

УДК: 634.232:634.21:581.162.
41:57.086.13

**М. Н. Ситников,
В. Г. Вержук,
А. В. Павлов,
Д. Д. Бондарук**

Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт генетических
ресурсов растений имени Н. И.
Вавилова,
190000 Россия, г. Санкт-Петербург,
ул. Б. Морская, д. 42, 44
e-mail: genetik@mail.ru

Ключевые слова:

криоконсервация, сверхнизкие
температуры, абрикос, черешня,
пыльца, сохранение
биоразнообразия

Поступление:
06.06.2018

Принято:
19.09.2018

АНАЛИЗ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПЫЛЬЦЫ АБРИКОСА И ЧЕРЕШНИ ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

Криоконсервация позволяет снизить до минимума потерю ценных образцов и сократить материальные затраты на поддержание растительных ресурсов. Использование метода длительного хранения пыльцы в криобанках дает возможность сохранять жизнеспособные пыльцевые зерна неограниченное время. В ходе исследования проведена работа по криоконсервации пыльцы растений косточковых культур и изучена жизнеспособность пыльцы после воздействия сверхнизких температур (-196°C) в лабораторных условиях. Исследования проводились на растениях абрикоса *Armeniaca vulgaris* Lam. и черешни *Cerasus avium* (L.) Moench, с которых собиралась пыльца. Оценку жизнеспособности в лабораторных условиях проводили путем проращивания на различных питательных средах. Показана возможность длительного сохранения пыльцы в парах жидкого азота с сохранением ее fertильности. На основе полученных результатов создается коллекция пыльцы для реализации различных селекционных программ.

**M. N. Sitnikov,
V. G. Verzhuk,
A. V. Pavlov,
D. D. Bondaruk**

N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant
Genetic Resources,
42, 44, Bolshaya Morskaya St.,
St. Petersburg, 190000, Russia,
e-mail: genetik@mail.ru

Key words:
криопreservation, ultra-low
температуры, абрикос, sweet cherry,
пыльца, биоразнообразия

Received:
06.06.2018

Accepted:
19.09.2018

THE ANALYSIS OF APRICOT AND SWEET CHERRY POLLEN VIABILITY AFTER CRYOPRESERVATION

Cryopreservation minimizes the risk of losing valuable accessions and reduces the material costs of plant resources maintenance. By using the method of pollen long-term storage in cryobanks, it is possible to keep pollen grains viable for an unlimited time. In the course of the research, cryoconservation of pollen of stone fruit crops was performed and pollen viability was checked after exposure to ultra-low temperatures (-196°C) under laboratory conditions. The studies were carried out on apricot (*Armeniaca vulgaris* Lam.) and sweet cherry (*Cerasus avium* (L.) Moench) plants, from which pollen was collected. Evaluation of viability in laboratory conditions was carried out by germination on various nutrient media. The possibility of long-term pollen preservation in liquid nitrogen vapor is shown. Based on the results obtained, a collection of pollen is being created for implementing various breeding programs.

Введение

В условиях изменяющегося климата и интенсификации сельскохозяйственного производства остро встает вопрос сохранения генофонда культурных растений – как одного из важнейших компонентов в сохранении природного биоразнообразия. Ухудшение почвенно-климатических условий, вследствие мощного антропогенного воздействия на окружающую среду, является негативным фактором не только для растений, но и человека. Число организмов, вовлеченных в молекулярно-генетические исследования, ограничено, однако, многие из пока неизученных видов обладают ценными генетическими свойствами, которые человек может использовать в будущем. В этом отношении актуальность использования методов криоконсервации, дающих возможность длительного сохранения генофонда ценных видов растений, не вызывает сомнения. Криогенное хранение позволяет снизить до минимума потерю ценных образцов и сократить материальные затраты на поддержание растительных ресурсов. Создание оптимальных условий для сохранения фертильности пыльцы на период от сбора до ее применения, особенно длительное время, необходимо в селекционных целях. Постоянное наличие достаточного количества разнообразной пыльцы с высокой жизнеспособностью и фертильностью облегчает проведение работ по гибридизации, позволяет опылять растения, находящихся на значительном удалении или цветущих в разное время года; при промышленном производстве возможно сокращение площадей, занимаемых сортами-опылителями.

Использование метода длительного хранения пыльцы в криобанках дает возможность сохранять жизнеспособные пыльцевые зерна в таком количестве, сколько потребуется для круглогодичного обеспечения и широкого обмена генетическим фондом как внутри страны, так и за ее пределами (Dzyubenko, Verzhuk, 2016).

