Crop Biotechnology Open Access

Autumn (2026) 15 (3): 1-12
DOI: 10.30473/cb.2026.75874.2019

ORIGINAL ARTICLE

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 Samdaliri[1], Reza Zarghami[2], Amirabbas Mousavi[1], Ali Eftekhari[1]

1. Department of Agronomy, Cha.C., Islamic Azad Univercity, 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

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.

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)

© 2024, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).
https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/

زیست‌فناوری گیاهان زراعی

سال پانزدهم، شماره سوم، پیاپی ۵۳، بهار ۱۴۰۵ (۱۲-۱)

DOI: 10.30473/cb.2026.75874.2019

«مقاله پژوهشی»

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

سیدعلی میربابائی[1*]، مرتضی سام‌دلیری[1]، رضا ضرغامی[2]، امیرعباس موسوی[1]، علی افتخاری[1]

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 آریندا و سانته با استفاده از نشانگرهای مولکولی، *فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی*، ۱۵ (۳)، ۱۲-۱.
(DOI: 10.30473/cb.2026.75874.2019)

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی تأثیر انجماد فراسرد بر ثبات ژنتیکی و فیزیولوژیکی دو رقم سیب‌زمینی (آریندا و سانته) در دو مرحله ر شد (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 درون‌شیشه‌ای و ۲) انجماد فرا سرد به روش کپسوله سازی و دهیدراته سازی قرار گرفتند. پس از بازیابی 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 فرا سرد با روش کپسوله سازی و دهیدراته سازی رو شی ایمن و کارآمد برای نگهداری بلندمدت ژرم‌پلاسم 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.

حق انتشار این مستند، متعلق به نویسندگان آن است. ۱۴۰۳ ©. ناشر این مقاله، دانشگاه پیام نور است.

این مقاله تحت مجوز Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) منتشر شده و استفاده از آن با ارجاع صحیح مجاز است.

(http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)
https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/

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 (Batool *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 به شمار می‌آید و به دلیل 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[1] در کشور پرو، مجموعه جهانی و امانی سیب‌زمینی‌های کشت شده را مدیریت می‌کند. ژرم‌پلاسم این مجموعه بنا به درخواست مختلف جهت اهداف پژوهشی، اصلاح نژاد و آموزشی، تحت نظارت معاهده بین‌المللی منابع ژنتیکی گیاهی غذا و دارو[2] توزیع می‌شود (FAO, 2009). تعداد ۴۳۸۸ نمونه شناسنامه‌دار سیب‌زمینی در این مجموعه به صورت درون شیشه نگهداری می‌شوند تا پس از عاری‌سازی از ویروس‌ها، ژرم‌پلاسم باقی بماند و بتواند بدون انتقال بیماری به سایر کشورها جابه‌جا شود (Vollmer *et al*., 2017). اگرچه نگهداری *in vitro*[3] (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 ژرم‌پلاسم، پشتیبان‌گیری از مجموعه در یک بانک انجماد فراسرد[3] است. در واقع، انجماد فراسرد[4] 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 باززایی 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 بازیابی‌شده 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 گیلاسی (*Betula*

1 International Potato Center
2. International Treaty for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture
3 Cryobank
4 Cryopreservation

(*lenta* L. (Rathwell *et al*., 2016) و گونه به‌شدت در معرض خطر اندروکالوا مرواریدی (*Androcalva perlaria* Wilk.) (Whiteley *et al*., 2016) همگی از طریق ذخیره‌سازی انجمادی دوباره به زیستگاه‌های طبیعی خود بازگردانده شده‌اند.

