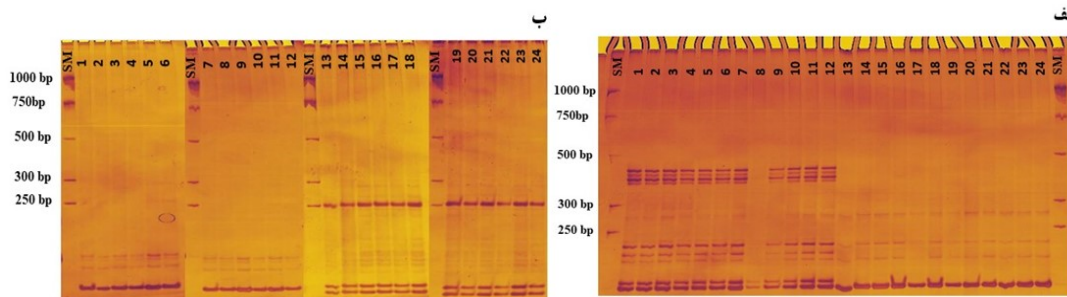
نام آغازگر	توالی آغازگر (5' to 3')	دمای اتصال (°C)	نام آغازگر	توالی آغازگر (5' to 3')	دمای اتصال (°C)
12002-F	CCATGAACCTGAAGTTTTCTGC	59	STM0019a-b-F	AATAGGTGTACTGACTCTCAATG	58
12002-R	TGGATATCTGTGCCTACAAGCTAG	59	STM0019a-b-R	TTGAAGTAAAAAGTCCTAGTATGTG	58
31924-F	CGAAGACACCAATCGCTCAG	55	STM0031-F	CATACGCACGCACGTACAC	58
31924-R	GAAACGCCATTAACATTTTACATCG	55	STM0031-R	TTCAACCTATCATTTTGTGAGTCG	58
4026/4027-F	AACTTGCGGGAATAAGTGACG	58	STM1104-F	TGATTCTCTTGCCCTACTGTAATCG	59
4026/4027-R	ACTATACACACGTGCCTGAAACTAG	58	STM1104-R	CAAAGTGGTGTGAAGCTGTGA	59
43016-F	CAAGCTGCATGAAAGCCATC	55	STM1106-F	TCCAGCTGATTGGTTAGGTG	58
43016-R	TTTGCTAAAAGTTTGTAGTGTGAGG	55	STM1106-R	ATGCCGAATCTACTCGTCATGG	58
46514-F	TGCTTTTGTTCCTTTTGTGTG	55	STM5114-F	AATGGCTCTCTCTGTATGCT	57
46514-R	GGAATGAACTAAGCCTTGCTCTG	55	STM5114-R	GCTGTCCCAACTATCTTTGA	58
STG0025-F	TGGAATCCGAATTACGCTCT	58	STM5121-F	CACCGGAATAAGCGGATCT	58
STG0025-R	AGGTTTACCACTCGGGCTT	58	STM5121-R	TCTTCCCTTCAATTGTCA	58
STI0004-F	GCTGCTAAACACTCAAGCAGAA	59	STM5127-F	TTCAAGAATAGGCAAAACCA	58
STI0004-R	CAACTACAAGATTCCATCCACAG	59	STM5127-R	CTTTTCTGACTGAGTTGCCCTC	58
STI0014-F	AGAACTGAGTTGTGTTGGGA	58			
STI0014-R	TCAACAGTCTCAGAAAACCTCT	58			

1. Annealing
2. Extension

می‌دهد. همان طور که در شکل نشان داده شده است دو گروه نمونه‌ها از نظر الگوی بانندی کاملاً یکسان هستند. جهت اطمینان از عدم تأثیر تغییرات ژنتیکی حاصل از محیط کشت بر روی نمونه‌ها ذکر این نکته حائز اهمیت است که از عوامل مهمی که در کشت بافت باعث تغییرات ژنتیکی می‌شود می‌توان دو عامل را نام برد که عبارتند از تولید گیاهچه از کالوس و تعداد ساب کالچرهای بیش از ۷ تا ۱۰ بار که در این تحقیق هیچ کدام از این دو عامل را نداشتیم چون از شوت تیپ استفاده گردید و همچنین تعداد ساب کالچر زیر ۷ بوده است. در سال‌های اخیر، روش انجماد فرا سرد به عنوان یکی از تکنیک‌های مؤثر و قابل اعتماد برای نگهداری بلندمدت منابع ژنتیکی، چه در بانک‌های ژرم پلاسما و چه در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی، به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است. یکی از رایج‌ترین شیوه‌های بازیابی نمونه‌ها پس از انجماد، کشت بافت در شرایط کنترل شده است؛ روشی که با روند بازیابی گیاهان از انجماد فراسرد تداخلی ندارد و در بسیاری از گونه‌های گیاهی موفقیت‌آمیز گزارش شده است.