Целью нашей работы была оценка жизнеспособности пыльцы косточковых культур после хранения в жидком азоте (-196°C). Для достижения поставленной цели решались следующие задачи: сбор пыльцы абрикоса и черешни в период интенсивного цветения; подготовка и замораживание пыльцы в жидком азоте при температуре -196°C ; размораживание пыльцы и проверка жизнеспособности в лабораторных условиях.

Материалы и методы исследования

Исследования проводили на растениях абрикоса *Armeniaca vulgaris* Lam. двух сортов: ‘Шалах’ и ‘Краснощекий’, которые очень активно используются в селекции для создания высокопродуктивных и засухоустойчивых сортов и на растениях черешни *Cerasus avium* (L.) Moench следующих сортов: ‘Волшебница’, ‘Французская черная’, ‘Одесская черная’.

Сорта абрикоса: ‘Краснощекий’ – основной промышленный, столовый и консервный сорт Украины, Молдавии, Северного Кавказа и Крыма В 1936–1938 гг. он был выделен как перспективный сорт по своей урожайности, крупным размерам и оригинальным качествам плодов. В сравнении с другими сортами абрикоса отличается выносливостью, неприхотливостью, холодостойкостью (Smykov, Savvina, 1989).

‘Шалах’ (‘Еревани’) – десертный армянский сорт народной селекции, культивируемый в Армении на половине всей площади насаждений абрикоса, пользующийся очень широкой популярностью как отличный столовый

и консервный сорт, с крупными красивыми плодами высоких вкусовых качеств. В Никитский ботанический сад этот сорт был завезен еще до Октябрьской революции, но в производственное испытание в других районах юга СССР передан лишь в 1934–1937 гг. Первые плоды дает на пятый-шестой год. С дерева снимают до 30–35 кг плодов. Плоды среднего размера (25 г), округлой формы, светло-оранжевые. Мякоть сочная, сладкого, приятного вкуса (Smykov, 1983).

Сорт черешни: ‘Волшебница’ – сорт селекции Северо-Кавказского зонального научно-исследовательского института садоводства и виноградарства (г. Краснодар). Получен путем направленной селекции от опыления сортов ‘Дрогана желтая’ и ‘Французская черная’. Автор Е. М. Алексина. Принят и проходит государственное испытание в Северо-Кавказском регионе с 2005 г. Сорт универсального использования, в технической переработке используется для приготовления компота, сухофруктов, заморозки (Katalog ..., 1979).

‘Французская черная’ – западноевропейский сорт неустановленного происхождения. Районирован в 1959 г., допущен к использованию в производстве по Северо-Кавказскому региону. Наиболее распространенный в Краснодарском kraе сорт, позднего срока созревания. Назначение плодов универсальное, обладает хорошими десертными качествами плодов, дает высококачественную продукцию при технической переработке и заморозке (Kolesnikov, 1959).

‘Одесская черная’ – распространен и был районирован в Молдавии и южных областях Украины, Узбекистане. Сорт размножен в Одесском питомнике. Созревание среднепозднее. В пору плодоношения вступает рано. Урожайность высокая. Положительные качества: высокая урожайность, крупная величина плодов. Недостаток сорта: при дождях плоды быстро трескаются и загнивают. (Katalog vitrovoi..., VIR, 1982)

Методика исследования. Сбор пыльцы исследуемых сортов проводили в период интенсивного цветения. Затем пыльцевые зерна подсушивали в течение двух дней в помещении при температуре +25...+30°C. Окончание сушки можно определить по следующим признакам: во-первых, обножка представлена отдельными твердыми комочками, которые можно с трудом раздавить; во-вторых, при высыпании пыльцы на фанеру с высоты 20–25 сантиметров можно услышать звонкий звук падающих зерен (Bogotova, Sitnikov et al., 2016).

Подсушенные пыльцевые зерна замораживали в жидким азоте (-196°C) непосредственным погружением в азот в специальных криопробирках. Экспозиция в азоте составляла двое суток (Verzhuk, Tikhonova, Zhestkov, 2005). Затем пыльцевые зерна размораживали на воздухе при комнатной температуре. В процессе хранения замороженной пыльцы необходимо строго соблюдать постоянную температуру, не допускать полного испарения жидкого азота, оберегать от механической тряски. Важное значение имеет режим оттаивания, который можно проводить несколькими способами: извлечением из жидкого азота и переносом в воду с температурой +38...+40°C; переносом непосредственно из жидкого азота на воздух; быстрым прохождением температурного диапазона от -196°C до -50°C с последующим переходом до 0°C. При необходимости после хранения в жидким азоте доведенную до 0°C пыльцу можно хранить в течение нескольких дней в холодильнике в эксикаторе с хлористым кальцием (Program and methods..., 1999).