نشانگرهای ریزماهواره[1]یا توالی‌های تکراری ساده[2] (SSR) واحدهای تکراری دو تا شش تایی از نوکلئوتیدها هستند که در ژنوم بیشتر یوکاریوت‌ها پراکنده هستند (Zane *et al*., 2002). این توالی‌های تکراری در سراسر ژنوم یوکاریوت‌ها پخش شده‌اند و بر اساس یک سیستم نشانگر ژنتیکی مبتنی بر واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز[3] (PCR) چند آللی و هم‌بارز هستند. معمولا نواحی کناری ریزماهواره‌ها در بین گونه‌های مختلف به صورت حفاظت شده باقی مانده‌اند. 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 تحلیل‌های ژنتیکی استفاده می شود (Su *et al*., 2025;). بررسی‌ها نشان داده‌اند که هرچند این مارکرها تنها بخش بسیار کوچکی از ژنوم را ارزیابی می‌کنند، اما برای سنجش ثبات کافی هستند (Harding, 2004). همچنین مطالعات متعددی روی گیاهان مختلف از جمله سیب‌زمینی (Zarghami *et al*., 2008)، انجام شده که همگی نشان‌دهنده‌ی حفظ ثبات ژنتیکی پس از انجماد فراسرد بوده‌اند.

از این‌رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر انجماد فراسرد به روش کپسوله–دهیدراته بر پایداری ژنتیکی گیاهچه‌ها وگیاهان نسل اول دو رقم سیب‌زمینی آریندا و سانته طراحی و اجرا شد تا کارایی این روش به‌عنوان رویکردی مؤثر در حفظ بلندمدت ژرم‌پلاسم ارزیابی شود.

روش‌شناسی پژوهش

تولید گیاهچه‌های عاری از ویروس

در این پژوهش، از دو رقم سیب‌زمینی آریندا و سانته، تهیه شده از پژوهشکده بیوتکنولوژی متابولیت‌های ثانویه (اصفهان) استفاده شد. به‌منظور اطمینان از عاری بودن گیاهان از ویروس پیش از انجام ریزازدیادی، ابتدا گلدان‌های حاوی این ارقام به‌مدت پنج هفته در فیتوترون با شرایط دمایی ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۰ تا ۶۵ درصد و شدت نور ۲۰۰۰ لوکس قرار گرفتند. آبیاری در این مدت برحسب نیاز انجام شد. سپس مریستم‌ها در سن سه تا پنج هفتگی به اندازه ۰/۳ تا ۰/۵میلیمتر جداسازی و در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ[4]حاوی اکسین نفتالین استیک اسید NAA (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر)، ژیبرلین (۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر) و کینتین (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) کشت داده شدند. پس از رشد گیاهچه ها، آزمون ELISA برای اطمینان از ویروس‌زدایی کامل نمونه ها انجام گرفت. در ادامه از ساقه‌های عاری از ویروس، قطعه‌های تک‌گره‌ای جدا شده و در محیط جامد موراشیگ و اسکوک بدون هورمون با ترکیب ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۴ گرم بر لیتر آگار و pHبرابر ۵/۷ کشت شدند. نمونه‌های کشت‌شده به‌مدت ۳۰ روز در اتاق رشد با دمای ۲۳ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۲۰۰۰ لوکس نگهداری شدند.

اعمال تیمارهای نگهداری بلندمدت

برای اعمال تیمار انجماد فراسرد، گیاهچه‌های رشد یافته پس از پنج هفته به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد پیش سرد شدند. سپس از قطعات نوک ساقه نمونه‌برداری انجام شد. فرایند انجماد فراسرد بر اساس روش ضرغامی و همکاران (۲۰۰۸)، به‌روش کپسوله‌سازی و دهیدراته‌سازی انجام شد (Zarghami *et al*., 2008). در این روش، قطعات نوک ساقه در محلول آلژینات سدیم ۳ درصد (وزنی/حجمی) حاوی یون Ca^{2+} ۲۰ میلی‌مولار کپسوله شد، در این روش از محلول کلسیم با غلظت ۲۰ میلی‌مولار استفاده شد تا جابجایی یون سدیم با کلسیم در آلژینات سدیم اتفاق افتاده و کپسول تشکیل شود. در ادامه محتویات گیاهی به‌مدت ۳ روز در محیط پیش‌کشت حاوی ترکیب غلظت‌های مختلف ساکارز (۰/۲۵ تا ۱

1Microsatellite
2Simple Sequence Repeats
3Polymerase Chain Reaction
4Murashige and Skoog (MS) medium

