

ВОЗДЕЙСТВИЕ ФИТОГОРМОНОВ И ОСВЕЩЕННОСТИ НА ПРОРАСТАНИЕ ПЫЛЬЦЫ ЯБЛОНИ СО СНИЖЕННОЙ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬЮ

DOI: 10.30901/2227-8834-2019-4-27-31

УДК 634.11:581.162.41:581.192.7

Поступление/Received: 18.09.2019

Принято/Accepted: 29.11.2019

А. В. ПАВЛОВ¹, В. Г. ВЕРЖУК¹, Д. Д. БОНДАРУК²

¹ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44; ✉ pavlov.al@bk.ru; vverzhuk@mail.ru

² Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

THE EFFECT OF PHYTOHORMONES AND LIGHT ON THE GERMINATION OF APPLE POLLEN WITH REDUCED VIABILITY

A. V. PAVLOV¹, V. G. VERZHUK¹, D. D. BONDARUK²

¹N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia; ✉ pavlov.al@bk.ru; vverzhuk@mail.ru

² St. Petersburg State University, 7–9 Universitetskaya Emb., St. Petersburg 199034, Russia

Актуальность. Исследование влияния фитогормонов и освещенности на прорастание пыльцы яблони со сниженной жизнеспособностью на искусственной питательной среде актуально, так как позволяет повысить процент прорастания ценных для селекции образцов после длительного низкотемпературного хранения. **Материалы и методы.** Жизнеспособность пыльцы сорта яблони 'Краснолистная' определяли методом проращивания на искусственной питательной среде, содержащей 10% сахарозы и 0,8% агар-агара. На поверхность питательной среды наносили капли суспензии пыльцы в дистиллированной воде с добавлением фитогормонов. Пыльцу проращивали в темноте (24 часа в термостате при 21°C) и на свету (в световой установке при температуре 21°C фотопериод 16 ч свет/8 ч темнота). **Результаты.** Пыльца со сниженной жизнеспособностью сорта 'Краснолистная' наиболее эффективно проросла при применении гиббереллина в концентрации 1 мг/л и 10 мг/л: процент прорастания составил 22,3±0,8% и 21,8±1,3% соответственно (контроль – 10,9±1,5%). Наиболее эффективное сочетание фитогормонов: гиббереллин 10 мг/л + кинетин 10 мг/л, процент прорастания 22,8±6,3%; кинетин 1 мг/л + индолилмасляная кислота 1 мг/л – процент прорастания 17,5±5,9% против 10,9±1,5% в контроле. **Заключение.** Выявлено достоверное влияние фитогормонов на прорастание пыльцы яблони со сниженной жизнеспособностью. Определены эффективные концентрации и сочетания фитогормонов, способствующие прорастанию пыльцы с пониженной жизнеспособностью. Освещенность не влияет на прорастание пыльцы с пониженной жизнеспособностью.

Ключевые слова: жизнеспособность пыльцы, процент прорастания.

Background. Studying the effect of phytohormones and light on the germination of apple pollen with reduced viability on an artificial nutrient medium is of importance, because it may facilitate an increase in the germination percentage among plant samples promising for breeding after their long-term preservation under low temperatures. **Materials and methods.** Pollen viability of the apple-tree cultivar 'Krasnolistnaya' was measured by germinating it on an artificial nutrient medium containing 10% sucrose solution and 0.8% agar. Drops of a distilled water suspension of pollen with added phytohormones were applied to the surface of the nutrient medium. Pollen was germinated in the dark (24 hours in a thermostat at 21°C) and under light (in an artificial light chamber at 21°C with a photoperiod of 16 hours of light / 8 hours of darkness). **Results.** Pollen of cv. 'Krasnolistnaya' with reduced viability most effectively germinated with the use of gibberellin at a concentration of 1 mg/l and 10 mg/l: the germination percentage was 22.3±0.8% and 21.8±1.3% respectively (cf. 10.9±1.5% in the reference). The most effective combination of phytohormones was gibberellin 10 mg/l + kinetin 10 mg/l – the percentage of germination was 22.8±6.3%; kinetin 1 mg/l + indolylbutyric acid 1 mg/l – the percentage of germination was 17.5±5.9% vs. 10.9±1.5% in the reference. **Conclusion.** Phytohormones were observed to have a significant effect on the germination of apple pollen with reduced viability. Effective concentrations and combinations of phytohormones that promote the germination of pollen with reduced viability have been identified. Light does not affect the germination of pollen with reduced viability.

Key words: pollen viability, germination percentage.

