

Репродуктивная способность сортов черной смородины после криоконсервирования пыльцы в жидком азоте

DOI: 10.30901/2227-8834-2021-4-71-78

УДК 634.723.1:631.527.82:57.086.13

Поступление/Received: 16.03.2021

Принято/Accepted: 19.08.2021



**Reproductive ability
of black currant cultivars after pollen
cryopreservation in liquid nitrogen**

О. А. ТИХОНОВА^{1*}, Е. А. РАДЧЕНКО², А. В. ПАВЛОВ¹O. A. TIKHONOVA^{1*}, E. A. RADCHENKO², A. V. PAVLOV¹

¹ Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт генетических ресурсов
растений имени Н.И. Вавилова
190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44
* o.tikhonova@vir.nw.ru

¹ N.I. Vavilov All-Russian Institute
of Plant Genetic Resources,
42, 44 Bolshaya Morskaya Street,
St. Petersburg 190000, Russia
* o.tikhonova@vir.nw.ru

² Кубанский государственный аграрный университет,
350044 Россия, г. Краснодар, ул. Калинина, 13

² Kuban State Agrarian University,
13 Kalinina St., Krasnodar 350044, Russia

Актуальность. Исследование репродуктивной способности сортов черной смородины после длительного криоконсервирования пыльцы в жидком азоте имеет большое значение для организации сохранения разнообразия этой культуры.

Материалы и методы. Объектами исследования служили пять сортов черной смородины. Изучение жизнеспособности пыльцы до и после ее криоконсервирования в жидком азоте проводили путем проращивания на питательной среде, содержащей 10% сахарозы и 0,8% агар-агара. Определение оплодотворяющей способности пыльцы осуществляли путем опыления сорта 'Андреевская' (к-15630А) пыльцой, хранившейся в течение года при сверхнизких температурах (–196°C), и свежесобранной пыльцой (контрольный вариант опыления).

Результаты и заключение. После 12 месяцев хранения пыльцы в условиях сверхнизких температур жизнеспособность в зависимости от образца колебалась от 10,4% ('Поздняя послевоенная', к-7652) до 50,4% ('Kriviai', к-42517); среднее ее значение было на 0,9% выше средней исходной жизнеспособности. Завязываемость ягод в контрольном варианте опыления составляла 81,3–94,2%. При опылении пыльцой, хранившейся в жидком азоте в течение года, завязываемость ягод варьировала от 69,2% ('Кача', к-44185) до 93,3% ('Белорусочка', к-41978); остальные сорта ('Поздняя послевоенная', к-42481, 'Черешнева', 'Kriviai') занимали по этому показателю промежуточное положение, то есть репродуктивная способность пыльцы после криоконсервации была высокой даже при низкой ее жизнеспособности. По массе ягоды у сортов 'Кача', 'Черешнева', 'Kriviai' не наблюдалось различий по обоим вариантам опыления; у сортов 'Белорусочка' и 'Поздняя Послевоенная' величина показателя была меньше контроля на 0,31 и 0,24 г соответственно.

Ключевые слова: *Ribes* L., жизнеспособность, опыление, длительное хранение, завязываемость ягод, масса ягоды.

Background. Studying the reproductive ability of black currant cultivars after long-term cryopreservation of their pollen in liquid nitrogen is very important for plant diversity conservation and for the effectiveness of breeding efforts.

Materials and methods. Five black currant cultivars served as the material for the research. The viability of black currant pollen after cryopreservation in liquid nitrogen was analyzed. Pollen viability was tested on an artificial medium containing 10% of sucrose and 0.8% of agar. The viability of pollen was tested on the black currant collection at Pushkin and Pavlovsk Laboratories of VIR. The cultivar 'Andreevskaya' (k-15630) was pollinated with pollen stored for one year in liquid nitrogen (–196°C) as well as with fresh pollen (control test).

Results and conclusion. After 12 months of conservation under ultralow temperatures there was a change in the level of pollen viability depending on the genotype: it varied from 10.4% (cv. 'Pozdnyaya poslevoennaya', k-7654) to 50.4% (cv. 'Kriviai', k-42517), while its mean value was 0.9% higher than the mean initial viability. The fruit setting rate in the control option was 81.3–94.2%. When pollinated with pollen kept in liquid nitrogen for one year, the fruit setting rate varied from 69.2% ('Kacha', k-44185) to 93.3% ('Belorusochka', k-41978); the remaining cultivars ('Pozdnyaya poslevoennaya', 'Chereshneva', k-42481; and 'Kriviai') demonstrated intermediate values of this indicator, i.e., the reproductive ability of pollen after cryopreservation was high even despite its low viability. As for the fruit weight, no differences were shown by cvs. 'Kacha', 'Chereshneva' and 'Kriviai' in both pollination options, while this indicator in cvs. 'Belorusochka' and 'Pozdnyaya poslevoennaya' was lower than the control by 0.31 and 0.24 g, respectively.