Замораживание при ультразвуковых температурах (-196°C) обеспечивает хранение биологических материалов неограниченно долгое время, а так как при температуре жидкого азота прекращается деление клеток и метаболическая активность, в них не происходит генетических изменений (Hao et al., 2001, Kiseleva,

Verzhuk, 2012). На сегодня криоконсервация считается единственной приемлемой технологией для долговременного, надежного, низкозатратного хранения различных категорий растительного материала, включая семена, каллусы, протопласты, зиготические и соматические эмбриоиды, супензионные клетки, гаметы и меристемы (Engelmann, 2011).

Лабораторное определение относительной жизнеспособности пыльцы исследуемых сортов после криоконсервации проводили методом проращивания ее на искусственных питательных средах с градиентным содержанием сахарозы. Процент жизнеспособности пыльцы определяли отношением количества проросших пыльцевых зерен к общему количеству пыльцевых зерен в наблюдаемой выборке. Выборка составила 200 пыльцевых зерен не менее чем в трех полях зрения.

Пыльцу после криоконсервации проверяли на жизнеспособность путем проращивания в питательной среде с агарозой (1%) и сахарозой разной концентрации вместе с исходной пыльцой, собранной с тех же растений. В трех вариантах опыта концентрация сахарозы составляла 5, 10, 15% соответственно.

Результаты и обсуждение

Жизнеспособность пыльцы абрикоса. Анализ жизнеспособности пыльцы абрикоса сорта ‘Краснощекий’ после замораживания до сверхнизкой температуры и последующего оттаивания проводили путем проращивания на питательной среде, было показано, что при 15% концентрации сахарозы жизнеспособность сохраняют 33% пыльцевых зерен. При использовании в качестве субстрата питательной среды с концентрацией сахарозы 10% проросло 47,5% пыльцевых зерен. Для абрикоса сорта ‘Краснощекий’ максимальное прорастание пыльцы наблюдалось на питательной среде с концентрацией сахарозы 5%, где проросло 50% пыльцевых зерен, прошедших криоконсервацию (табл. 1).

Таблица 1. Жизнеспособность пыльцы сортов абрикоса после воздействия сверхнизких температур (-196°C), %

Table 1. Viability of pollen of apricot varieties after exposure to ultra-low temperatures (-196°C), %

Концентрация питательной среды Concentration of the nutrient medium	Название сорта Variety name			
	Краснощекий		Шалах	
	Исходная Before	После криоконсервации After cryopreservation	Исходная Before	После криоконсервации After cryopreservation
	60%	50%	37,5%	34%
10%	56%	47,5%	50%	47,2%
15%	38%	33%	50%	41%

HCP₀₅= 2,4

В опытном варианте с сортом ‘Шалах’ были получены следующие результаты: на питательной среде с концентрацией сахарозы 5% проросло только 34% пыльцевых зерен. На питательной среде с концентрацией сахарозы 15% проросло 40% пыльцевых зерен. Для абрикоса сорта ‘Шалах’ оптимальной являлась питательная среда с концентрацией сахарозы 10%, где проросло максимальное количество пыльцы 47,2%.

Жизнеспособность пыльцы черешни. При подсчете проросших пыльцевых зерен сортов черешни, участвовавших в эксперименте на питательной среде с 5% концентрацией сахарозы можно отметить, что наилучшую жизнеспособность имеет пыльца сорта ‘Французская черная’, затем следует сорт ‘Волшебница’, показывающий хорошую прорастаемость пыльцы. Сорт ‘Одесская черная’ имеет удовлетворительную прорастаемость в контроле, но она несколько снижается после воздействия сверхнизких температур.

На питательной среде с 10% содержанием сахарозы лучшую жизнеспособность проявляет пыльца сорта ‘Волшебница’, у которого разница между контролем и вариантом после криогенного воздействия несущественна. Затем следует сорт ‘Французская черная’, у которого наблюдается некоторое снижение жизнеспособности пыльцы экспериментального варианта по сравнению с контрольным. У сорта ‘Одесская черная’ на питательной среде с 10% содержанием сахарозы лучше, чем исходная, прорастает пыльца, подвергшаяся воздействию сверхнизких температур.