Введение

Периодически случаются годы с аномально неблагоприятными погодными условиями, при которых в процессе созревания формируется пыльца плодовых культур с пониженной жизнеспособностью, а при длительном хранении в течение нескольких лет даже качественная пыльца теряет значительную часть своей способности к восстановлению. Вследствие этого воз-

никает необходимость разрабатывать способы повышения процента прорастания пыльцы со сниженной жизнеспособностью. *Цель работы* – реанимация пыльцы, сформированной при неблагоприятных условиях, и повышение процента прорастания пыльцы после длительного низкотемпературного хранения. Жизнеспособность пыльцы можно определять различными методами: проращиванием на искусственной среде, окрашиванием ацетокармином, по активности перок-

сидазы и дегидрогеназ в пыльце (Golubinsky, 1974; Nesterov, 1986; Manzhulin, Yashina, 1984), а также наблюдением за ее прорастанием непосредственно на рыльцах пестиков по методике А. С. Татаринцева (Tatarintsev, 1959). Однако наиболее широко распространено определение жизнеспособности пыльцы путем ее проращивания на искусственной среде, содержащей сахарозу. Для проращивания пыльцы различных культур нужны разные концентрации сахарозы в среде: для цитрусовых и винограда – 20% (Reed, 2008), для груши – 15% (Girichev et al., 2012), томатов, картофеля, огурцов – 24% (Brezhnev et al., 1970). Оптимальной концентрацией сахарозы в среде для проращивания пыльцы яблони, по нашим данным, является 10% (Verzhuk et al., 2017).

Но не только от концентрации сахарозы зависят показатели жизнеспособности пыльцы. Пыльца разных видов и сортов плодовых культур по-разному прорастает на свету и в темноте (Verzhuk et al., 2017). Так, в литературе немало сведений о влиянии света на прорастание пыльцы. По данным И. Н. Голубинского, пыльца отдельных видов растений по-разному относится к свету и его интенсивности во время прорастания: для прорастания пыльцы многих видов свет не имеет значения, в то же время пыльца тыквенных, томатов и особенно зверобоя гораздо лучше прорастает на свету, чем в темноте (Golubinsky, 1974).

Поскольку ранее (Pavlov et al., 2018) было показано положительное влияние фитогормонов и освещенности на прорастание качественной пыльцы яблони, хранившейся при -18°C , для решения поставленной задачи применили обработку состаренной пыльцы с пониженной жизнеспособностью регуляторами роста растений (фитогормонами), принадлежащими к трем основным группам (кинетины, гиббереллины, ауксины), в различных сочетаниях и по отдельности, одновременно с проращиванием пыльцы на свету и в темноте.

Материалы и методы исследований

Объектом исследования являлась пыльца яблони (*Malus Mill.*) сорта 'Краснолистная' (*M. sieversii* (Ledeb.) M. Roem. var. *niedzwetzkyana* (Dieck) Likh.). (Vitkovsky, 2003). Сорт 'Краснолистная' представляет интерес как хороший опылитель и источник антоцианов. Известно, что растения с повышенным содержанием антоцианов служат исходным материалом для выведения сортов, устойчивых к болезням, а также морозостойких сортов.

Отбор пыльцы сорта 'Краснолистная' проводился в коллекционном саду научно-производственной базы «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» Федерального исследовательского центра Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР) в период с середины мая по конец июля 2016 года. С деревьев собирали от 150 до 250 хорошо развитых бутонов до их раскрытия, после чего в лаборатории длительного хранения генофонда растений отделяли пыльники при помощи скальпеля. Образцы пыльцы вместе с пыльниками подсушивали в течение двух-трех суток при температуре $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ до сыпучего состояния (Manzhulin, Yashina, 1984) и помещали в холодильник в герметичных криопробирках на низкотемпературное хранение при температуре -18°C . Жизнеспособность пыльцы определяли методом проращивания на искусственной питательной среде, содержащей 10% сахарозы и 0,8% агар-агара. Проросшей считали пыльцу с длиной пыльцевой трубки, превышающей диаметр пыльцевого зерна (Verzhuk, et al., 2017). На поверхность питательной среды в чашке Петри наносили 6–8 капель суспензии пыльцы в дистиллированной воде с добавлением каждого фитогормона в концентрации (вариант 1) 1 мг/л, и (вариант 2) 10 мг/л. Указанные концентрации явля-

Таблица 1. Примененные фитогормоны, их сочетания и концентрации
Table 1. The applied phytohormones, their combinations and concentrations