Key words: *Ribes* L., pollen viability, pollination, long-term storage, fruit setting, fruit weight.

Введение

Сохранение генофонда является важным фактором обеспечения растительного разнообразия. Пыльца содержит всю информацию гаплоидного генома вида (Ren et al., 2019), при этом компактность и удобство хранения в силу экстремально малых ее размеров позволяет обеспечить сохранность большего количества генотипов по сравнению с другими формами растительных объектов (Kozaki et al., 1988). Это обуславливает ее значимость как материала для сохранения и обмена генетическими ресурсами растений. Кроме того, длительное хранение пыльцы позволяет эффективно преодолевать препятствия при скрещивании родительских форм, цветущих в разное время и в различных географических точках (Ren et al., 2019).

Используется несколько методов сохранения пыльцы, например: холодное хранение при температуре 3–5°C, сублимационная сушка, сублимационное хранение, вакуумная сушка, консервация органическими растворителями и криоконсервация (Bajaj, 1987). Известно, что лучшие условия для сохранения пыльцы создаются при сочетании низких влажности и температуры воздуха, низкого содержания кислорода или вакуума. В комнатных условиях пыльца сохраняет жизнеспособность в течение недели, в сухих прохладных условиях – несколько недель или месяцев, в сухих холодных – до года (Kozaki et al., 1988).

Существуют значительные различия в консервирующем влиянии различных методов на жизнеспособность пыльцы, однако на большом количестве объектов показано, что наибольшую жизнеспособность при длительном хранении обеспечивает криоконсервирование пыльцы при сверхнизких температурах (Zhang et al., 1993). При таком способе хранения пыльца остается жизнеспособной в течение 10 и более лет (Kozaki et al., 1988).

Самое раннее сообщение о криоконсервации пыльцы было сделано Ноултоном (Knowlton, 1922), который обнаружил, что пыльца львиного зева (*Antirrhinum majus* L.) выдерживает температуру жидкого воздуха (–180°C); пыльца содержала от 10% до 12% воды и после инкубации при температуре жидкого воздуха сохранила 60% жизнеспособности.

В 80-х годах XX столетия работы в этом направлении получили дальнейшее успешное развитие. D. Parfitt и A. Almehti при определении жизнеспособности пыльцы миндаля, абрикоса, персика, сливы и вишни после погружения ее в жидкий азот установили, что пыльца указанных плодовых культур может быть заморожена при температуре –196°C на один час и разморожена при комнатной температуре без значительной потери жизнеспособности (Parfitt, Almehti, 1984b). Эти же авторы провели изучение жизнеспособности пыльцы 10 сортов маслины после погружения ее в жидкий азот. Проведенное исследование показало, что при хранении пыльцы в условиях сверхнизких температур потеря жизнеспособности в среднем по всем изученным сортам составила лишь 2,8%. Не было отмечено каких-либо особенностей по длине или морфологии пыльцевых трубок по обоим вариантам опыта. При этом наблюдались значительные различия по уровню жизнеспособности пыльцы между разными генотипами, тем не менее даже пыльца с наименьшей жизнеспособностью оставалась вполне пригодной для успешного опыления (Parfitt, Almehti, 1984a). Годом ранее, в 1983 г., этими же исследователями была изучена возможность хранения пыльцы 21 сорта вино-

града при сверхнизких температурах. Оказалось, что быстрое замораживание пыльцы и хранение ее в течение часа в жидком азоте (–196°C) не снижает ее жизнеспособности. Различия по количеству проросших пыльцевых зерен у замороженной и свежесобранной пыльцы составили менее 5%. Не было обнаружено отличий по внешнему виду пыльцевых зерен и динамике роста пыльцевых трубок по обоим вариантам опыта (Parfitt, Almehti, 1983).

Аналогичные исследования по хранению пыльцы пяти сортов винограда в жидком азоте (–196°C) были проведены S. Ganeshan в Институте плодоводства в Бангалоре (Индия) в 1985 г. Было установлено, что после 64 недель хранения при сверхнизких температурах (–196°C) наблюдалось увеличение жизнеспособности на 3,1–7,7% у всех сортов по сравнению с контролем (свежесобранной пыльцой) (Ganeshan, 1985).