مولار) قرار گرفتند. سپس دانه‌های آلژینات به‌مدت ۲ تا ۴ ساعت در محیط کشت استریل و تحت جریان هوای استریل زیر هود و دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد خ شک شدند. پس از این مرحله، دانه‌های آلژینات حاوی قطعات نوک ساقه به تیوب‌های استریل ۲ میلی‌لیتری منتقل و به‌مدت ۳ ماه در نیتروژن مایع نگهداری شدند. برای بازیابی، تیوب‌ها به حمام آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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، ریزنمونه‌ها هر ۲۸ روز به تعداد سه بار واکشت شدند تا گیاهچه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای تکثیر یابند. آزمایش با دو رقم سیب‌زمینی (آریندا و سانته)، 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 ریزنمونه‌ها به‌مدت ۸ هفته ادامه یافت. در پایان دوره، از برگ ۱۰ گیاهچه حاصل از بازیابی با روش فراسرد نمونه‌برداری شد و نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد 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) به‌طور هم‌زمان انجام شد.

تولید گیاهان نسل اول

تعداد ۱۰ گیاهچه حاصل از هر تکرار در مرحله قبل، به‌منظور تولید گیاهان نسل اول، به گلخانه منتقل شدند. ابتدا گیاهچه‌ها در سینی‌های نشایی حاوی مخلوط پیت و پرلیت با نسبت ۱:۱ کشت شدند. برای سازگاری تدریجی با شرایط محیطی و جلوگیری از تنش رطوبتی، به‌مدت ۵ روز اولیه رشد، با پوشش پلاستیکی شفاف پوشانده شدند و این پو شش به‌تدریج بردا شته شد. پس از گذ شت ۴۰ روز، گیاهچه‌ها به گلدان‌های حاوی همان بستر کشت (پیت و پرلیت) منتقل شدند. شرایط رشد در گلخانه شامل دمای ۲۳ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۲۰۰۰ لوکس بود. آبیاری برحسب نیاز و تغذیه گیاهان با کود NPK (فرمول ۲۰-۲۰-۲۰، برند ETNAFERT) انجام شد. پس از ۱۲۰ روز ر شد، مینی‌تیوبرهای ت شکیل شده از هر گیاه برداشت گرد ید. این مینی‌تیوبر ها برای طی دوره خواب به اتاقک رشد با دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵ ± ۸۵ درصد و تاریکی به‌مدت دو تا سه ماه منتقل شدند. پس از جوانه‌زنی و رسیدن طول جوانه‌ها به ۱ سانتی‌متر، مینی‌تیوبرهای جوانه‌زده در گلدان کا شته شدند تا گیاهان نسل اول تولید شوند. در مرحله ۸ برگی، نمو نه‌برداری از برگ گیا هان انجام و نمو نه ها تا ز مان انجام ارز یابی های ژنتیکی و فیزیولوژیکی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. این آزمایش با گیاهان حا صل از هر دو روش نگهداری (انجماد فرا سرد و کشت درون شیشه‌ای) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (هر تکرار شامل ۱۰ گیاه) برای هر رقم انجام شد.

ارزیابی ثبات ژنتیکی گیاهچه‌ها و گیاهان نسل اول

پس از پودر کردن برگ‌های گیاهچه‌ها و گیاهان نسل اول در نیتروژن مایع با استفاده از هاون چینی، بافت‌های 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 میلی‌گرم از بافت انتخاب و روش CTAB به کار گرفته شد (Borges *et al*., 2019). ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراج‌شده با استفاده از نانودراپ (Thermo Nanodrop 2000C) و الکتروفورز بر روی ژل آ گارز یک درصد در حضور نردبان مولکولی ۱۰۰۰ باز انجام شد. پس از تأیید کیفیت، DNA نمونه‌ها برای واکنش PCR با آغازگرهای SSR مورد استفاده قرار گرفتند تا ثبات ژنتیکی در گیاهچه‌ها و گیاهان نسل اول به صورت هم‌زمان ارزیابی شود PCR با استفاده از ۱۵ جفت آغازگرSSR انجام شد (جدول ۱). غلظت اولیه DNAهای ا ستخراج شده در بازه ۷۵۳ تا ۴۳۴۶ نانوگرم در ماکرولیتر بود که همگی تا غلظت نهایی ۵۰ نانوگرم در ماکرولیتر رقیق شدند. ترکیب واکنش PCR در