Фитогормоны, их сочетания / Phyto-hormones, their combinations	Варианты опыта / Experiment options	Концентрации фитогормонов (мг/л) / Concentrations of phytohormones (mg/l)
гиббереллин АЗ (Гб АЗ)	1	1
	2	10
кинетин (кин.)	1	1
	2	10
индолилмасляная кислота (ИМК)	1	1
	2	10
Гб АЗ + кинетин	1	1 + 1
	2	10 + 10
Гб АЗ + ИМК	1	1 + 1
	2	10 + 10
кин. + ИМК	1	1 + 1
	2	10 + 10
Гб АЗ + ИМК + кин.	1	1 + 1 + 1
	2	10 + 10 + 10

ются конечными концентрациями в смеси фитогормонов. Выбор примененных наиболее физиологически значимых концентраций фитогормонов обусловлен литературными и ранее полученными экспериментальными данными (Golubinsky, 1974; Pavlov et al., 2018).

В контрольных вариантах суспензию пыльцы готовили на дистиллированной воде без добавления фитогормонов. Учет и фотофиксацию проросших пыльцевых зерен проводили через 24 часа с использованием цифрового микроскопа Motic BA 300, оборудованного фотонасадкой и соответствующим пакетом компьютерных программ при 100-кратном увеличении (в каждой чашке проводили съемку 5 случайных полей зрения в каждой капле).

Для получения пыльцы сорта 'Краснолистная' со сниженной жизнеспособностью (аналогичной пыльце после длительной низкотемпературного хранения или после формирования в саду при неблагоприятных погодных условиях) образцы пыльцы помещали в термостат при $+21\pm 1^\circ\text{C}$ на 12 часов; при этом жизнеспособность снижалась в 2 раза. Так, исходная жизнеспособность состаренной пыльцы составила $9,8\pm 1,5\%$ на свету (18% – исходная, не состаренная пыльца) и $9,6\pm 1,4\%$ в темноте ($24,3\%$ – исходная, не состаренная пыльца); в нормальных условиях процент прорастания исходной, не состаренной пыльцы яблони сорта 'Краснолистная' в темноте выше, чем на свету (Pavlov et al., 2018). Таким образом, влияние фитогормонов было протестировано на пыльце с уровнем жизнеспособности, сниженным в 2 раза по сравнению с исходной.

Для изучения влияния света на прорастание пыльцы с пониженной жизнеспособностью каждую исследуемую концентрацию фитогормонов рассматривали при двух режимах проращивания пыльцы – на свету и в темноте. Проращивание на свету проводили в течение суток в термостатируемой световой установке при освещенности 8000 люкс и температуре $21\pm 1^\circ\text{C}$, где соблюдался следующий режим: 16 часов – день, 8 часов – ночь. Образцы, проращиваемые в темноте, помещались в термостат, где пыльца проращивалась также в течение суток при $21\pm 1^\circ\text{C}$ без доступа света. Математическую обработку результатов выполняли в программе StatSoft Statistica 13.0 методом двухфакторного дисперсионного анализа. Учитывалось влияние двух факторов: фитогормонов в различных сочетаниях и освещенности. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Процент прорастания пыльцы со сниженной жизнеспособностью яблони сорта 'Краснолистная' при про-

ращивании *in vitro* на искусственной питательной среде с добавлением фитогормонов различных концентраций по отдельности и в различных сочетаниях на свету и в темноте приведен в таблице 2.

Установлено, что влияние фитогормонов в различных концентрациях оказывает достоверное сильное воздействие на прорастание пыльцы. Влияние слабого фактора – режима освещенности на прорастание пыльцы со сниженной жизнеспособностью не значимо. Выпадающие табличные данные по слабому фактору освещенности можно объяснить взаимодействием сильного фактора экзогенных фитогормонов с эндогенными фитогормонами поврежденной в процессе состаривания пыльцы. Среди стимуляторов и их сочетаний, оказавших наибольшее влияние на процент прорастания пыльцы со сниженной жизнеспособностью, можно выделить Гб АЗ в концентрации 1 мг/л и 10 мг/л: процент жизнеспособности составил $22,3\pm 0,8\%$ и $21,8\pm 1,3\%$. Наиболее существенное влияние на процент прорастания пыльцы со сниженной жизнеспособностью оказало сочетание: гиббереллин 10 мг/л + кинетин 10 мг/л. Процент прорастания пыльцы составил $22,8\pm 6,3\%$. При сочетании фитогормонов кинетин 1 мг/л + индолилмасляная кислота 1 мг/л процент прорастания $17,5\pm 5,9\%$ против $10,9\pm 1,5\%$ в контроле.

Заключение

Выявлено достоверное влияние фитогормонов на прорастание пыльцы яблони со сниженной жизнеспособностью ($p = 0,003$). Наиболее эффективный фитогормон, способствующий прорастанию пыльцы с пониженной жизнеспособностью, – гиббереллин в концентрации 1 мг/л и 10 мг/л; лучшее сочетание фитогормонов – гиббереллин + кинетин, каждый в концентрации 10 мг/л. Однако на практике вместо сочетаний фитогормонов целесообразно использовать один препарат – гиббереллин в концентрации 1 мг/л и 10 мг/л.

При проращивании пыльцы сорта 'Краснолистная' со сниженной жизнеспособностью фактор освещенности в большинстве вариантов не оказал существенного влияния ($p = 0,380$), то есть в процессе состаривания пыльца яблони сорта 'Краснолистная' теряет светочувствительность.

Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту № 0662-2019-0004 «Коллекции вегетативно размножаемых культур (картофель, плодовые, ягодные, декоративные, виноград) и их диких родичей ВИР – изучение и рациональное использование».

Таблица 2. Влияние отдельных фитогормонов и их сочетаний на процент прорастания пыльцы яблони со сниженной жизнеспособностью сорта 'Краснолистная' при прорастивании в темноте и на свету (приведено среднее \pm стандартная ошибка)

Table 2. The effect of individual phytohormones and their combinations on the germination percentage in apple pollen with reduced viability while growing cv. 'Krasnolistnaya' in the dark and in the light (mean \pm standard error is shown)

Сочетания фитогормонов / Combinations of phytohormones.	Варианты опыта / Experience options	Концентрации фитогормонов, мг/л / Concentrations of phytohormones, mg/l	Условия прорастивания / Conditions of germination		Значимость различий (p) / Significance of differences (p)	
			Свет 16 ч, темнота 8 ч, 21°C / Light 16 h, darkness 8 h, 21°C	Темнота 24 ч, 21°C / Darkness 24 h, 21°C	Влияние фитогормонов / Effect of phytohormones	Влияние освещенности / Effect of illumination
Контроль / Reference	-	-	10,9 \pm 1,5	10,0 \pm 1,2	-	-
	1	1	22,3 \pm 0,8	21,7 \pm 0,8	2,2 \cdot 10 ⁻⁶	0,90
Гб АЗ	2	10	21,8 \pm 1,3	19,2 \pm 3,0	5,1 \cdot 10 ⁻⁴	0,40
	1	1	15,8 \pm 5,5	12,4 \pm 6,8	0,80	0,50
Кинетин	2	10	12,6 \pm 2,6	13,9 \pm 0,8	0,30	0,40
	1	1	4,6 \pm 0,5	7,1 \pm 2,7	0,07	0,20
ИМК	2	10	14,9 \pm 2,8	18,9 \pm 2,7	2,6 \cdot 10 ⁻⁶	0,20
	1	1 + 1	7,0 \pm 2,3	14,3 \pm 4,2	6 \cdot 10 ⁻³	0,20
Гб АЗ + кин.	2	10 + 10	22,8 \pm 6,3	9,9 \pm 6,1	9 \cdot 10 ⁻³	0,20
	1	1 + 1	17,5 \pm 5,9	14,2 \pm 6,7	0,80	0,40
Кин. + ИМК	2	10 + 10	7,3 \pm 1,9	18,9 \pm 6,6	0,80	0,60
	1	1 + 1	9,1 \pm 2,7	10,2 \pm 6,9	0,20	0,90
Гб АЗ + ИМК	2	10 + 10	15,9 \pm 3,1	14,5 \pm 4,9	0,90	0,90
	1	1 + 1 + 1	10,0 \pm 1,3	14,2 \pm 5,9	0,40	0,60
Гб АЗ + ИМК+ кин.	2	10 + 10 + 10	8,4 \pm 1,7	6,8 \pm 1,4	0,01	0,80
	Различия контроля и опыта достоверны, p < 0,05					

Примечание: Гб АЗ – гиббереллин АЗ; кин. – кинетин; ИМК – индолилмасляная кислота

Note: Гб АЗ – gibberellin АЗ; кин. – kinetin; ИМК – indolylbutyric acid

References/Литература

- Brezhnev D.D., Kislyuk M.M., Vorobyeva G.A. Effect of ultralow temperature (–195°C) on pollen of various plants (Deystviye sverkhnikzkoj temperatury [–195°C] na pyltsu razlichnykh rasteniy). *Doklady VASKhNIL = Reports of VASKhNIL*. 1970;(5):2-6. [in Russian] (Брежнев Д.Д., Кислюк М.М., Воробьева Г.А. Действие сверхнизкой температуры (–195°C) на пыльцу различных растений. *Доклады ВАСХНИЛ*. 1970;(5):2-6).
- Girichev V.S., Alekseenko L.V., Vysotsky V.A., Hanke M.-V. Determining pear-tree pollen viability after storage. *Pomiculture and Small Fruits Culture in Russia*. 2012;31(1):89-95. [in Russian] (Гиричев В.С., Алексеев В.А., Высоккий В.А., Ханке М.-В. Определение жизнеспособности пыльцы груши после хранения. *Плодоводство и ягодоводство России*. 2012;31(1):89-95).
- Golubinsky I.N. Biology of pollen germination (Biologiya prorstaniya pyltsy). Kiev: Naukova Dumka; 1974. [in Russian] (Голубинский И.Н. Биология прорастания пыльцы. Киев: Наукова Думка; 1974).
- Manzhulin A.V., Yashina I.M. Preservation of potato pollen under ultralow temperatures (Khraneniye pyltsy kartofelya pri sverkhnikzkiikh temperaturakh). *Agricultural Biology*. 1984;(4):56-59. [in Russian] (Манжулин А.В., Яшина И.М. Хранение пыльцы картофеля при сверхнизких температурах. *Сельскохозяйственная биология*. 1984;(4):56-59).
- Nesterov Ya.S. Study of the pome fruit crop collection and identification of intensive-type cultivars. Guidelines (Izucheniye kollektzii semechkovykh kultur i vyavleniye sortov intensivnogo tipa). Leningrad: VIR; 1986. [in Russian] (Нестеров Я.С. Изучение коллекции семечковых культур и выявление сортов интенсивного типа. Методические указания. Ленинград: ВИР; 1986).
- Pavlov A.V., Verzhuk V.G., Sitnikov M.N., Shlyavas A.V. The influence of phytohormones on the germination of apple pollen in the process of low-temperature storage. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2018;179(3):293-300. [in Russian] (Павлов А.В., Вержук В.Г., Ситников М.Н., Шлявас А.В. Влияние фитогормонов на прорастание пыльцы яблони в процессе низкотемпературного хранения. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2018;179(3):293-300. DOI: 10.30901/2227-8834-2018-3-293-300
- Reed B.V.M. (ed.). *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. New York: Springer; 2008.
- Tatarintsev A.S. Increasing accuracy of experiments in the identification of interpollination ability in fruit plant cultivars (Povysheniye tochnosti opytov po vyavleniyu vzaimoopulyayemosti sortov plodovykh rasteniy). *Trudy plodoovoshchnogo instituta im. I.V. Michurina = Works of the Michurin Fruit and Vegetable Research Institute*. 1959;(10):71-75. [in Russian] (Татаринцев А.С. Повышение точности опытов по выявлению взаимоопыляемости сортов плодовых растений. *Труды плодовоощного института им. И.В. Мичурина*. 1959;(10):71-75).
- Verzhuk V.G., Pavlov A.V., Dzyubenko N.I., Novikova L.Yu., Murashev S.V., Eremina O.V. Cryoconservation in nitrogen as a promising method to preserve plant biodiversity of stone and pome fruit crops. *Pomiculture and Small Fruits Culture in Russia*. 2017;48(1):33-36. [in Russian] (Вержук В.Г., Павлов А.В., Дзюбенко Н.И., Новикова Л.Ю., Мурашев С.В., Еремина О.В. Криоконсервация в жидком азоте – перспективный метод сохранения биоразнообразия растений косточковых и семечковых плодовых культур. *Плодоводство и ягодоводство России*. 2017;48(1):33-36).
- Vitkovsky V.L. *Fruit plants of the world (Plodovyye rasteniya mira)*. St. Petersburg; Moscow; Krasnodar; 2003. [in Russian] (Витковский В.Л. Плодовые растения мира. Санкт-Петербург; Москва; Краснодар; 2003).

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

Павлов А.В., Вержук В.Г., Бондарук Д.Д. Воздействие фитогормонов и освещенности на прорастание пыльцы яблони со сниженной жизнеспособностью. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2019;180(4):27-31. DOI: 10.30901/2227-8834-2019-4-27-31

Pavlov A.V., Verzhuk V.G., Bondaruk D.D. The effect of phytohormones and light on the germination of apple pollen with reduced viability. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2019;180(4):27-31. DOI: 10.30901/2227-8834-2019-4-27-31

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/10.30901/2227-8834-2019-4-27-31>

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

Все авторы одобрили рукопись/All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует/No conflict of interest