Исследованиями M. Borghazan et al. (2011) при определении жизнеспособности пыльцы киви при разных способах хранения было показано, что температуры 4°C и –18°C больше подходят для краткосрочного хранения, а при –196°C пыльца киви может храниться в жизнеспособном состоянии не менее одного года.

При изучении хранения пыльцы финиковой пальмы исследователи пришли к выводу, что лучшим из всех исследованных ими вариантов хранения (25–30°C, 4°C, –20°C, –196°C) было хранение при температуре –196°C (Maryam et al., 2017).

В настоящее время в криобанках многих стран – Японии (Akihama, Omura, 1986), США (Connor, Towill, 1993), Канады (Mercier, 1995), России (Manzhulin, Yashina, 1984; Verzhuk et al., 2002), Китая (Ren et al., 2019) – хранится пыльца различных растений, однако в большинстве случаев, по мнению R. Ren (2019), исследования жизнеспособности пыльцы после криоконсервирования при сверхнизких температурах охватывают небольшой временной период хранения – от нескольких дней до нескольких месяцев.

Исследователи из Пекинского университета лесного хозяйства с целью дальнейшей проверки безопасности и стабильности длительного криоконсервирования пыльцы хранили в жидком азоте пыльцу 102 видов/сортов декоративных растений 32 родов, отнесенных к 14 семействам (Ren et al., 2019). Исследования показали, что после криоконсервирования при сверхнизких температурах (–196°C) в течение 8, 9 или 10 лет диапазон изменчивости жизнеспособности пыльцы составил 1–58%. При этом у 11,8% исследуемых образцов (12 видов/сортов) наблюдалось повышение жизнеспособности; 16,7% образцов (17 видов/сортов) сохраняли устойчивую жизнеспособность на уровне контроля, а 71,6% (73 вида/сорта) имели тенденцию к снижению жизнеспособности, однако при этом жизнеспособность ниже 1% имели лишь 21,6% из них.

В настоящее время криоконсервирование пыльцы охватывает широкий спектр видов, включая зерновые, плодовые, овощные, декоративные культуры, лекарственные растения, травы и другие растительные объекты (Ren et al., 2019); при этом исследования проводятся с учетом индивидуальных особенностей сохраняемых образцов.

В большинстве случаев жизнеспособность пыльцы, хранившейся в жидком азоте (LN), определялась в лабораторных условиях на искусственных питательных средах, поэтому, чтобы проверить, была ли криоконсервация успешной для этих видов или сортов и может ли она быть использована для долгосрочной программы крио-

консервирования, необходимо определить реальную оплодотворяющую способность криоконсервированной в жидком азоте пыльцы в полевых условиях.

В связи с этим *целью нашей работы* явилось изучение характера изменчивости жизнеспособности пыльцы в процессе криоконсервирования в жидком азоте при -196°C в течение 12 месяцев и выявление ее реальной оплодотворяющей способности путем проведения селекционных скрещиваний на растениях черной смородины (НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР»).

Материалы и методы

Жизнеспособность пыльцы черной смородины до и после криоконсервирования в течение шести и 12 месяцев изучали в лаборатории длительного хранения генофонда растений (ЛДХГР) Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР). Объектами исследования служили пять сортов черной смородины из генофонда, сохраняемого на научно-производственной базе (НПБ) «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» (Санкт-Петербург, г. Павловск). Работа является продолжением исследований, проведенных в 2019–2020 гг. (Tikhonova et al., 2020).

Сбор пыльцы изучаемых сортов, определение жизнеспособности, способ замораживания в жидком азоте и размораживания проводили по методике, примененной в работе А. В. Павлова с соавторами (Pavlov et al., 2019). У каждого образца брали шесть независимых повторностей, у каждой повторности под микроскопом Motik100 M при 100-кратном увеличении фотографировали не менее пяти – восьми полей зрения; всего на один образец для анализа жизнеспособности пыльцы брали до 50 фотографий, на каждой подсчитывали число проросших и не проросших пыльцевых зерен, после чего определяли процент жизнеспособности пыльцы образца и ошибку среднего, то есть для статистической обработки данных по каждому образцу использовали ряд из 100 чисел. Значимость различий сравниваемых выборок оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента после проверки нормальности распределения. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Статистическую обработку результатов исследования выполняли с использованием пакета программ Microsoft Excel.