1Ladder 1Kb

حجم نهایی ۱۵ ماکرولیتر شامل اجزای زیر بود: ۰/۲۵ ماکرولیتر آنزیم SmarTaq DNA Polymerase (با غلظت ۵ واحد بر میکرولیتر)، ۱/۵ میکرولیر بافر (pH 8.4) ۱۰X شامل 500mM KCI, 500mM Tris-HCI 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 دوبار تقطیر (ddH_2O) برای رساندن حجم نهایی واکنش به ۱۵ ماکرولیتر. برنامه دمایی PCR شامل یک مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ دقیقه بود. سپس، چرخه اصلی PCR در ۳۵ چرخه به‌صورت زیر انجام شد: دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها[1] در دمای اختصاصی برای هر جفت آغازگر (جدول ۱) به مدت ۱ دقیقه و مرحله طویل سازی[2] در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه. پس از اتمام چرخه‌ها، یک مرحله نهایی طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت 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 نردبان مولکولی در محدوده ۱۰۰۰–۱۰۰ جفت‌باز الکتروفورز شدند.

آنالیز داده‌ها

اگرچه مارکرهای SSR از نوع هم‌بارز (Codominant) هستند و امکان تشخیص آلل های هتروزیگوت و هموزیگوت را فراهم می‌کنند، با توجه به اینکه هدف پژوهش حاضر ژنوتایپ‌کردن یا تحلیل ساختار آللی نبوده بلکه صرفاً بررسی وجود یا عدم وجود هرگونه تغییر ژنتیکی در نمونه‌های حاصل از انجماد فراسرد وگیاهان 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 پلی‌آکریل‌آمید 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 GenAlEx نسخه ۶٫۵ (Peakall & Smouse, 2006) انجام شد.

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

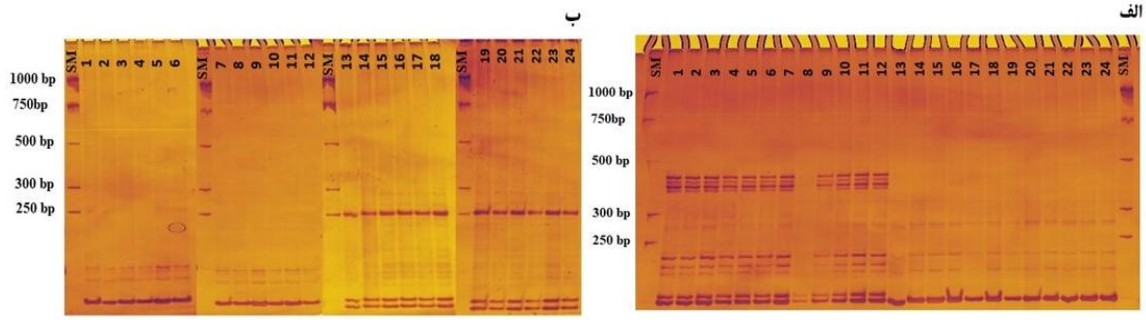
Table 1. Characteristics of SSR primers used for assessing the genetic stability of two potato cultivars, Arinda and Santé