Для сорта ‘Одесская черная’, у которого практически одинаковую прорастаемость показывает свежесобранная пыльца и пыльца, хранившаяся при сверхнизких температурах, 15% содержание сахарозы в питательной среде является оптимальным. Пыльца сортов ‘Французская черная’ и ‘Волшебница’ также имеет высокую жизнеспособность, но у них наблюдается некоторая депрессия в прорастании пыльцы после хранения в парах жидкого азота (-196°C).

Анализируя данные, представленные в таблице 2, можно сделать заключение, что наибольшей способностью к прорастанию независимо от концентрации сахарозы в питательной среде обладает сорт ‘Французская черная’. Пыльца этого сорта показывает жизнеспособность на уровне 85–89%. Наилучшая среда для прорастания пыльцы сорта ‘Волшебница’ – с 10%-м содержанием сахарозы. На этой питательной среде показатель жизнеспособности пыльцы максимален. Для сорта ‘Одесская черная’ оптимальным явились 15%-е содержание сахарозы в питательной среде, при котором экспериментальный вариант показывает способность к прорастанию на уровне контроля.

Таблица 2. Жизнеспособность пыльцы сортов черешни после воздействия сверхнизких температур (-196°C), %

Table 2. Viability of pollen of cherry varieties after exposure to ultralow temperatures (-196°C), %

Концентрация питательной среды Concentration of the nutrient medium	Название сорта Variety name					
	Волшебница		Французская черная		Одесская черная	
	Исходная Before	После криоконсервации After cryo-preservation	Исходная Before	После криоконсервации After cryo-preservation	Исходная Before	После криоконсервации After cryo-preservation
5%	79,3	76,4	88,4	85,3	64,2	61,2
10%	91,2	90,8	89,3	85,8	82,1	87,6
15%	87,6	84,3	86,5	82,7	89,4	89,7

HCP₀₅ = 1,7

Выводы

Проверка жизнеспособности пыльцы абрикоса на питательных средах с градиентным содержанием сахарозы показала, что пыльца сорта ‘Краснощекий’ наиболее жизнеспособна на питательной среде с концентрацией 5%.

Жизнеспособность пыльцы сорта ‘Шалах’ оказалась наивысшей на среде с концентрацией 10%.

Наилучшую жизнеспособность у черешни на питательной среде с 5% концентрацией сахарозы имеет пыльца сорта ‘Французская черная’, затем следует сорт ‘Волшебница’. На питательной среде с 10% содержанием сахарозы лучшую жизнеспособность проявляет сорт ‘Волшебница’, затем следует сорт ‘Французская черная’. У сорта ‘Одесская черная’ по сравнению с контролем на данной питательной среде лучше прорастает пыльца, подвергшаяся воздействию сверхнизких температур. Сорт ‘Одесская черная’ на питательной среде с 15% концентрацией сахарозы показывает практически одинаковую прорастаемость свежесобранный пыльцы и пыльцы, хранившейся при сверхнизких температурах. Сорта ‘Французская черная’ и ‘Волшебница’ также имеют высокую жизнеспособность, но у них наблюдается некоторое снижение в прорастании пыльцы после хранения в парах жидкого азота (-196°C).

На основе полученных результатов можно рекомендовать метод прямого замораживания в жидким азоте пыльцы плодовых растений для длительного хранения с последующим ее использованием в селекционных программах.

*Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по теме № 0662-2018-0004 «Совершенствование стратегии, теории, методов и технологий *ex situ* хранения генетических ресурсов растений без потери их жизнеспособности», номер государственной регистрации ЕГИСУ НИОКР AAAA-A16-116040710363-2.*