Изучение оплодотворяющей способности пыльцы проводили на коллекции черной смородины НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» путем проведения скрещиваний. В качестве опыляемого был использован перспективный сорт селекции ВИР 'Андреевская' (к-15630А). В фазе бутонизации было проведено удаление пыльников из нераспустившихся бутонов с последующим изолированием веток с кастрированными бутонами. Спустя 3-4 дня на рыльца пестиков распустившихся цветков была нанесена подготовленная свежесобранная пыльца (контрольный вариант опыления) и пыльца после 12 месяцев хранения в жидком азоте при -196°C . Всего было проведено 10 комбинаций скрещивания; по каждой из них было опылено не менее 50–60 цветков. При анализе полученных данных учитывали завязываемость ягод, массу ягоды и количество семян по каждому варианту опыления.

Результаты и обсуждение

В предыдущем исследовании было показано, что на формирование пыльцы большое влияние оказывают по-

годные условия; жизнеспособность пыльцы также определяется и сортовыми особенностями. Было установлено, что пониженная жизнеспособность связана с аномальным развитием мужских гаметофитов, следствием чего являются морфологические отклонения в строении спородермы, выраженные в разноразмерности пыльцевых зерен, утолщении экзины и формировании бородавчатых поверхностей мезопориума (Tikhonova et al., 2020).

Показано, что хранение пыльцы в жидком азоте способствует увеличению способности пыльцы к прорастанию. Так, после шести месяцев хранения в жидком азоте (-196°C) наблюдалось увеличение процента проросших пыльцевых зерен в среднем по всем сортам на 29,5% по сравнению с исходной жизнеспособностью; в зависимости от сорта наблюдалось повышение уровня жизнеспособности в 1,5–3,2 раза по сравнению с контролем (Tikhonova et al., 2020). Существенные статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) по уровню жизнеспособности до и после экспозиции в жидком азоте были отмечены у четырех из пяти изученных сортов (табл. 1).

Мы предполагаем, что увеличение жизнеспособности пыльцы после криоконсервирования у большинства сортов может быть связано с ультраструктурными изменениями клеточного содержимого пыльцы и возможными изменениями интины, а не самой оболочки пыльцевого зерна (Tikhonova et al., 2020).

Дальнейшие исследования показали, что изменения уровня жизнеспособности в процессе криохранения имеют временный характер; стимулирующий эффект сверхнизких температур при более длительном хранении снижается.

После 12 месяцев хранения пыльцы в условиях сверхнизких температур жизнеспособность в зависимости от образца составила от 10,4% ('Поздняя послевоенная', к-7652) до 50,4% ('Kriviai', к-42517). По сравнению с данными, полученными после шести месяцев хранения в жидком азоте, произошло уменьшение уровня жизнеспособности пыльцы в среднем по всем изученным сортам на 28,6%; в зависимости от генотипа уменьшение показателя составило от 8,4% ('Поздняя послевоенная') до 48,0% ('Белорусочка', к-41978) (см. табл. 1).

Если провести сравнение данных, полученных после 12 месяцев хранения пыльцы в жидком азоте, с исходной жизнеспособностью, то мы можем убедиться, что среднее значение исходной жизнеспособности пыльцы на 0,9% ниже среднего уровня жизнеспособности после 12 месяцев криоконсервирования (см. табл. 1).

Однако в зависимости от индивидуальных особенностей сорта эти изменения имеют различный характер. Так, процент проросшей пыльцы после 12 месяцев экспозиции в жидком азоте (-196°C) у сортов 'Кача' (к-44185), 'Черешнева' (к 42481) и 'Kriviai' был выше по сравнению с исходным уровнем жизнеспособности на 10,3; 11,9 и 12,4% соответственно (см. табл. 1). У сортов 'Поздняя послевоенная' и 'Белорусочка' после года экспозиции в жидком азоте, напротив, наблюдалось уменьшение уровня жизнеспособности по сравнению с контролем на 13,9% и 16,1% соответственно. При этом статистически значимые различия по способности пыльцы к прорастанию между контрольными образцами и образцами после криохранения не были выявлены ни по одному сорту.

Для оценки оплодотворяющей способности пыльцы после хранения ее в жидком азоте (-196°C) в течение 12 месяцев летом 2020 г., во время цветения, были проведены селекционные скрещивания. В качестве опыляемого был использован перспективный сорт селекции ВИР

Таблица 1. Жизнеспособность пыльцы черной смородины после криоконсервирования в течение 6 и 12 месяцев, %

(лаборатория длительного хранения генофонда растений, 2019–2020 гг.)