نتایج و بحث

ارز یابی کیفی و کمی DNA های استخراج شده از گیاهچه‌ها و گیاهان نسل اول حاصل از نگهداری فراسرد، نشان‌دهنده کیفیت مناسب نمونه‌ها برای ادامه مراحل واکنش PCR بود و بیانگر اثربخشی پروتکل استخراج مورد استفاده است. برای بررسی تغییرات احتمالی ژنتیکی ناشی از نگهداری فراسرد، از ۱۵ جفت نشانگر SSR در دو رقم سیب‌زمینی آریندا و سانته در سه تکرار استفاده شد. این نشانگرها در مجموع ۱۴۰ مکان ژنی را در محدوده ۱۳۰ الی ۴۵۰ جفت باز پوشش دادند. نتایج ارزیابی ثبات ژنتیکی در هر دو مرحله (گیاهچه‌ها و گیاهان نسل اول) نشان داد که بین نمونه‌های حاصل از انجماد فراسرد و نمونه‌های نگهداری شده در شرایط درون‌شیشه‌ای، تفاوت ژنتیکی قابل اندازه‌گیری وجود نداشته و هر دو گروه از نظر الگوهای بانندی کاملاً مشابه بودند. این نتایج بیانگر حفظ ثبات ژنتیکی در شرایط نگهداری فراسرد است. شکل (۱)، الگوهای باند حاصل از تکثیر با دو مارکر STI0014 و STM1104 را نشان



شکل ۱. الگوهای بانندی نشانگر SSR در دو رقم سیب‌زمینی (آریندا و سانته) تکثیر شده با آغازگر STI0014 (الف) و STM1104 (ب) روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۰ درصد. SM: نردبان مولکولی، ترتیب نمونه‌ها عبارتند از: شماره ۱-۳: ریزنمونه‌های سانته (نگهداری غیر فراسرد)، شماره ۴-۶: ریزنمونه‌های سانته (نگهداری فراسرد)، شماره ۷-۹: گیاهان نسل اول سانته (نگهداری غیر فراسرد)، شماره ۱۰-۱۲: گیاهان نسل اول سانته (نگهداری فراسرد)، شماره ۱۳-۱۵: ریزنمونه‌های آریندا (نگهداری غیر فراسرد)، شماره ۱۶-۱۸: ریزنمونه‌های آریندا (نگهداری فراسرد)، شماره ۱۹-۲۱: گیاهان نسل اول آریندا (نگهداری غیر فراسرد) و شماره ۲۲-۲۴: گیاهان نسل اول آریندا (نگهداری فراسرد)، همان‌طور که در شکل مشخص است باندهای حاصله کاملاً مشابه هستند.

Figure 1. Banding patterns of SSR markers in two potato cultivars (Arinda and Santé) amplified with primers STI0014 (a) and STM1104 (b) on 10% polyacrylamide gel. SM: DNA ladder. The order of samples is as follows: 1-3: Sante explants (non-cryopreserved), 4-6: Sante explants (cryopreserved), 7-9: Sante first-generation plants (non-cryopreserved), 10-12: Sante first-generation plants (cryopreserved), 13-15: Arinda explants (non-cryopreserved), 16-18: Arinda explants (cryopreserved), 19-21: Arinda first-generation plants (non-cryopreserved), and 22-24: Arinda first-generation plants (cryopreserved). As shown in the figure, the resulting bands are completely identical.

تنظیم کننده تنش دمای الگوهای متیلاسیون قابل برگشت داشته‌اند و هیچ‌گونه اختلالی در مسیرهای اصلی متابولیسم ایجاد نشد.