نام آغازگر	توالی آغازگر (5'to 3')	دمای اتصال (°C)	نام آغازگر	توالی آغازگر (5'to 3')	دمای اتصال (°C)
12002-F	CCATGAACCTGAAGTTTTTCTGC	59	STM0019a,b-F	AATAGGTGTACTGACTCTCAATG	58
12002-R	TGGATATCTTGTGCCTACAAGCTAG		STM0019a,b-R	TTGAAGTAAAAGTCCTAGTATGTG	
31924-F	CGAAGACACCAAATCGCTCAG	55	STM0031-F	CATACGCACGCACGTACAC	58
31924-R	GAAACGCCATTAACATTTTACATCG		STM0031-R	TTCAACCTATCATTTTGTGAGTCG	
4026/4027-F	AACTTGCGGGAATAAGTGACG	58	STM1104-F	TGATTCTCTTGCCTACTGTAATCG	59
4026/4027-R	ACTATACACACGTGCCCTGAAACTAG		STM1104-R	CAAAGTGGTGTGAAGCTGTGA	
43016-F	CAAGCTGCATGAAAGCCATC	55	STM1106-F	TCCAGCTGATTGGTTAGGTTG	58
43016-R	TTTGCCTAAAAGTTTGTAGTGTGAGG		STM1106-R	ATGCGAATCTACTCGTCATGG	
46514-F	TGCTTTTTGTTTCCTTTTGTGTG	55	STM5114-F	AATGGCTCTCTCTGTATGCT	57
46514-R	GGAATGAAACTAAGCCTTGCTCTG		STM5114-R	GCTGTCCCAACTATCTTTGA	
STG0025-F	TGGAATCCGAATTACGCTCT	58	STM5121-F	CACCGGAATAAGCGGATCT	58
STG0025-R	AGGTTTTACCACTCGGGCTT		STM5121-R	TCTTCCCTTCCATTTGTCA	
STI0004-F	GCTGCTAAACACTCAAGCAGAA	59	STM5127-F	TTCAAGAATAGGCAAAACCA	58
STI0004-R	CAACTACAAGATTCCATCCACAG		STM5127-R	CTTTTTCTGACTGAGTTGCCTC	
STI0014-F	AGAAACTGAGTTGTGTTTGGGA	58			
STI0014-R	TCAACAGTCTCAGAAAACCCTCT				

1. Annealing
2. Extension

نتایج و بحث

ارز یابی کیفی و کمی DNA های اســـتخراج‌شـــده از گیاهچه‌ها و گیاهان نسل اول حاصل از نگهداری فراسرد، نشـــان‌دهنده کیفیت مناســـب نمونه‌ها برای ادامه مراحل واکنش PCR بود و بیانگر اثربخشـــی پروتکل اســـتخراج مورد استفاده است. برای بررسی تغییرات احتمالی ژنتیکی نا شی از نگهداری فرا سرد، از ۱۵ جفت ن شانگر SSR در دو رقم سیب‌زمینی آریندا و سانته در سه تکرار ا ستفاده شـــد. این نشـــانگرها در مجموع ۱۴۰ مکان ژنی را در محدوده ۱۳۰ الی ۴۵۰ جفت باز پوشـــش دادند. نتایج ارز یابی ث بات ژنتیکی در هر دو مرحله (گیاهچه ها و گیاهان نسل اول) نشان داد که بین نمونه‌های حاصل از انجماد فراســـرد و نمونه‌های نگهداری‌شـــده در شـــرایط درون‌شـــیشـــه‌ای، تفاوت ژنتیکی قابل اندازه‌گیری وجود نداشته و هر دو گروه از نظر الگوهای باندی کاملاً مشابه بودند. این نتایج بیانگر حفظ ثبات ژنتیکی در شـــرایط نگهداری فراسرد است. شکل (۱)، الگوهای باند حاصل از تکثیر با دو مارکر STI0014 و STM1104 را نشـــان می‌دهد. همان طور که در شکل نشان داده شده است دو گروه نمونه ها از نظر الگوی باندی کاملاً یکسان هستند. جهت اطمینان از عدم تأثیر تغییرات ژنتیکی حاصل از محیط کشت بر روی نمونه ها ذکر این نکته حائز اهمیت است که از عوامل مهمی که در کشـــت بافت باعث تغییرات ژنتیکی می شـــود می توان دو عامل را نام برد که عبارتند از تولید گیاهچه از کالوس و تعداد ســـاب کالچرهای بیش از ۷ تا ۱۰ بار که در این تحقیق هیچ‌کدام از این دو عامل را نداشـــتیم چون از شـــوت تیپ اســـتفاده گردید و همچنین تعداد ســـاب کالچر زیر ۷ بوده اســـت. در ســـال‌های اخیر، روش انجماد فراسرد به‌عنوان یکی از تکنیک‌های مؤثر و قابل‌اعتماد برای نگهداری بلندمدت منابع ژنتیکی، چه در بانک‌های ژرم‌پلاسم و چه در آزمایشـــگاه‌های تحقیقاتی، به‌طور گســـترده مورد استفاده قرار گرفته است. یکی از رایج‌ترین شیوه‌های بازیابی نمونه‌ها پس از انجماد، کشـــت بافت در شـــرایط کنترل‌شـــده اســـت؛ روشـــی که با روند بازیابی گیاهان از انجماد فراســـرد تداخلی ندارد و در بســـیاری از گونه‌های گیاهی موفقیت‌آمیز گزارش شده است.