Table 1. Viability of black currant pollen after cryopreservation for 6 and 12 months, %

(Laboratory for Long-Term Storage of Plant Genetic Resources, 2019–2020)

Сорт / Cultivar	Жизнеспособность пыльцы после различных сроков криоконсервирования в жидком азоте, % / Pollen viability after various periods of cryopreservation in liquid nitrogen, %		
	До помещения в жидкий азот (К) (исходная) / Before placement in liquid nitrogen (C) (initial)	После 6 месяцев хранения в жидком азоте / After 6 months of cryopreservation in liquid nitrogen	После 12 месяцев хранения в жидком азоте / After 12 months of cryopreservation in liquid nitrogen
Белорусочка	49,7 ± 2,3	81,6 ± 2,0 *	33,6 ± 1,8
Кача	39,2 ± 2,1	60,2 ± 3,1 *	49,5 ± 2,0
Поздняя послевоенная	24,3 ± 1,7	18,8 ± 2,5	10,4 ± 1,4
Черешнева	26,3 ± 2,2	84,9 ± 3,0 *	38,2 ± 3,1
Kriviai	38,0 ± 2,2	79,3 ± 2,9 *	50,4 ± 2,1
Среднее	35,5	65,0	36,4

* – статистически значимые отличия по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$

* – statistically significant differences compared to the control at $p \leq 0.05$

‘Андреевская’. Опылителем служила пыльца 5 сортов, хранившаяся в жидком азоте в течение 12 месяцев (вариант I). В качестве контроля использовали опыление свежесобранной пыльцой (вариант II).

Анализ полученных данных показал, что завязываемость ягод при опылении пыльцой, хранившейся в жидком азоте в течение года, составила 69,2–93,3%; в контрольном варианте опыления в зависимости от сорта-опылителя она варьировала от 81,3 до 94,2% (табл. 2).

Наиболее результативной по количеству завязавшихся ягод (93,3%) при опылении пыльцой после криоконсервирования оказалась комбинация Андреевская × Белорусочка, в которой наблюдалось увеличение количества завязавшихся ягод по сравнению с контрольным вариантом опыления на 5,2%. Сравнительно небольшое увеличение показателя (на 1,7%) по сравнению с контролем отмечено и в комбинации Андреевская × Kriviai при опылении пыльцой после ее экспозиции в жидком азоте в течение года (рис. 1).

Высокие и сравнимые по значению величины завязываемости ягод наблюдались в обоих вариантах опыта и при использовании в качестве опылителя сорта ‘Поздняя послевоенная’, несмотря на довольно низкие значения ее исходной жизнеспособности и жизнеспособности после криоконсервирования (см. табл. 2).

Высокая завязываемость ягод по обоим вариантам опыта наблюдалась и при использовании в качестве опылителя сорта ‘Черешнева’ (см. табл. 2, рис. 2); количество завязавшихся ягод при опылении пыльцой после года ее хранения в жидком азоте было лишь на 1,3% ниже, чем при опылении свежесобранной пыльцой.

В комбинации скрещивания Андреевская × Кача завязываемость ягод при опылении пыльцой после криоконсервирования была на 12,1% ниже, чем при опылении свежесобранной пыльцой (вариант II); тем не менее количество завязавшихся ягод (69,2%) было достаточным,

чтобы прийти к заключению об успешном опылении и оплодотворении и в данном случае.

Масса ягоды при опылении пыльцой, хранившейся в жидком азоте, по всем комбинациям скрещивания составила в среднем 0,94 г (см. табл. 2). В зависимости от сорта-опылителя эта величина в варианте I опыта варьировала от 0,69 до 1,05 г, в то время как при опылении свежесобранной пыльцой (вариант II опыления) масса ягоды составила в среднем 1,03 г. В зависимости от сорта-опылителя она находилась в пределах 0,90–1,27 г. Различия по этому показателю в среднем по всем сортам, использованным в качестве опылителей, между обоими вариантами опыта составили 0,09 г.

В зависимости же от сорта между проведенными вариантами опыта наблюдались некоторые различия по величинам данного показателя. Незначительное увеличение средней массы ягоды (на 0,12 г) по сравнению с контролем наблюдалось при опылении пыльцой, хранившейся в жидком азоте, в комбинации скрещивания Андреевская × Черешнева (см. табл. 2, рис. 3, а).