References/Литература

- Bogotova Z. I., Sitnikov M. N., Sherieva S. A., Zamburova D. S., Gidova E. M., Paritov A. Yu., Khandokhov T. Kh., Karmokova M. K. Study of pollen viability in fruit crops after exposure to ultralow temperatures (Izuchenie zhiznesposobnosti pyltsy plodovykh kultur posle vozdeystviya sverkhnizkikh temperatur) // Modern Problems of Science and Education (Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya), 2016, no. 3 [Electronic resource]. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24849> (date of referencing: 18.03.2017) [in Russian] (Боготова З. И., Ситников М. Н., Шериева С. А., Замбурова Д. С., Гидова Э. М., Паритов А. Ю., Хандохов Т. Х., Кармокова М. К. Изучение жизнеспособности пыльцы плодовых культур после воздействия сверхнизких температур // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 3). [Электронный ресурс]. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24849> (дата обращения: 18.03.2017).
- Dzyubenko N. I., Verzhuk V. G., Pavlov A. V., Shubin N. A. Development and utilization of modern technologies in conservation of fruit and berry plant genetic diversity at VIR using plant cryoconservation techniques (Razrabotka i ispolzovaniye sovremennoy tekhnologiy sokhraneniya genofonda plodovo-yagodnykh kultur VIR s pomoshchyu metodov kriokonservatsii rasteniy) // In: Annual meeting of the Society of Plant Physiologists of Russia. Signal Systems of Plants: from the Receptor to the Organism»s Response (Godichnoye sobraniye Obshestva fiziologov Rossii. Signalnye sistemy rasteniy: ot reseptora do otvetnoy reaktsii organizma). Society of Plant Physiologists of Russia; N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Industry; St. Petersburg State University, 2016, pp. 421–422 [in Russian] (Дзюбенко Н. И., Вержук В. Г., Павлов А. В., Шубин Н. А. Разработка и использование современных технологий сохранения генофонда плодово-ягодных культур ВИР с помощью методов криоконсервации растений / Сб. Годичное собрание общества физиологов растений России. Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма. Общество физиологов растений России; Всероссийский институт растениеводства имени Н. И. Вавилова; Санкт-Петербургский государственный университет. 2016. С. 421–422).
- Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2011, vol. 4, pp. 5–16.
- Hao Y. J., Liu Q. L., Deng X. X. Effect of Cryopreservation on Apple Genetic Resources at Morphological, Chromosomal, and Molecular Levels // Cryobiologie. 2001, vol. 43, pp. 46–53.

- Katalog mirovoy kolleksii VIR / Malorasprostranennye v SSSR sorta chereshni i vishni.* Leningrad, 1982, iss. 334, 44 p. [in Russian] (Каталог мировой коллекции ВИР / Малораспространенные в СССР сорта черешни и вишни. Л., 1982. Вып. 334. 44 с.).
- Katalog mirovoy kolleksii VIR / Sorta chereshni i vishni,* vyp. 250, P.11, Leningrad, 1979 [in Russian] (Каталог мировой коллекции ВИР / Сорта черешни и вишни. Л., 1979. Вып. 250., 11 с.).
- Kiseleva A. A., Verzhuk V. G., Savelyev N. I., Dorokhov D. S., Zheltikov Yu. V., Yeremina O. V., Potokina E. K., Dzyubenko N. I.* Methods for monitoring genetic stability in fruit crops during cryoconservation // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding, 2012, vol. 169, pp. 280–288 [in Russian] (Киселева А. А., Вержук В. Г., Савельев Н. И., Дорохов Д. С., Желтиков Ю. В., Еремина О. В., Потокина Е. К., Дзюбенко Н. И. Методы мониторинга генетической стабильности плодовых культур в условиях криоконсервации. // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2012. Т. 169. С. 280–288).
- Kolesnikov M. A. Chereshnya,* Moscow, 1959. 83 p. [in Russian] (Колесников М. А., Черешня. Москва, 1959. 83 с.).
- Program and methods of variety-specific study of fruit, berry and nut crop plants* (Programma i metodika sortoizucheniya plodovykh, yagodnykh i orekhoplodnykh kultur). Orel : VNIISPK, 1999, 608 p. [in Russian] (Программа и методика сортовидного изучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур. Орел : ВНИИСПК, 1999. 608 с.).
- Smykov V. K. Abrikos* // In: *Dostizheniya selektsii plodovykh kultur i vinograda* /eds. I. P. Kalinkina, X. K. Enikeev. Moscow : Kolos, 1983, p. 154 [in Russian] (Смыков В. К. Абрикос // В кн.: Достижения селекции плодовых культур и винограда / под ред. И. П. Калинкиной и Х. К Еникеева. М. : Колос, 1983. С. 154).
- Smykov V. K., Savvina T. M., Isakova M. D. Abrikos* / ed. V. K. Smykov, Moscow : Agropromizdat, 1989 pp.108–109 [in Russian] (Смыков В. К., Саввина Т. М., Исакова М. Д. Абрикос / под ред. В. К. Смыкова, Москва : Агропромиздат, 1989. С. 108–109).
- Verzhuk, V. G., Tikhonova N. G., Zhestkov A. S.* Viability of pollen of fruit crops after low-temperature storage and cryopreservation. Problems of Cryobiology, Kharkov, 2005, vol. 15, no. 3, pp. 302–305 [in Russian] (Вержук В. Г., Тихонова Н. Г., Жестков А. С. Жизнеспособность пыльцы плодовых культур после низкотемпературного хранения и криоконсервации. Проблемы криобиологии. Харьков, 2005. Т. 15, № 3. С. 302–305).