همچنین مطالعات جدید روی گیاهان دارویی که نیاز به حفظ دقیق ژنوم دارند نیز بر لزوم ارزیابی همزمان ثبات ژنتیکی و اپیژنتیکی تأکید کرده‌اند. نتایج نشان داد که پروتکل‌های بهینه کرایوپریزرویشن در این گیاهان موجب حفظ کامل ژنوم و ایجاد حداقل تغییر اپیژنتیک موقتی می‌شود (Tripathi et al., 2023).

افزون بر این شواهد جدید بر پایه نشانگرهای مولکولی نیز همچنان ثبات ژنتیکی را تأیید می‌کنند. به‌عنوان نمونه، در مطالعه اخیر بر روی گونه‌های زینتی لیلیوم، آنالیز ISSR هیچ‌گونه پلی‌مورفیسم قابل توجهی میان گیاهان شاهد و نمونه‌های انجماد شده گزارش نکرد و ژنوم کاملاً پایدار باقی ماند (Sharma et al., 2022).

این یافته‌ها با نتایج مطالعات پیشین هم‌راستا هستند؛ به‌عنوان مثال، Zarghami et al. (2008) با استفاده از نشانگر AFLP و Li et al. (2017) با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD گزارشی از بروز تنوع ژنتیکی در سیب‌زمینی ارائه نکردند. مطالعات مشابه در سایر گونه‌ها نیز همین الگو را نشان داده‌اند؛ از جمله گیاه پاپولوس با نشانگر SSR (Vidyagina et al., 2021)، برنج با نشانگر RAPD (Yi et al., 2015)، گل داوودی با RAPD (Kulus et al., 2019) و سیاه با نشانگر AFLP (Agrawal et al., 2014) و توت سیاه با نشانگر AFLP (Castillo et al., 2010). همچنین نتایج پژوهش‌های مختلف بر روی سیب‌زمینی نیز نشان‌دهنده حفظ کامل شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های انجماد یافته و شاهد است (Harding, 1991; Ward et al., 1993; Benson et al., 1996; Schafer Menuher et al., 1996; Harding & Benson, 2000).

با سو و همکاران (۲۰۲۵) یک مطالعه با هدف بررسی اثر انجماد فراسرد بر بیان ژن در غده‌های سیب‌زمینی و امکان سنجی آن برای حفاظت ژرمپلاسم انجام دادند. در این پژوهش غده‌های سیب‌زمینی پس از انجماد فراسرد باززایی شدند و با استفاده از آنالیز ترنسکرپتوم ژن‌های

در این مطالعه نیز از روش کیسوله‌سازی و دهیدراته‌سازی نوک ساقه‌ها و سپس انجماد در نیتروژن مایع استفاده شد که پیش‌تر در گیاهانی مانند *Solanum tuberosum* (Uchendu et al., 2016)، *Malus domestica* (Li et al., 2015)، *Dianthus caryophyllus* (Bi et al., 2015)، *Rubus ulmifolius* (Matsumoto, 2017)، *Helianthus tuberosus* (Zhang et al., 2017) و *Lilium sp.* (Bi et al., 2016) نیز به‌کار رفته است.

اگرچه انجماد فراسرد ممکن است باعث ایجاد تنش‌های فیزیکی، شیمیایی و فیزیولوژیکی شود، اما تاکنون شواهدی مبنی بر تأثیر منفی پایدار این روش بر ژنوم گیاهان گزارش نشده است. از سوی دیگر، تمامی پلی‌مورفیسم‌های مشاهده‌شده را نمی‌توان مستقیماً ناشی از اثرات انجماد دانست. با توجه به اهمیت حفظ شباهت کامل گیاهان حاصل از انجماد با والدین اولیه، ارزیابی ثبات ژنتیکی با رویکردهای مولکولی همواره ضروری است.

در مطالعه حاضر، با استفاده از ۱۵ جفت مارکر SSR، ثبات ژنتیکی گیاهچه‌ها و گیاهان نسل اول حاصل از دو روش نگهداری (فراسرد و درون‌شیشه‌ای) در دو رقم سیب‌زمینی آریندا و سائنه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نمونه‌های حاصل از هر دو روش، الگوی بانندی مشابهی داشته و هیچ‌گونه چندشکلی ژنتیکی مشاهده نگردید.

مطالعات جدید نشان می‌دهند که فرایند کرایوپریزرویشن ممکن است در مراحل مختلف سبب ایجاد تغییرات اپیژنتیکی گذرا مانند تغییر در الگوی متیلاسیون DNA شود، اما این تغییرات معمولاً پایدار نبوده و پس از دوره بازیابی، به حالت طبیعی برگشته و تأثیری بر ساختار ژنومی نمی‌گذارند (Huang et al., 2025).