شکل ۱. الگوهای باندی نشانگر SSR در دو رقم سیب‌زمینی (آریندا و سانته) تکثیرشده با آغازگر STI0014 (الف) و STM1104 (ب) روی ژل پلی‌آکریل‌آمید 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.

در این مطالعه نیز از روش کپسوله‌سازی 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 سانته مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نمونه‌های حاصل از هر دو روش، الگوی باندی 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 مورداستفاده در کشاورزی نیز یافته‌های مشابهی را گزارش کرده‌اند. به عنوان مثال، بررسی ترنسکریپتومی 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 ژن های تنظیم‌کننده تنش دمایی الگوهای متیلاسیون قابل برگشت داشته‌اند و هیچ‌گونه اختلالی در مسیرهای اصلی متابولیکی 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 قابل‌توجهی 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 و ISSR (Kulus *et al*., 2019)، موز با نشانگر SSR (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).

باسو 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 ترنسکریپتوم ژن‌های

متفاوت بیان شده (DEGs) شناسایی شدند. نتایج نشان داد که اگرچه تعداد زیادی ژن در مراحل مختلف تحت تأثیر قرار گرفتند (۷۹۸، ۵۹۲، ۹۲۳ و ۱۰۳۵ ژن)، اما ژن‌های ضروری برای رشد و نمو طبیعی، از جمله چرخه اسید سیتریک، طویل 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 ژرم‌پلاسم 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 نعنا (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 سانته با روش انجماد فراسرد (کپسوله سازی و دهیدراته سازی) 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 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 ژرم‌پلاسم سیب‌زمینی پیشنهاد کرد.

افزون بر این یافته‌های این مطالعه نشان داد که فرایند انجماد فراسرد مبتنی بر روش کپسوله‌سازی– دهیدراته سازی تواست ریزنمونه‌ها، گیاهچه‌ها و گیاهان نسل اول دو رقم سیب‌زمینی آریندا و سانته را بدون ایجاد هرگونه تغییر در ساختار ژنتیکی حفظ کند. بررسی‌های مولکولی با استفاده از نشانگر های SSR که از قدرتمندترین ابزار های تشخیص تغییرات ژنتیکی در سیب‌زمینی به‌شمار می‌روند، ثبات کامل الگوهای باندی 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 به‌تدریج منجر به انباشت تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی، کاهش قدرت رویشی و افت کیفیت ژرم‌پلاسم شوند. اما نتایج این تحقیق نشان داد که انجماد فراسرد می‌تواند با حذف این مخاطرات و ایجاد شرایط کاملاً پایدار، امکان حفظ ژرم‌پلاسم 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 نه‌تنها بقا و باززنده سازی نمونه‌ها را با موفقیت تضمین می‌کند، بلکه ساختار ژنتیکی ارقام مورد مطالعه را نیز به‌طور کامل حفظ می‌نماید. این

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

به‌طور کلی، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که انجماد فراســرد مبتنی بر کپســوله‌ســازی– دهیدراته‌ســازی می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی قابل‌اعتماد در حفاظت بلندمدت ارقام سیب‌زمینی مورد استفاده قرار گیرد، بدون آنکه کوچک‌ترین تأثیری بر ثبات ژنتیکی مواد گیاهی داشته باشد. این دستاورد، پایه‌ای علمی و تجربی برای توســـعه و اســـتقرار نظام‌های ذخیره‌سازی مطمئن ژرم‌پلاسم سیب‌زمینی در مقیاس ملی و بین‌المللی فراهم می‌سازد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

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/s12298-021-01081-4https://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