В остальных комбинациях скрещивания величина данного показателя была больше при опылении свежесобранной пыльцой (К), причем если при использовании в качестве опылителя сортов ‘Kriviai’ (рис. 3, б) и ‘Кача’ (рис. 4, а) величины показателя по обоим вариантам опыта различались незначительно (на 0,02 и 0,03 г соответственно), то при опылении свежесобранной пыльцой (К) сортов ‘Поздняя послевоенная’ (рис. 4, б) и ‘Белорусочка’ превышение показателя в контрольном варианте опыления по сравнению с опылением пыльцой после криоконсервирования составило 0,24 и 0,31 г соответственно (см. табл. 2).

Величина семенной продуктивности (среднее число семян в ягоде) при опылении пыльцой после криоконсервирования составила в среднем по всем использованным в качестве опылителей сортам 26 семян на

Таблица 2. Оплодотворяющая способность пыльцы, масса ягоды и семенная продуктивность черной смородины
(НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР», 2020 г.)

Table 2. Fertilizing ability of pollen, fruit weight and seed productivity of black currant
(Pushkin and Pavlovsk Laboratories, 2020)

Опыляемый сорт / Pollinated cultivar	Сорт-опылитель / Pollinator cultivar	Варианты опыления / Pollination options					
		пыльцой после криоконсервирования (I) / pollen after cryopreservation (I)			свежесобранной пыльцой (II) / fresh pollen (II)		
		Завязываемость ягод, % / Fruit setting rate, %	Средняя масса ягоды, г / Mean fruit weight, g	Среднее число семян, шт. / Mean number of seeds, pcs	Завязываемость ягод, % / Fruit setting rate, %	Средняя масса ягоды, г / Mean fruit weight, g	Среднее число семян, шт. / Mean number of seeds, pcs
Андреевская	Белорусочка	93,3 ± 3,3	0,96	28 ± 1,9*	88,1 ± 0,9	1,27	35 ± 2,1*
	Кача	69,2 ± 6,8*	0,99	32 ± 2,2*	81,3 ± 9,4*	1,02	20 ± 2,8*
	Поздняя послевоенная	85,3 ± 1,5	0,69	17 ± 1,9	85,0 ± 1,3	0,93	21 ± 2,1
	Черешнева	92,9 ± 2,4	1,02	23 ± 1,4	94,2 ± 2,5	0,90	27 ± 1,7
	Kriviai	85,7 ± 7,2	1,05	30 ± 1,9	84,0 ± 2,3	1,03	31 ± 2,0
Среднее		85,3	0,94	26,0	86,5	1,03	26,8

* – статистически значимые отличия при $p \leq 0,05$
* – statistically significant differences at $p \leq 0.05$



а)



б)

Рис. 1. Завязываемость ягод в комбинации скрещивания Андреевская × Kriviai:
а) опыление пыльцой после криоконсервирования; б) опыление свежесобранной пыльцой (К)
(НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР», 2020 г.)

Fig. 1. Fruit setting in the crossing combination Andreevskaya × Kriviai:
а) pollination with pollen after cryopreservation; б) pollination with fresh pollen (control)
(Pushkin and Pavlovsk Laboratories of VIR, 2020)



а)



б)

Рис. 2. Завязываемость ягод в комбинации скрещивания Андреевская × Черешнева:
а) опыление пылью после криоконсервирования; б) опыление свежесобранной пылью (К)
(НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР», 2020 г.)

Fig. 2. Fruit setting in the crossing combination Andreevskaya × Cheresheva: а) pollination with pollen after cryopreservation; б) pollination with fresh pollen (control)
(Pushkin and Pavlovsk Laboratories of VIR, 2020)



а) Андреевская × Черешнева
Andreevskaya × Cheresheva



б) Андреевская × Kriviai
Andreevskaya × Kriviai

Рис. 3. Величина ягоды при: I – опылении пылью после криоконсервирования;
II – опылении свежесобранной пылью
(НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР», 2020 г.)

Fig. 3. Fruit size in the case of: I – pollination after cryopreservation;
II – pollination with fresh pollen
(Pushkin and Pavlovsk Laboratories of VIR, 2020)



а) Андреевская × Кача
Andreevskaya × Kacha



б) Андреевская × Поздняя послевоенная
Andreevskaya × Pozdnyaya poslevoennaya

Рис. 4. Величина ягоды при: I – опылении пыльцой после криоконсервирования;
II – опылении свежесобранной пыльцой
(НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР», 2020 г.)