مطالعات ژنومی و اپیژنتیکی جدیدتر در گیاهان مورد استفاده در کشاورزی نیز یافته‌های مشابهی را گزارش کرده‌اند. به‌عنوان مثال، بررسی ترنسکرپتومی مقاومت به سرما در کاساوا نشان داد که تغییرات متیلاسیون DNA بیشتر بخشی از پاسخ تنظیمی گیاه به تنش بوده و ناشی از جهش ژنتیکی دائمی نیست (Zhao et al., 2024). این پژوهش نشان داد که ژن‌های

گیاهچه و نسل اول بود. بر این اساس، روش انجماد فراسرد را می‌توان به‌عنوان یک تکنیک مؤثر، قابل‌اعتماد و بدون القای تغییرات ژنتیکی، برای نگهداری بلندمدت ژرم‌پلاسما سیب‌زمینی پیشنهاد کرد.

افزون بر این یافته‌های این مطالعه نشان داد که فرایند انجماد فراسرد مبتنی بر روش کپسوله‌سازی-دهیدراته سازی توانست ریزنمونه‌ها، گیاهچه‌ها و گیاهان نسل اول دو رقم سیب‌زمینی آریندا و سانتا را بدون ایجاد هرگونه تغییر در ساختار ژنتیکی حفظ کند. بررسی‌های مولکولی با استفاده از نشانگرهای SSR که از قدرتمندترین ابزارهای تشخیص تغییرات ژنتیکی در سیب‌زمینی به‌شمار می‌روند، ثابت کامل الگوهای بانندی در نمونه‌های فراسرد و عدم ظهور باندهای پلی‌مورفیک را تأیید کرد. این موضوع نشان می‌دهد که مراحل مختلف فرایند انجماد-از دهیدراتاسیون و انتقال اسمزی تا انجماد در نیتروژن مایع و باززنده‌سازی-هیچ‌گونه تنش ژنتیکی یا جهش قابل‌تشخیص در بافت‌های مورد بررسی ایجاد نکرده است.

اهمیت این یافته‌ها زمانی برجسته‌تر می‌شود که به ویژگی‌های زیستی سیب‌زمینی توجه کنیم. سیب‌زمینی در میان گیاهان چندساله و تکثیرشونده به‌وسیله اندام‌های رویشی، دارای هتروزیگوسیتی بسیار بالا، حساسیت به تنش‌های فیزیولوژیک و استعداد بروز تغییرات ژنتیکی تحت شرایط کشت ممتد درون‌شیشه‌ای است. کشت‌های طولانی‌مدت درون‌شیشه‌ای می‌توانند به تدریج منجر به انباشت تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی، کاهش قدرت رویشی و افت کیفیت ژرم‌پلاسما شوند. اما نتایج این تحقیق نشان داد که انجماد فراسرد می‌تواند با حذف این مخاطرات و ایجاد شرایط کاملاً پایدار، امکان حفظ ژرم‌پلاسما سیب‌زمینی بدون هیچ‌گونه انحراف ژنتیکی را فراهم آورد.

بنابراین، روش کپسوله‌سازی-دهیدراته‌سازی در انجماد فراسرد را می‌توان به‌عنوان یک تکنیک ایمن، مؤثر، استاندارد و سازگار با نیازهای زیستی سیب‌زمینی معرفی کرد؛ روشی که نه تنها بقا و باززنده سازی نمونه‌ها را با موفقیت تضمین می‌کند، بلکه ساختار ژنتیکی ارقام مورد مطالعه را نیز به‌طور کامل حفظ می‌نماید. این

متفاوت بیان شده (DEGs) شناسایی شدند. نتایج نشان داد که اگرچه تعداد زیادی ژن در مراحل مختلف تحت تأثیر قرار گرفته‌اند (۷۹۸، ۵۹۲، ۹۲۳ و ۱۰۳۵ ژن)، اما ژن‌های ضروری برای رشد و نمو طبیعی، از جمله چرخه اسید سیتریک، طولیل شدن سلول، جوانه‌زنی بذر و گل‌دهی، تغییر قابل توجهی نداشتند. بیشترین تغییر بیان مربوط به ژن‌های مرتبط با فتوسنتز و پاسخ به تنش‌های غیرزیستی بود. انجماد فراسرد تأثیر منفی بر ژن‌های کلیدی رشد غده سیب‌زمینی ندارد و می‌تواند به‌عنوان روشی ایمن و کارآمد برای حفاظت ژرم‌پلاسما و توسعه راهبردهای پایدار در تولید سیب‌زمینی و امنیت غذایی به‌کار گرفته شود (Basu et al., 2025).