Fig. 4. Fruit size in the case of: I – pollination after cryopreservation;
II – pollination with fresh pollen
(Pushkin and Pavlovsk Laboratories of VIR, 2020)

1 ягоду; при опылении свежесобранной пыльцой – 27 (см. табл. 2).

В целом семенная продуктивность по всем комбинациям скрещивания, за исключением одной (Андреевская × Кача), была больше на 4–7 штук в контрольном варианте опыления. Достоверные различия между вариантами опыта наблюдались лишь у двух сортов – ‘Белорусочка’ и ‘Кача’ (см. табл. 2).

Закключение

После криоконсервирования пыльцы в жидком азоте в течение шести месяцев, как показали проведенные ранее исследования (Tikhonova et al., 2020), наблюдается достоверное увеличение ее жизнеспособности по сравнению с исходными значениями в среднем на 38% у четырех из пяти исследованных сортов.

После 12 месяцев хранения при сверхнизких температурах происходит снижение уровня жизнеспособности пыльцы по сравнению с шестью месяцами хранения, тем не менее по сравнению с исходной жизнеспособностью (К) отмечено увеличение данного показателя в среднем на 11,5% у трех исследованных сортов ‘Черешнева’ (к-42481), ‘Кача’ (к-44185), ‘Kriviai’ (к-42517); у сортов ‘Белорусочка’ (к-41978) и ‘Поздняя послевоенная’ (к-7652) – уменьшение уровня жизнеспособности в среднем на 15%.

Данные, полученные при опылении сорта ‘Андреевская’ пыльцой, хранившейся в жидком азоте (–196°C) в течение 12 месяцев, свидетельствуют о том, что пыльца черной смородины не теряет своей высокой оплодотворяющей способности при длительном ее криоконсервировании (в течение года) при сверхнизких температурах. Уровень жизнеспособности пыльцы после длительного (в течение года) хранения при сверхнизких температурах (–196°C) оказался достаточным для нормального завязывания плодов даже у сортов с низкими значениями показателя, определенными в лабораторных условиях. Завязываемость ягод и средняя их масса высоки

и сопоставимы с контрольным вариантом опыления, а в ряде случаев превышают его. Уровень жизнеспособности пыльцы после длительного (в течение года) хранения при сверхнизких температурах (–196°C) является достаточным для нормального завязывания плодов.

Банк криоконсервирования пыльцы является надежным способом сохранения зародышевой плазмы, но при определении периода сохранения ее в жизнеспособном состоянии необходимо учитывать индивидуальные особенности генотипа; пыльца сортов, теряющих значительный процент жизнеспособности в процессе криохранения, должна регулярно обновляться в целях обеспечения безопасности и стабильности хранения.

Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту № 0662-2020-0004 «Коллекции вегетативно размножаемых культур (картофель, плодовые, ягодные, декоративные, виноград) и их диких родичей ВИР – изучение и рациональное использование».

The research was performed within the framework of the State Task according to the theme plan of VIR, Project No. 0662-2020-0004 “Collections of vegetatively propagated crops (potato, fruit, berry and ornamental crops, grapes) and their wild relatives at VIR: studying and sustainable utilization”.

References / Литература

- Akihama T., Omura M. Preservation of fruit tree pollen. In: Y.P.S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 1. Trees*. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag; 1986. p.101–112.
- Bajaj Y.P.S. Cryopreservation of pollen and pollen embryos, and the establishment of pollen banks. *International Review of Cytology*. 1987;107:397–420. DOI: 10.1016/S0074-7696(08)61083-9