گزارش‌هایی مانند مطالعه کاچمارچیک و همکاران (۲۰۱۱) نشان می‌دهد که نگهداری فراسرد در سیب‌زمینی تأثیری بر بازیابی، رشد یا ساختار ژنوم نداشته است. همچنین، مطالعات متعددی بر عدم ایجاد تنوع سوماکلونال پس از انجماد با استفاده از نشانگرهای مولکولی RFLP، فلوسایتومتری و آنالیزهای مورفولوژیک تأکید کرده‌اند (Mix-Wagner et al., 2003). پژوهش‌های مشابهی در سیر (Liu et al., 2017) و عناب (Ibáñez et al., 2019) نیز موید این موضوع هستند. اگرچه تغییرات اپی‌ژنتیک گذرا مانند متیلاسیون در برخی نمونه‌ها گزارش شده‌اند، اما پس از بازیابی، وضعیت متیلاسیون به حالت اولیه بازگشته است. به‌طور کلی، اگرچه اکثر مطالعات بر ثبات ژنتیکی تأکید دارند، اما به دلیل واکنش‌های متفاوت گونه‌ها، بررسی مجدد و مستقل در هر پژوهش ضروری است.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد که نگهداری گیاهچه‌ها و گیاهان نسل اول دو رقم سیب‌زمینی آریندا و سانتا با روش انجماد فراسرد (کپسوله‌سازی و دهیدراته‌سازی) هیچ‌گونه تغییری در ساختار ژنتیکی نمونه‌ها نسبت به شرایط کشت درون‌شیشه‌ای ایجاد نخواهد کرد. ارزیابی‌های ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای SSR بیانگر عدم بروز باندهای پلی‌مورفیک و حفظ کامل ثبات ژنتیکی در هر دو سطح

تأثیری بر ثبات ژنتیکی مواد گیاهی داشته باشد. این دستاورد، پایه‌ای علمی و تجربی برای توسعه و استقرار نظام‌های ذخیره‌سازی مطمئن ژرمپلاسِم سیب‌زمینی در مقیاس ملی و بین‌المللی فراهم می‌سازد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

ویژگی، انجماد فراسرد را به یکی از بهترین رویکردهای موجود برای حفاظت بلندمدت ژرمپلاسِم سیب‌زمینی، چه در سطح بانک‌های ژن و چه در برنامه‌های به‌نژادی، تبدیل می‌کند.

به‌طور کلی، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که انجماد فراسرد مبتنی بر کپسوله‌سازی-دهیدراته‌سازی می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی قابل‌اعتماد در حفاظت بلندمدت ارقام سیب‌زمینی مورد استفاده قرار گیرد، بدون آنکه کوچک‌ترین

References

- Devaux, A., Goffart, J. P., Kromann, P., Andrade-Piedra, J., Polar, V., Hareau, G., & Thiele, G. (2014). Potato for food security and poverty alleviation. *Potato Research*, 57(3-4), 185-199. <https://doi.org/10.1007/s11540-021-09501-4>
- Agrawal, A., Sharma, S., & Ghosh, S. (2014). Genetic fidelity assessment of banana shoot tips cryopreserved by encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118(2), 243-251. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9606-4>
- Basu, T., Singh, A., G. V., Patil, V. U., Tiwari, J. K., Gujjar, R. S., & Upadhyay, A. K. (2025). Comparative Transcriptome Analysis of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Tubers at Different Developmental Stages of the Cryopreserved Germplasm. *Potato Research*, 1-19. <https://doi.org/10.1007/s11540-024-09843-9>
- Batool, T., Ali, S., Seleiman, M. F., Naveed, N. H., Ali, A., Ahmed, K., ... & Mubushar, M. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato i response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities. *Scientific Reports*, 10(1), 16975. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73489-z>
- Benson, E. E., Harding, K., & Smith, R. (1996). The use of molecular markers to assess the genetic stability of cryopreserved potato. *Euphytica*, 90(2), 241-247. http://www.actahort.org/books/908/908_52.htm
- Bi, W., Liu, C., & Chen, J. (2015). Cryopreservation and genetic stability of *Dianthus caryophyllus* shoot tips. *Scientia Horticulturae*, 197, 434-439.
- Bi, W., Wang, Q., & Wang, J. (2016). Cryopreservation of *Lilium* shoot tips by vitrification method. *Acta Horticulturae*, 1113, 149-154.
- Borges, A., Rosa, M. S., Recchia, G. H., Queiroz-Silva, J. R. D., Bressan, E. D. A., & Veasey, E. A. (2009). CTAB methods for DNA extraction of sweetpotato for microsatellite analysis. *Scientia Agricola*, 66, 529-534. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162009000400015>
- Castillo, R., & Pliego-Alfaro, F. (2010). AFLP analysis of blackberry shoot tips cryopreserved by encapsulation-dehydration. *Biotechnology Letters*, 32(5), 657-662. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9265-z>
- Devaux, A., Goffart, J. P., Kromann, P., Andrade-Piedra, J., Polar, V., & Hareau, G. (2021). The potato of the future: opportunities and challenges in sustainable agri-food systems. *Potato Research*, 64(4), 681-720. doi: 10.1007/s11540-021-09501-4
- Harding, K. (1991). Genetic stability of cryopreserved potato shoot tips. *CryoLetters*, 12(3), 163-170. <https://doi.org/10.1007/BF00025226>
- Harding, K., & Benson, E. E. (2000). Long-term cryopreservation of potato germplasm: morphological and molecular assessment. *CryoLetters*, 21(5), 285-292.
- Hu, X. Y., Jiang, H., Liu, Z. X., Gao, M. J., Liu, G., Tian, S. L., et al. (2025). The global potato-processing industry: A review of production, products, quality and sustainability. *Foods*, 14(10), 1758. <https://doi.org/10.3390/foods14101758>
- Huang, X., Zhan, J., Wei, H., Lou, S., Bian, H., Wang, J., & Han, N. (2025). Dynamic changes in DNA methylation play a regulatory role in gene expression during the formation of callus from immature barley embryos. *BMC Plant Biology*, 25(1), 515. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06527-5>
- Ibáñez, M. A., & Martín, C. (2019). Genetic and epigenetic assessment of mint after cryopreservation. *Plant Cell Reports*, 38(8), 959-970. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.08.026>

- Kaczmarczyk, A., & Lynch, P. T. (2011). Cryopreservation of potato shoot tips and evaluation of genetic stability. *Plant Cell Reports*, 30(9), 1741-1750. <https://urn.fi/URN:NBN:fi-fe201706277491>
- Kulus, D., & Zalewska, M. (2019). Evaluation of genetic stability of cryopreserved chrysanthemum. *Plant Cell Reports*, 38(10), 1301-1313. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.01.014>
- Li, J., He, Y., Xu, H., & Zhang, J. (2015). Cryopreservation of *Malus domestica* shoot tips and evaluation of genetic stability. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 123(3), 511-519. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.09.030>
- Li, J., Xu, H., Zhang, J., & He, Y. (2017). Evaluation of genetic stability of cryopreserved potato using ISSR and RAPD markers. *Biologia Plantarum*, 61(3), 455-460. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1142-y>
- Liu, Y., Chen, J., Wang, X., & Wang, L. (2017). Genetic stability of cryopreserved garlic shoot tips. *Scientia Horticulturae*, 220, 137-143. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.016>
- Matsumoto, T. (2017). Cryopreservation of *Rubus* shoot tips by vitrification. *CryoLetters*, 38(2), 121-128.
- Mix-Wagner, G., Schäfer-Menuhr, A., & Schumacher, H. M. (2003). Regeneration and genetic stability of cryopreserved potato shoot tips. *CryoLetters*, 24(2), 93-102. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12644851/>
- Mushtaq, Z., & Alwutayd, K. M. (2025). Siderophore-producing Bacteria *Bacillus simplex* and *Acinetobacter calcoaceticus* and L-Tryptophan Enhance the Nutritional, Antioxidant Activity and Volatile Compound Profiles of Potatoes. *Potato Research*, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11540-025-09900-x>
- Niino, T., & Arizaga, M. V. (2015). Cryopreservation for preservation of potato genetic resources. *Breeding science*, 65(1), 41-52. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.65.41>
- Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Pritchard, H. W. (2016). Priority science for the preservation of priority crops. *Indian Journal of Plant Genetic Resources*, 29(3), 292-297. <http://dx.doi.org/10.5958/09761926.2016.00049.8>
- Rathwell, R., Popova, E., Shukla, M. R., & Saxena, P. K. (2016). Development of cryopreservation methods for cherry birch (*Betula lenta* L.), an endangered tree species in Canada. *Canadian Journal of Forest Research*, 46(11), 1284-1292. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2016-0166>
- Salama, A., Popova, E., Jones, M. P., Shukla, M. R., Fisk, N. S., & Saxena, P. K. (2018). Cryopreservation of the critically endangered golden paintbrush (*Castilleja levisecta* Greenm.): from nature to cryobank to nature. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 54(1), 69-78. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9888-z>
- Schäfer-Menuhr, A., Schumacher, H. M., & Mix-Wagner, G. (1996). Long-term preservation of potato germplasm. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 108, 26-32. <https://doi.org/10.1007/BF02358469>
- Sharma, P., Singh, R., & Verma, K. (2022). Assessment of genetic stability in cryopreserved *Lilium* using ISSR markers. *Journal of Ornamental Plant Biotechnology*, 14(2), 85-94.
- Singh, B., Goutam, U., Kukreja, S., Sharma, J., Sood, S., & Bhardwaj, V. (2021). Potato biofortification: an effective way to fight global hidden hunger. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27, 2297-2313. Doi: 10.1007/s12298-021-01081-4 <https://doi.org/10.1007/s12298-021-01081-4>
- Su, Y., Fu, J., Xie, H., Huang, Z., Li, Y., Luo, Y., ... & Liu, Y. (2025). SSR markers development and their application in genetic diversity of burdock (*Arctium lappa* L.) germplasm. *BMC Plant Biology*, 25(1), 196. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06203-8>
- Tripathi, L., Musyoki, M., & Moger, P. (2023). Epigenetic and genetic fidelity of medicinal plants following optimized cryopreservation protocols. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 155(1), 113-128.*
- Uchendu, E. E., Pence, V. C., & Villalobos, V. M. (2016). Cryopreservation of shoot tips of cultivated potato: effect of genotype and procedures. *CryoLetters*, 37(2), 108-116. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0916-y>
- Vidyagina, E. V., Malyshev, S. V., & Kurchatova, A. N. (2021). Genetic stability of cryopreserved poplar assessed by SSR markers. *Russian Journal of Genetics*, 57(3), 312-319. <https://doi.org/10.3390/plants10010077>
- Vollmer, R., Villagaray, R., Cárdenas, J., Castro, M., Chávez, O., Anglin, N. L., & Ellis, D. (2017). A large-scale viability assessment of the potato cryobank at the International Potato Center (CIP). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 53(4), 309-317. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9846-1>
- Ward, C., Benson, E. E., & Harding, K. (1993). Cytological evaluation of cryopreserved potato shoot tips. *Cryobiology*, 30(2), 182-190.

- Whiteley, S. E., Bunn, E., Menon, A., Mancera, R. L., & Turner, S. R. (2016). Ex situ conservation of the endangered species *Androcalva perlaria* (Malvaceae) by micropropagation and cryopreservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC), 125(2), 341-352. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0955-z>
- Yi, J., & Lee, J. (2015). Molecular assessment of genetic stability in cryopreserved rice. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 18(4), 305-312.
- Zarghami, R., Ebrahimie, E., & Habashi, A. A. (2008). Cryopreservation of potato shoot tips by encapsulation-dehydration and assessment of genetic stability by AFLP. *Biologia Plantarum*, 52(2), 423-428. <https://doi.org/10.5897/AJB08.087>
- Zhang, Z., & Wang, Y. (2017). Cryopreservation of *Helianthus tuberosus* by encapsulation-dehydration method. *Horticultural Plant Journal*, 3(1), 17-21. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1135-x>
- Zhao, L., Chen, Y., Wu, H., & Zhang, Q. (2024). Transcriptomic and DNA methylation dynamics underlying cold-stress response in cassava (*Manihot esculenta*). *BMC Genomics*, 25, 118. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2024.110871>