- Borghезan M., Clauman A.D., Steinmacher D.A., Guerra M.P., Orth A.I. *In vitro* viability and preservation of pollen grain of kiwi (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev.) A. Chev.). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 2011;11(4):338-344. DOI: 10.1590/S1984-70332011000400007
- Connor K.F., Towill L.E. Pollen-handling protocol and hydration/dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage. *Euphytica*. 1993;68:77-84. DOI: 10.1007/BF00024157
- Ganeshan S. Cryogenic preservation of grape (*Vitis vinifera* L.) pollen. *Vitis*. 1985;24(3):169-173. DOI: 10.5073/vitis.1985.24.169-173
- Knowlton H.E. Studies in pollen with special reference to longevity. *Memoir – Cornell University Agricultural Experiment Station*. 1922;52:751-793.
- Kozaki H., Omura M., Matsuta N., Moriguchi T. Germplasm preservation of fruit trees. In: *Preservation of Plant Genetic Resources*. Tokyo: JICA; 1988. p.65-74.
- Manzhulin A.V., Yashina I.M. Preservation of potato pollen under ultralow temperatures (Khraneniye pyltsy kartofelya pri sverkhznizkikh temperaturakh). *Agricultural Biology*. 1984;(4):56-59. [in Russian]. [Манжулин А.В., Яшина И.М. Хранение пыльцы картофеля при сверхнизких температурах. *Сельскохозяйственная биология*. 1984;19(4):56-59].
- Maryam, Jaskani M.J., Naqvi S.A. Storage and viability assessment of date palm pollen. *Methods in Molecular Biology*. 2017;1638:3-13. DOI: 10.1007/978-1-4939-7159-6_1
- Mercier S. The role of a pollen bank in the Tree Genetic Improvement Program in Québec (Canada). *Grana*. 1995;34(6):367-370. DOI: 10.1080/00173139509429468
- Parfitt D.E., Almehti A.A. Cryogenic storage of grape pollen. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1983;34(4):227-228.
- Parfitt D.E., Almehti A.A. Cryogenic storage of olive pollen. *Fruit Varieties Journal*. 1984a;38(1):14-16.
- Parfitt D.E., Almehti A.A. Liquid nitrogen storage of pollen from five cultivated *Prunus* species. *HortScience*. 1984b;19(1):69-70.
- Pavlov A.V., Verzhuk V.G., Orlova S.Yu., Radchenko O.E., Erastenkova M.V., Dodonova A.Sh. et al. Cryopreservation as a method to preserve some fruit and berry crops and wild medicinal plants. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2019;29(1):44-57. [in Russian] (Павлов А.В., Вержук В.Г., Орлова С.Ю., Радченко О.Е., Ерастенкова М.В., Додонова А.Ш. и др. Криоконсервирование как метод сохранения биоразнообразия плодово-ягодных культур и дикорастущих лекарственных растений. *Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2019;29(1):44-57). DOI: 10.15407/cryo29.01.044
- Ren R., Li Z., Li B., Xu J., Jiang X., Liu Y. et al. Changes of pollen viability of ornamental plants after long-term preservation in a cryopreservation pollen bank. *Cryobiology*. 2019;89:14-20. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2019.07.001
- Tikhonova O.A., Gavrilova O.A., Radchenko E.A., Verzhuk V.G., Pavlov A.V. Viability of black currant pollen before and after cryopreservation in liquid nitrogen, and its morphological features *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2020;181(3):110-119. [in Russian] (Тихонова О.А., Гаврилова О.А., Радченко Е.А., Вержук В.Г., Павлов А.В. Жизнеспособность пыльцы черной смородины до и после ее криоконсервирования в жидком азоте и особенности ее морфологии. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2020;181(3):110-119). DOI: 10.30901/2227-8834-2020-3-110-119
- Verzhuk V., Safina G., Tikhonova N., Shubin N. Viability of fruit crop scions and apple pollen stored at low and ultralow temperatures (cryopreservation). *Agriculture*. 2002;78(2):283-288.
- Zhang L.X., Chang W.C., Wei Y.J., Liu L., Wang Y.P. Cryopreservation of ginseng pollen. *HortScience*. 1993;28(7):742-743. DOI: 10.21273/HORTSCI.28.7.742

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of financial activities

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

The authors declare the absence of any financial interest in the materials or methods presented.

Для цитирования / How to cite this article

Тихонова О.А., Радченко Е.А., Павлов А.В. Репродуктивная способность сортов черной смородины после криоконсервирования пыльцы в жидком азоте. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2021;182(4):71-78. DOI: 10.30901/2227-8834-2021-4-71-78

Tikhonova O.A., Radchenko E.A., Pavlov A.V. Reproductive ability of black currant cultivars after pollen cryopreservation in liquid nitrogen. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2021;182(4):71-78. DOI: 10.30901/2227-8834-2021-4-71-78

ORCID

Tikhonova O.A. <https://orcid.org/0000-0002-0319-1477>

Radchenko E.A. <https://orcid.org/0000-0002-3015-4735>

Pavlov A.V. <https://orcid.org/0000-0003-4319-0353>

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information

Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2021-4-71-78>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employer

Авторы одобрили рукопись / The authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest