

Жизнеспособность пыльцы черной смородины до и после криоконсервирования в жидком азоте и особенности ее морфологии

DOI: 10.30901/2227-8834-2020-3-110-119



УДК 634.723.1:581.41:631.527.825.3:57.086.13

Поступление/Received: 13.04.2020

Принято/Accepted: 21.09.2020

О. А. ТИХОНОВА^{1*}, О. А. ГАВРИЛОВА²,
Е. А. РАДЧЕНКО¹, В. Г. ВЕРЖУК¹, А. В. ПАВЛОВ¹

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

² Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской
академии наук,
197376 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора
Попова, 2

Viability of black currant pollen before and after cryopreservation in liquid nitrogen, and its morphological features

O. A. TIKHONOVA^{1*}, O. A. GAVRILOVA²,
E. A. RADCHENKO¹, V. G. VERZHUK¹, A. V. PAVLOV¹

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 Komarov Botanical Institute of the RAS,
2 Professora Popova Street,
St. Petersburg 197376, Russia

Актуальность. Исследование особенностей формирования и прорастания пыльцы является очень важным для оценки потенциальной продуктивности растений и эффективности селекционной работы. **Материалы и методы.** Объектами исследования служили 11 сортов черной смородины различного эколого-географического и генетического происхождения из генофонда, сохраняемого на научно-производственной базе «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР». Изучение жизнеспособности пыльцы до и после криоконсервирования проводили в лаборатории длительного хранения генофонда растений (ЛДХГР) ВИР путем проращивания ее на питательной среде, содержащей 10% сахарозы и 0,8% агар-агара. Морфологические исследования выполняли с помощью светового и конфокального лазерного сканирующего (КЛСМ) микроскопов в лаборатории палинологии и Центре коллективного пользования БИН РАН. **Результаты и заключение.** Сложившиеся неблагоприятные погодные условия в 2019 г. оказали негативное воздействие на процесс формирования мужской генеративной сферы – уровень жизнеспособности пыльцы в зависимости от сорта составил 17,98–58,60%. После экспозиции в жидком азоте (при –196°C) в течение шести месяцев у всех изученных сортов, за исключением одного ('Поздняя послевоенная', к-7652), наблюдалось увеличение процента проросших пыльцевых зерен в 1,1–3,2 раза. Изучение морфологических особенностей пыльцы позволило выявить, что пониженная жизнеспособность у ряда сортов ('Красноярская 1018', к-7607, 'Tsema', к-25900, 'Поздняя послевоенная', к-7652) связана с морфологическими отклонениями в строении спородермы, выраженными в разном размере пыльцевых зерен, утолщении экзины и формировании бородавчатых поверхностей мезопориума. Выявлена невысокая положительная взаимосвязь уровня жизнеспособности пыльцы с диаметром поры ($r = 0,43$) и диаметром пыльцевого зерна ($r = 0,27$) и незначительная отрицательная корреляция между уровнем жизнеспособности и толщиной экзины ($r = -0,33$).

Ключевые слова: *Ribes* L., сорт, апертура, экзина, спородерма, корреляция, криоконсервация.

Background. Learning about morphological and biological features of pollen is very important to make correct estimations of plant productivity and breeding efficiency. **Materials and methods.** The viability of black currant pollen was analyzed in 2019 at the Laboratory for Long-Term Storage of Plant Genetic Resources, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR). Eleven black currant cultivars of various ecogeographic and genetic origin maintained at Pushkin and Pavlovsk Laboratories of VIR served as the material for the research. Pollen viability was tested on an artificial medium with 10% sucrose and 0.8% agar. Morphological studies were carried out using light and confocal laser scanning microscopy at the Palynology Laboratory and the Core Centrum of Cell and Molecular Technologies in Plant Science housed by the Komarov Botanical Institute (BIN). **Results and conclusion.** The prevailing adverse weather conditions in 2019 produced a negative impact on the process of male generative structure formation. The level of pollen viability, depending on the cultivar, ranged from 17.98 to 58.60%. After exposure to liquid nitrogen (–196°C) for 6 months, the number of germinated pollen grains increased 1.1 to 3.2 times in all the studied cultivars, except one ('Pozdnyaya poslevoennaya', k-7652). A palynomorphological study revealed that reduced pollen viability in some cultivars ('Krasnoyarskaya 1018', k-7607; 'Tsema', k-25900; 'Pozdnyaya poslevoennaya', k-7652) was associated with morphological deviations in the sporoderm structure (small pollen grains, exine thickening and formation of verrucate mesopore surfaces). A low positive correlation was observed between the level of pollen viability and the diameters of the pore ($r = 0.43$) and pollen grain ($r = 0.27$). An insignificant negative correlation was apparent between the level of viability and the exine thickness ($r = -0.33$).

Key words: *Ribes* L., cultivar, aperture, exine, sporoderm, correlation, cryopreservation.

Введение

Сохранение растительного биоразнообразия проводится в условиях *in situ* (в полях, лесах, садовых массивах) и *ex situ* (в коллекционных садах и питомниках). Одним из перспективных методов хранения *ex situ* вегетативно размножаемых плодовых и ягодных культур является криоконсервирование в условиях сверхнизких температур жидкого азота (-196°C) или его паров (-183°C ... -185°C), что позволяет сохранять жизнеспособность генофонда культурных плодовых и ягодных растений в течение нескольких десятков лет; при этом растительный материал (побеги, отделенные от побегов почки, меристемы, семена диких видов, пыльца), подвергаемый воздействию сверхнизких температур, не изменяется, а остается генетически стабильным (Kiseleva et al., 2012).

Криоконсервирование пыльцы плодовых культур не только важно для сохранения генетических ресурсов, но и может служить необходимым материалом для целей селекции, а возможность быстрого определения жизнеспособности пыльцы на искусственных средах после длительного хранения представляет несомненный практический интерес для селекционеров и биологов (Golubinsky, 1974; Zamburova et al., 2016; Sitnikov et al., 2018).

Для плодовых культур фертильность и жизнеспособность пыльцы являются особо значимыми показателями, поскольку они напрямую связаны с продуктивностью растений. Кроме того, от качества пыльцы во многом зависит и эффективность селекционной работы (Gavrilova, Tikhonova, 2017).

Исследованиями ряда авторов (Nikolaevskaya et al., 2009; Koteyeva et al., 2015) показано, что качество мужского гаметофита не только зависит от генотипа, но и довольно тесно связано с колебаниями погодно-климатических характеристик (температуры, влажности воздуха) в регионе произрастания культуры. Развитие пыльцевых зерен считается одним из онтогенетических процессов, наиболее чувствительных к изменениям температур (Koteyeva et al., 2015). При аномально неблагоприятных погодных условиях пыльца имеет пониженную жизнеспособность, что сказывается на процессах опыления и оплодотворения. В связи с этим криоконсервирование пыльцы имеет большое значение, особенно для зон с неблагоприятными погодными условиями во время цветения растений. Этот метод хранения растительного материала позволяет использовать собранную в благоприятные годы качественную пыльцу с высокой жизнеспособностью при проведении селекционных скрещиваний и кроме того проводить гибридизацию сортов, обладающих ценными признаками, но различающихся по срокам цветения.

Цель нашей работы – изучение характера изменчивости жизнеспособности пыльцы до и после хранения ее в условиях сверхнизких температур жидкого азота (-196°C) и выявление возможной взаимосвязи между морфологическими особенностями и уровнем жизнеспособности пыльцы сортов черной смородины.

Материалы и методы

Жизнеспособность пыльцы черной смородины до и после криоконсервирования изучали в лаборатории длительного хранения генофонда растений (ЛДХГР) Всероссийского института генетических ресурсов растений

имени Н.И. Вавилова (ВИР). Объектами исследования служили 11 сортов черной смородины различного эколого-географического и генетического происхождения из генофонда, сохраняемого на научно-производственной базе (НПБ) «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» (Санкт-Петербург, Павловск) (табл. 1).

Сбор пыльцы изучаемых сортов проводили во II–III декадах мая. С кустов одного сорта в сухую погоду собирали по 200–250 хорошо развитых бутончиков и в лабораторных условиях отделяли пыльники. В течение двух-трех суток пыльцу подсушивали до сыпучего состояния при температуре 21°C , затем ее помещали в криопробирки и замораживали прямым погружением в жидкий азот (-196°C), где она хранилась в течение шести месяцев. Для определения жизнеспособности пыльцу размораживали 5–10 минут на воздухе (21°C), затем проращивали без света в термостате (21°C) на агаризованной питательной среде, содержащей 10% сахарозы. На питательную среду в чашках Петри наносили суспензию пыльцы в каплях дистиллированной воды. Проросшей считали пыльцу с пыльцевой трубкой, длина которой была больше диаметра пыльцевого зерна. Количество проросших пыльцевых зерен подсчитывали под микроскопом Motik100M при 100-кратном увеличении в 30–50 случайных полях зрения в 6–8 каплях суспензии пыльцы (Pavlov et al., 2019).

Для морфологических исследований оболочку пыльцевых зерен с помощью светового и конфокального лазерного сканирующего (КЛСМ) микроскопов зерна обрабатывали по стандартному ацетолитическому методу (Erdtman, 1952) в лаборатории палинологии Ботанического института имени В.Л. Комарова (БИН РАН). Описания и измерения проводили в лаборатории палинологии БИН РАН с помощью светооптического микроскопа «Микмед-6» при увеличениях 20×10 , 40×10 и 100×10 . Исследования на КЛСМ LSM-780 выполнены в Центре коллективного пользования БИН РАН научным оборудованием «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» (Gavrilova, 2014).

Метеорологические данные получены в отделе автоматизированных информационных систем генетических ресурсов растений (АИС ГРР) ВИР. Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакета программ Microsoft Excel.

Погодные условия. В 2019 г. вегетация и цветение растений проходили в сложных метеорологических условиях (рис. 1). Холодная погода с перепадами суточных температур в первой и второй декадах апреля значительно замедлила вегетацию растений. Во второй половине месяца установилась жаркая сухая погода, спровоцировавшая раннее цветение, которое сопровождалось очередным понижением температуры воздуха.

Амплитуда температур в ночное и дневное время суток во время начала цветения растений составила $8,5$ – $18,5^{\circ}\text{C}$. Все эти факторы оказали неблагоприятное воздействие на процесс формирования пыльцы в 2019 г.

Результаты и обсуждение

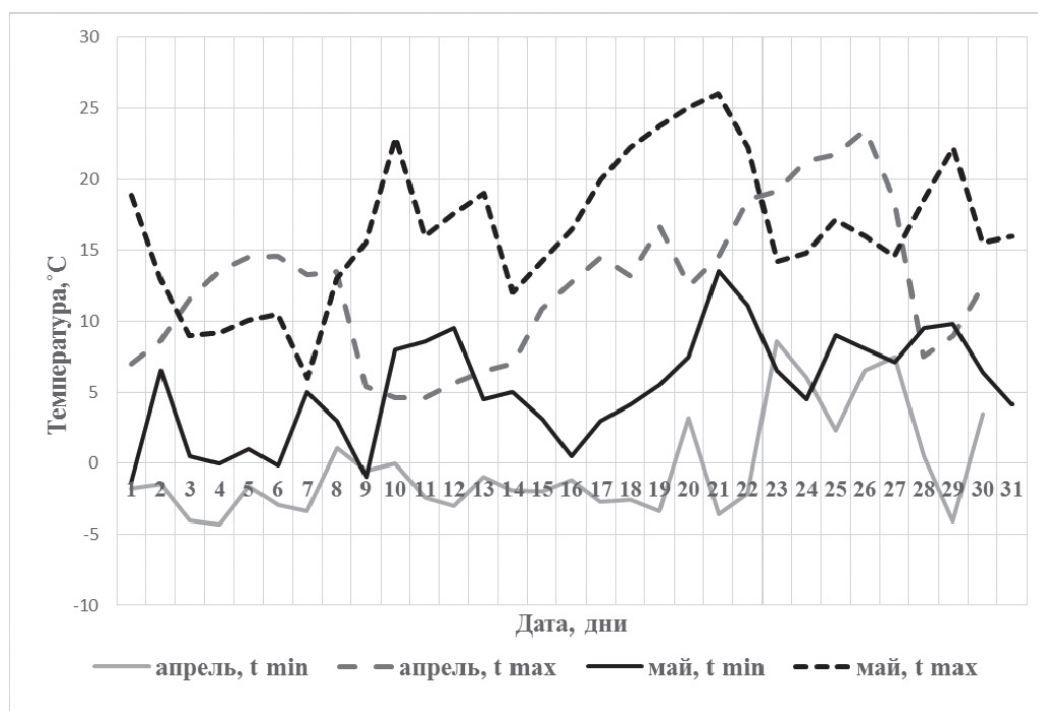
Анализ полученных нами данных позволил выявить существенные различия по уровню жизнеспособности пыльцы изученных сортов. Исходная жизнеспособность (К) у подавляющего числа образцов была невысокой и варьировала в зависимости от образца от

Таблица 1. Объекты исследования (НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР», 2019 г.)**Table 1. Target material of the research** (Pushkin and Pavlovsk Laboratories of VIR, 2019)

№ по каталогу ВИР	Сорт	Географическое происхождение	Генетическая группа
15630А	Андреевская	Россия, Санкт-Петербург, ВИР	ESDRnScUs
41978	Белорусочка	Беларусь, Институт плодводства НАН Беларуси	ESD
40514	Грация	Россия, Орел, ВНИИСПК	RgRnEDSScG
44158	Кача	Россия, Красноярск	ESD
7607	Красноярская 1018	Россия, Челябинск	S
42634	Олеша	Россия, Санкт-Петербург, ВИР	ESDSc
7652	Поздняя послевоенная	Россия, Санкт-Петербург, ВИР	ED
42481	Черешнева	Украина, Киев, ИС УААН	RnPetESD
44167	Albos	Эстония, Polli Horticultural Research Centre	ES
42517	Kriviai	Литва, Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry	Sc × 67-59-2
25900	Tsema	Нидерланды	Происхождение неизвестно

Примечание: **E** – *Ribes nigrum* subsp. *europaeum* Jancz.; **S** – *R. nigrum* subsp. *sibiricum* Wolf E.; **D** – *R. dikuscha* Fisch. ex Turcz.; **Rn** – *R. nigrum* L.; **Us** – *R. ussuriense* Turcz.; **Rg** – *R. glutinosum* Benth.; **G** – *Grossularia reclinata* (L.) Mill.; **Sc** – скандинавский экотип *R. nigrum*; **Pet** – *R. petraeum* Wulf.

Note: **E** – *Ribes nigrum* subsp. *europaeum* Jancz.; **S** – *R. nigrum* subsp. *sibiricum* Wolf E.; **D** – *R. dikuscha* Fisch. ex Turcz.; **Rn** – *R. nigrum* L.; **Us** – *R. ussuriense* Turcz.; **Rg** – *R. glutinosum* Benth.; **G** – *Grossularia reclinata* (L.) Mill.; **Sc** – Scandinavian ecotype of *R. nigrum*; **Pet** – *R. petiolare* Dougl.

**Рис. 1. Минимальные и максимальные температуры воздуха в апреле – мае 2019 г. (Санкт-Петербург)****Fig. 1. Minimum and maximum air temperatures in April/May 2019 (St. Petersburg)**

17,98% до 58,60% (табл. 2). Самыми низкими показателями характеризовался сорт 'Красноярская 1018' (к-7607), являющийся сеянцем сибирского подвида смородины черной. Как известно, сибирский подвида самобесплоден, и этот признак наследуется потомством. Довольно близкими между собой, но невысокими по уровню жизнеспособности пыльцы оказались два сорта: 'Поздняя послевоенная' (к-7652), в геноме которой присутствуют гены европейского подвида *Ribes nigrum* L. и смородины дикуши (*R. dikuscha* Fisch. ex Turcz.), и сорт 'Черешнева' (к-42481), полученный путем сложных возвратных скрещиваний с потомками *Ribes petiolare* Dougl. У сортов 'Tsema' (к-25900), 'Kriviai' (к-42517) и 'Кача' (к-44158) различия по количеству проросших пыльцевых зерен были незначительными (35,56–39,17%) (см. табл. 2). Более высокий процент прорастания пыльцы (44,79–49,68%) наблюдался у сортов 'Albos' (к-44167), 'Олеша' (к-42634) и 'Белорусочка' (к-41978). Показатели прорастания пыльцы у сорта 'Андреевская' (к-15630А), в геноме которого помимо генов европейского и сибирского подвидов и скандинавского экотипа смородины черной присутствуют гены и *R. ussuriense* Turcz., составили 55,56%. Самый высокий уровень жизнеспособности пыльцы (58,60%) наблюдался у сорта с обогащенной генетической наследственностью 'Грация' (к-40514), геном которого включает генетический материал двух подвидов смородины черной (*R. nigrum* subsp. *europaeum* Jancz. и *R. nigrum* subsp. *sibiricum* Wolf E.), скандинавского экотипа *R. nigrum*, а также *R. dikuscha*, *Grossularia reclinata* (L.) Mill. и *R. glutinosum* Benth.

послевоенная', у которого после криоконсервирования произошло незначительное (на 5,44%) уменьшение количества проросших пыльцевых зерен по сравнению с контрольным вариантом.

Выявлены существенные статистически значимые различия по уровню жизнеспособности до и после экспозиции в жидком азоте у 8 из 11 изученных сортов. Сорта 'Кача', 'Tsema' и 'Kriviai', имевшие средние значения исходной жизнеспособности, после хранения в жидком азоте показали достоверное увеличение количества проросших пыльцевых зерен в 1,5; 1,6 и 2,1 раза соответственно. У сортов 'Грация' и 'Андреевская', характеризовавшихся самыми высокими исходными значениями жизнеспособности пыльцы, после криоконсервирования также наблюдалось достоверное увеличение показателя в 1,32 и 1,45 раза, что составило 77,06 и 80,75% соответственно. Самая высокая величина жизнеспособности пыльцы после экспозиции в жидком азоте отмечена у сортов 'Белорусочка' – 81,6% (возросла в 1,64 раза) и 'Черешнева' – 84,93% (в 3,23 раза больше исходной).

Таким образом, статистически значимые показатели жизнеспособности пыльцевых зерен после криоконсервирования у сортов увеличиваются в 1,3–1,9 раза; только у одного образца ('Черешнева') жизнеспособность пыльцы превышает исходную более чем в три раза.

У сортов 'Albos', 'Поздняя послевоенная' и 'Олеша' процент проросших пыльцевых зерен после криоконсервирования достоверно не отличался от исходной жизнеспособности.

Таблица 2. Жизнеспособность пыльцы черной смородины, % (Лаборатория ДХГР, 2019)

Table 2. Viability of black currant pollen, % (Laboratory for Long-Term Storage of Plant Genetic Resources, 2019)

№	Сорт	До помещения в жидкий азот (К)	После нахождения в жидком азоте
1.	Андреевская*	55,56 ± 2,39	80,75 ± 2,55
2.	Белорусочка*	49,68 ± 2,31	81,59 ± 2,03
3.	Грация*	58,60 ± 2,55	77,06 ± 4,03
4.	Кача*	39,17 ± 2,07	60,24 ± 3,10
5.	Красноярская 1081*	17,98 ± 1,82	38,01 ± 3,71
6.	Олеша	49,39 ± 1,75	53,26 ± 3,00
7.	Поздняя послевоенная	24,26 ± 1,65	18,82 ± 2,45
8.	Черешнева*	26,28 ± 2,22	84,93 ± 2,96
9.	Albos	44,79 ± 1,92	48,18 ± 3,37
10.	Kriviai*	37,95 ± 2,17	79,29 ± 2,88
11.	Tsema*	35,56 ± 2,26	55,94 ± 3,49

* – статистически значимые отличия при $p \leq 0,05$

* – statistically significant differences at $p \leq 0.05$

После хранения в жидком азоте диапазон вариabельности уровня жизнеспособности пыльцы в зависимости от образца составил 18,82–84,93% (см. табл. 2, рис. 2). Как показали исследования, у всех образцов, за исключением одного, жизнеспособность увеличилась на 3,39–58,65% или в 1,1–3,2 раза. Исключение составил сорт 'Поздняя

Выявлена невысокая положительная корреляция между исходной жизнеспособностью и жизнеспособностью пыльцы после хранения ее в жидком азоте ($r = 0,53$).

Аналогичные результаты были получены ранее на пыльце других плодовых культур: вишни, черешни

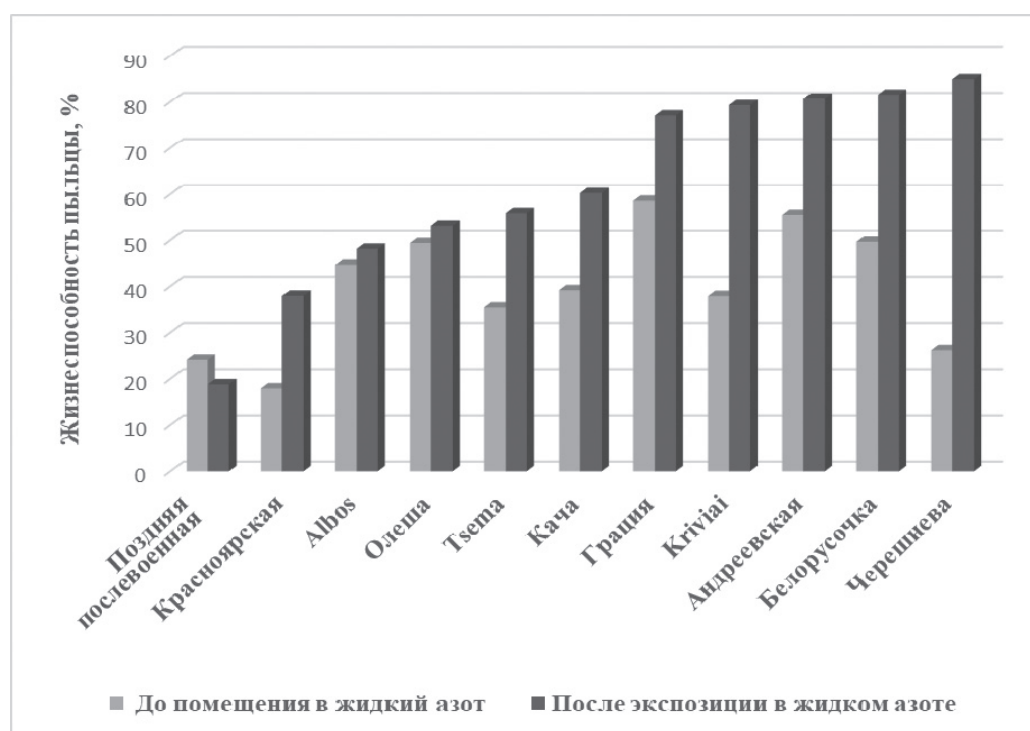


Рис. 2. Изменение уровня жизнеспособности пыльцы черной смородины после хранения в жидком азоте (Лаборатория ДХГР, 2019)

Fig. 2. Changes in the level of black currant pollen viability after storage in liquid nitrogen (Laboratory for Long-Term Storage of Plant Genetic Resources, 2019)

и сливы (Orlova et al., 2019; Pavlov et al., 2019), но у черной смородины повышение жизнеспособности пыльцы после криохранения в условиях сверхнизких температур (-196°C) отмечено у значительно большего числа сортов по сравнению с указанными культурами.

Для более полной характеристики пыльцевых зерен и в целом мужской репродуктивной сферы сортов до помещения их в жидкий азот нами было проведено исследование морфологических особенностей экзин как наиболее стабильных, сформированных под контролем центрального генома структур изучаемых образцов. Морфологические признаки оболочек пыльцевых зерен являются таксоноспецифичными.

Морфология пыльцевых зерен. Подробные морфометрические характеристики пыльцы изученных сортов и процент типичных, не отклоняющихся от нормы пыльцевых зерен в образце представлены в таблице 3.

Проведенное исследование позволило установить, что пыльца всех 11 исследованных сортов (рис. 3) в манадах, порово-оровая, сфероидальная, в очертании округлая, как и у других представителей подрода *Eucoreosma* (Jancz.) Berg. (Gavrilova, Tikhonova, 2019). Зерна имеют средние размеры, их величина варьирует от 20 до 43,2 μm в диаметре. У ряда изученных сортов ('Albos', 'Поздняя послевоенная', 'Красноярская 1018', 'Олеша', 'Грация' (рис. 3, а, б), 'Андреевская' (рис. 3, с), 'Kriviai') среди типичных, правильно сформированных зерен встречаются аномально мелкие, около 10 μm в диаметре. Доля очень мелких пыльцевых зерен в пределах образца у разных сортов различна. У сорта 'Albos' (рис. 3, е) относительно мелкие зерна (20–25 μm в диаметре) составляют 1/3 от общего количества просмотренных. Большое количество очень мелких зерен содержит сорта 'Красноярская 1018' и 'Поздняя послевоенная'. У сортов 'Олеша', 'Грация', 'Андреевская' и 'Kriviai' очень мелкие пыльцевые зерна встречаются в единичном количестве. У сорта 'Грация', напро-

тив, выявлены единичные увеличенные пыльцевые зерна. Кроме того, у сортов 'Олеша' и 'Белорусочка' встречается много мятых и даже совсем сплюснутых пыльцевых зерен. У сортов 'Tsema' (рис. 3, j, k) и 'Белорусочка' отмечены единичные нераспавшиеся тетрады.

Как показали исследования, наибольший процент (83,1–100%) правильно сформированных пыльцевых зерен отмечен у сортов 'Кача', 'Олеша' и 'Андреевская' (см. табл. 3).

Сорта отличаются друг от друга разбросом размеров пыльцевых зерен (рис. 4). Наибольший разброс по величине диаметра пыльцевого зерна отмечен у сортов 'Олеша', 'Андреевская' и 'Красноярская 1018'; наименьший – у сорта 'Кача'. Небольшие различия между минимальными и максимальными значениями размеров пыльцевых зерен имеют сорта 'Черешнева' и 'Kriviai'. У остальных сортов диапазон изменчивости диаметра пыльцевого зерна невелик (см. рис. 4).

Выявлена очень слабая положительная корреляция между диаметром пыльцевого зерна и степенью его жизнеспособности ($r = 0,27$).

Пыльца всех исследованных сортов имеет сложные апертурные, состоящие из эктоапертурной (поровидной или бороздовидной) и эндоапертурной (поры) областей. Апертурные глобально расположены. Эктоапертурные с неровными, рваными краями главным образом округлые, поровидные, поэтому соотношение длины к ширине эктоапертурной области немногим больше единицы (см. табл. 3), как и у представителей подрода *Eucoreosma* (Gavrilova, Tikhonova, 2019). У сорта 'Kriviai' (см. рис. 3, г) встречаются борозды вдоль всего зерна, что отмечалось ранее у смородинно-крыжовниковых гибридов (Gavrilova, Tikhonova, 2017). Эндоапертурные (поры) округлые, с ровными краями, чаще всего одна пора расположена в центре эктоапертурной области, редко встречаются эктоапертурные без пор или с двумя-тремя порами. Как пра-

Таблица 3. Морфометрическая характеристика пыльцы сортов черной смородины
(Лаборатория палинологии, БИН РАН, 2019 г.)

Table 3. Pollen morphometric characteristics of black currant cultivars
(Palynology Laboratory of BIN, 2019)

Название образца	Диаметр, μm x min-max	Количество пор, шт. x	Диаметр поры, μm x min-max	Длина эктоапертур, μm x min-max	Ширина эктоапертур, μm x min-max	Соотношение длины/ ширины эктоапертур	Толщина экзины, μm	% типичных пыльцевых зерен
Albos	$\frac{28,3}{20,0-32,8}$	7	$\frac{4,3}{1,6-5,7}$	$\frac{12,9}{9,8-16,2}$	$\frac{10,0}{7,5-11,8}$	1,29	1,2-2,0	77,2
Кача	$\frac{33,7}{33,0-36,9}$	7	$\frac{4,7}{2,6-8,3}$	$\frac{17,4}{10,5-30,3}$	$\frac{9,1}{7,5-11,5}$	1,91	1,0-1,5	100,0
Поздняя послевоенная	$\frac{32,0}{24,7-36,4}$	8	$\frac{3,0}{2,0-5,1}$	$\frac{14,6}{9,3-22,2}$	$\frac{9,3}{4,9-11,7}$	1,53	0,9-1,4	73,4
Tsema	$\frac{29,2}{21,5-33,6}$	5	$\frac{4,3}{2,8-5,8}$	$\frac{16,0}{9,2-22,6}$	$\frac{8,9}{4,3-12,7}$	1,79	0,9-2,9	76,2
Красноярская 1081	$\frac{28,9}{20,5-36,9}$	6	$\frac{4,9}{3,3-6,7}$	$\frac{17,3}{11,9-24,3}$	$\frac{12,1}{8,9-16,8}$	1,43	0,9-2,5	67,1
Олеша	$\frac{30,5}{16,5-40,3}$	6	$\frac{3,5}{1,8-6,2}$	$\frac{13,6}{9,8-16,4}$	$\frac{9,8}{6,6-14,3}$	1,39	1,2-1,8	92,9
Белорусочка	$\frac{34,5}{29,7-43,2}$	6	$\frac{4,7}{3,2-8,8}$	$\frac{17,8}{11,5-26,1}$	$\frac{12,4}{8,6-15,3}$	1,43	0,8-2,0	59,8
Черешнева	$\frac{31,0}{27,0-33,7}$	6	$\frac{4,1}{2,5-5,1}$	$\frac{16,1}{10,4-26,3}$	$\frac{11,5}{4,3-14,8}$	1,40	1,2-2,0	73,3
Грация	$\frac{31,3}{22,8-36,4}$	6	$\frac{4,0}{1,5-6,4}$	$\frac{16,7}{11,4-25,8}$	$\frac{10,8}{9,0-14,9}$	1,54	0,8-1,4	75,1
Андреевская	$\frac{28,6}{12,5-34,8}$	7	$\frac{3,6}{2,1-7,3}$	$\frac{14,9}{10,2-21,5}$	$\frac{10,9}{7,2-14,2}$	1,37	1,0-1,8	96,3
Kriviai	$\frac{31,4}{25,9-35,4}$	6	$\frac{4,9}{3,6-6,3}$	$\frac{19,3}{14,5-29,5}$	$\frac{13,0}{4,2-18,4}$	1,48	1,0-1,6	83,1

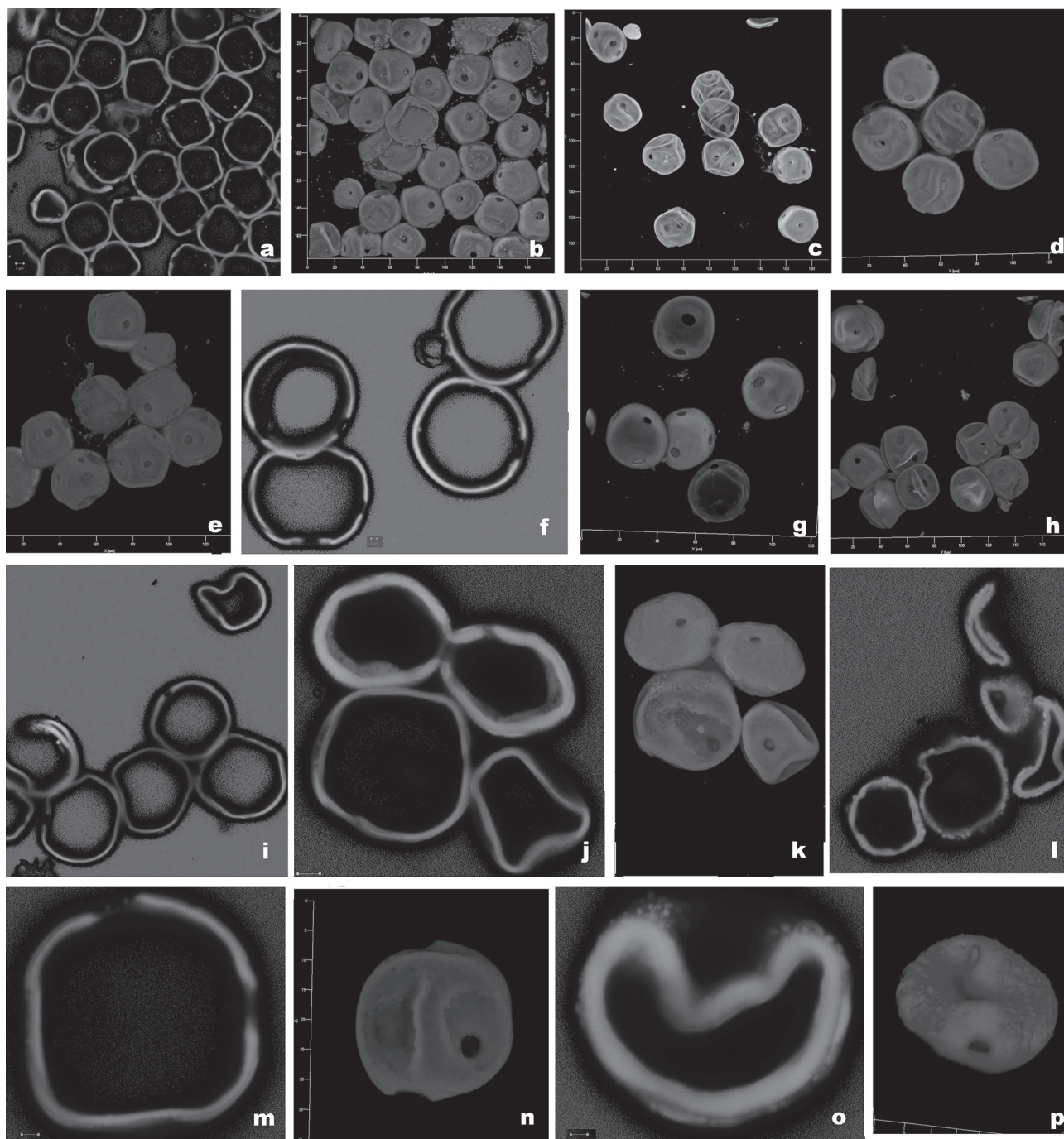


Рис. 3. Микрофотографии пыльцевых зерен, полученные с помощью конфокального лазерного микроскопа: **a, b** – Грация; **c** – Андреевская; **d** – Кача; **e** – Albos; **f, g** – Kriviai; **h** – Белорусочка; **i** – Поздняя послевоенная; **j, k** – Tsema; **l-p** – Красноярская 1018; **b – e, g, h, k, n, p** – общий вид реконструированных пыльцевых зерен; **a, f, i, l, m, o** – оптические срезы через пыльцевые зерна

Fig. 3. Microimages of pollen grains made with a confocal laser scanning microscope:

a, b – Gratsiya; **c** – Andreyevskaya; **d** – Kacha; **e** – Albos; **f, g** – Kriviai; **h** – Belorusochka; **i** – Pozdnyaya poslevoennaya; **j, k** – Tsema; **l-p** – Krasnoyarskaya 1018; **b – e, g, h, k, n, p** – view on the reconstructed pollen grains; **a, f, i, l, m, o** – optical sections across pollen grains

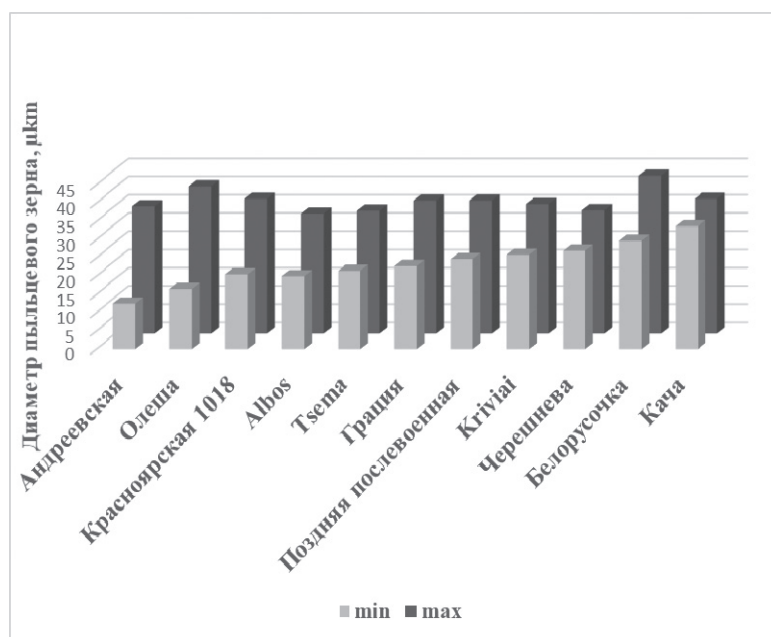


Рис. 4. Диапазон изменчивости диаметра пыльцевых зерен сортов черной смородины
(Лаборатория палинологии, БИН РАН, 2019 г.)

Fig. 4. Variability range for the pollen grain diameter in black currant cultivars
(Palynology Laboratory of BIN, 2019)

вило, число пор у пыльцевых зерен исследуемых сортов варьирует от 5 до 9 штук. По средним значениям величины диаметра пор изученные сорта различаются несущественно. Эта величина составляет в среднем 3,0–4,9 μm, однако внутрисортная изменчивость показателя более значительна и варьирует в зависимости от сорта от 1,6 до 8,8 μm (см. табл.3; рис. 5). Мелкие пыльцевые зерна имеют, как правило, поры меньшего диаметра. Самая большая разница между минимальными и максимальными значениями диаметра поры отмечена у сортов

‘Кача’, ‘Белорусочка’, ‘Андреевская’, ‘Трация’, ‘Albos’ и ‘Олеша’ (см. рис. 5).

Выявлена невысокая положительная корреляция между диаметром поры и уровнем жизнеспособности изученных сортов ($r = 0,43$).

Экзина пыльцевых зерен изученных сортов двуслойная, обычно толщиной от 0,8 до 1,6 μm, однако у мелких и уродливых зерен она может быть утолщена в два, иногда даже в три раза. Такие утолщения экзины отмечены у сортов ‘Albos’, ‘Tsema’ (см. рис. 3, j), ‘Красно-

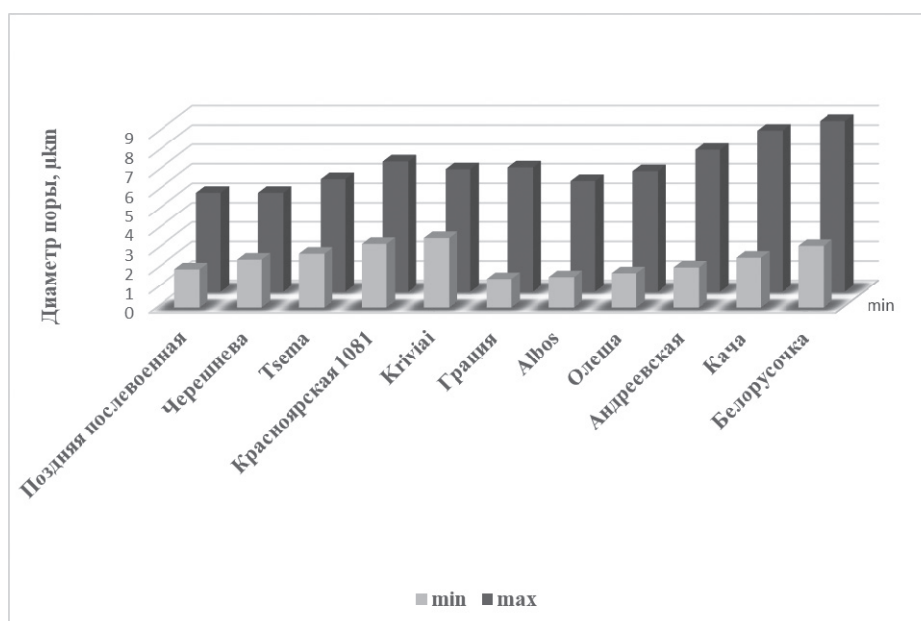


Рис. 5. Размах изменчивости диаметра поры у сортов черной смородины
(Лаборатория палинологии, БИН РАН, 2019 г.)

Fig. 5. Variability range for the pore diameter in black currant cultivars
(Palynology Laboratory of BIN, 2019)

ярская 1018' (см. рис. 3, о), редко – у сортов 'Белорусочка' и 'Андреевская'. Утолщения эскины свидетельствуют о неправильном развитии пыльцевого зерна, что, вероятно, сказывается на способности его к прорастанию.

Выявлена слабая отрицательная корреляция между толщиной эскины и уровнем жизнеспособности сорта ($r = -0,33$).

Поверхность мезоколюпиума у типичных пыльцевых зерен гладкая или шероховатая. У сортов 'Tsema' и 'Красноярская 1018' в довольно большом количестве обнаруживаются пыльцевые зерна с бородавчатой или мелкобородавчатой спородермой (см. рис. 3, р).

Более ранними исследованиями авторов (Gavrilova, Tikhonova, 2017) было показано, что мелкие пыльцевые зерна, имеющие размеры в 2–3 раза меньше чем обычные пыльцевые зерна, а также зерна с аномальным бородавчатым строением спородермы, являются стерильными. Наши исследования подтверждают сделанный ранее вывод. Пониженный уровень жизнеспособности пыльцы, который наблюдался в нашем опыте у ряда сортов, может быть обусловлен аномальным развитием мужской генеративной сферы, что привело к изменениям морфологии пыльцевых зерен, таких как разноразмерность, наличие большого количества аномально мелких зерен ('Поздняя послевоенная', 'Красноярская 1018'), утолщение эскины, бородавчатая или мелкобородавчатая поверхность мезопориума ('Tsema', 'Красноярская 1018').

Не прослеживается взаимосвязи между повышением жизнеспособности пыльцы, которое было отмечено у большинства изученных сортов после хранения в жидком азоте (-196°C), и особенностями морфологии спородермы. Мы полагаем, что увеличение жизнеспособности пыльцы после криоконсервирования может быть связано со стрессовым воздействием и находит выражение в ультраструктурных изменениях клеточного содержимого пыльцы и интины, а не эскины пыльцевого зерна.

Заключение

Погодные условия, сложившиеся в 2019 г., оказали неблагоприятное воздействие на формирование мужской генеративной сферы. Жизнеспособность пыльцы изученных сортов была невысокой и составила в зависимости от сорта $17,98 \pm 1,82\%$ ('Красноярская 1018') до $58,60 \pm 2,55\%$ ('Грация').

Помимо погодных условий, жизнеспособность пыльцы определяется сортовыми особенностями.

Пониженная жизнеспособность пыльцы сортов 'Красноярская 1018', 'Tsema', 'Поздняя послевоенная' связана с аномальным развитием мужских гаметофитов, следствием чего явились морфологические отклонения в строении спородермы, выраженные в разноразмерности пыльцевых зерен, утолщении эскины и формировании бородавчатых поверхностей мезопориума.

Диапазон изменчивости показателей жизнеспособности после криоконсервирования составил от $18,82 \pm 2,45\%$ ('Поздняя послевоенная') до $84,93 \pm 2,96\%$ ('Черешнева'). После хранения в жидком азоте в течение шести месяцев отмечено достоверное увеличение уровня жизнеспособности пыльцы у 8 из 11 исследованных сортов в 1,1–3,2 раза.

Между исходной жизнеспособностью и жизнеспособностью пыльцы после криоконсервирования выяв-

лена невысокая положительная корреляция ($r = 0,53$). Уровень жизнеспособности пыльцы в слабой степени связан с размерами пыльцевого зерна ($r = 0,27$) и поры ($r = 0,43$) и в слабой отрицательной степени – с толщиной оболочки пыльцевого зерна ($r = -0,33$).

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».

Морфологические исследования проведены в рамках государственного задания согласно тематическому плану БИН РАН АААА-А19-119080790048-7.

The research was performed within the framework of the State Task according to the theme plan of VIR, Project No. 0662-2019-0004 "Collections of Vegetatively Propagated Crops (Potato, Fruit, Berry and Ornamental Crops, Grapes) and Their Wild Relatives at VIR: Studying and Sustainable Utilization".

Morphological research was conducted within the framework of the State Task according to the theme plan of BIN RAS, No. АААА-А19-119080790048-7.

References/Литература

- Erdtman G. Pollen morphology and plant taxonomy – Angiosperms: An introduction to palynology. Vol. 1. Stockholm: Almquist and Wiksell; 1952.
- Gavrilova O.A. Application of confocal laser scanning microscope to the study of pollen wall morphology. *Botanicheskii zhurnal = Botanical Journal*. 2014;99(10):1139-1147. [in Russian] [Гаврилова О.А. Применение конфокальной лазерной сканирующей микроскопии для исследования морфологии оболочки пыльцевых зерен. *Ботанический журнал*. 2014;99(10):1139-1147].
- Gavrilova O.A, Tikhonova O.A. On reproductive biology of distant hybrids in the Grossulariaceae family. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2017;178(4):100-118. [in Russian] [Гаврилова О.А., Тихонова О.А. К репродуктивной биологии отдаленных гибридов в семействе Grossulariaceae. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2017;178(4):100-118]. DOI: 10.30901/2227-8834-2017-4-100-118
- Gavrilova O.A, Tikhonova O.A. Pollen morphology of the family Grossulariaceae and some taxonomical implication. *Plant Systematics and Evolution*. 2019;305(7):521-530. DOI: 10.1007/s00606-019-01590-6
- Golubinsky I.N. Biology of pollen germination. Kiev: Naukova Dumka; 1974. [in Russian] [Голубинский И.Н. Биология прорастания пыльцы. Киев: Наукова думка; 1974].
- Kiseleva A.A, Verzhuk V.G., Savelyev N.I., Dorohov D.S., Zheltikov Y.V., Eremina O.V., Potokina E.K., Dzjubenko N.I. Methods to monitor genetic integrity of cryopreserved fruit germplasm. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2012;169:280-288. [in Russian] [Киселева А.А, Вержук В.Г, Савельев Н.И, Дорохов Д.С., Желтиков Ю.В., Еремина О.В., Потоккина Е.К., Дзюбенко Н.И. Методы мониторинга генетической стабильности плодовых культур в условиях криоконсервации. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2012;169:280-288].

- Koteyeva N.K., Mirgorodskaya O.E., Bulisheva M.M., Miroslavov E.A. Pollen development in *Ribes nigrum* (Grossulariaceae) in relation to the low temperature period. *Botanicheskii zhurnal = Botanical Journal*. 2015;100(10):1001-1014. [in Russian] (Котеева Р.Л., Миргородская О.Е., Булышева М.М., Мирославов Е.А. Формирование пыльцы *Ribes nigrum* (Grossulariaceae) в связи с периодом пониженных температур. *Ботанический журнал*. 2015;100(10):1001-1014).
- Nikolaevskaya T.S., Vetchinnikova L.V., Titov A.F., Lebedeva O.N. Study of pollen in native and introduced *Betula* L. species in Karelia. In: *Transactions of Karelian Research Centre of Russian Academy of Science*. 2009;(4):90-95. [in Russian] (Николаевская Т.С., Ветчинникова Л.В., Титов А.Ф., Лебедева О.Н. Изучение пыльцы у аборигенных и интродуцированных в условиях Карелии представителей рода *Betula* L. *Труды Карельского научного центра РАН*. 2009;(4):90-95).
- Orlova S.Yu., Pavlov A.V., Verzhuk V.G. Viability of pollen in sweet cherry (*Cerasus avium*) varieties of different ecogeographic origin in the Northwestern region of Russia. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2019;180(1):66-72. [in Russian] (Орлова С.Ю., Павлов А.В., Вержук В.Г. Жизнеспособность пыльцы сортов черешни (*Cerasus avium*) различного эколого-географического происхождения в условиях Северо-Западного региона России. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2019;180(1):66-72). DOI: 10.30901/2227-8834-2019-1-66-72
- 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
- Sitnikov M.N., Verzhuk V.G., Pavlov A.V., Bondaruk D.D. The analysis of apricot and sweet cherry pollen viability after cryopreservation. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2018;179(3):152-158. [in Russian] (Ситников М.Н., Вержук В.Г., Павлов А.В., Бондарук Д.Д. Анализ жизнеспособности пыльцы абрикоса и черешни после криоконсервации. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2018;179(3):152-158). DOI: 10.30901/2227-8834-2018-3-152-158
- Tikhonova N.G., Filipenko G.I., Verzhuk V.G., Zhestkov A.S. Strategy and methods of long-term storage of gene fond of plants. *Problems of Cryobiology*. 2008;18(2):227. [in Russian] (Тихонова Н.Г., Филипенко Г.И., Вержук В.Г., Жестков А.С. Стратегия и методы длительного хранения генофонда растений. *Проблемы криобиологии* 2008;18(2):227).
- Zamburova D.S., Sherieva S.A., Sitnikov M.N., Bogotova Z.I., Gidova E.M., Paritov A.Yu., Handohov T.H., Karmokova M.K. Study viable pollen after exposure to fruit crops ultralow temperatures. *Modern Problems of Science and Education*. 2016;(3):e24849. [in Russian] (Замбунова Д.С., Шериева С.А., Ситников М.Н., Боготова З.И., Гидова Э.М., Паритов А.Ю. и др. Изучение жизнеспособности пыльцы плодовых культур после воздействия сверхнизких температур. *Современные проблемы науки и образования*. 2016(3):e24849). URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24849> (дата обращения: 15.04.2020).

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., Гаврилова О.А., Радченко Е.А., Вержук В.Г., Павлов А.В. Жизнеспособность пыльцы черной смородины до и после 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

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. DOI: 10.30901/2227-8834-2020-3-110-119

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/10.30901/2227-8834-2020-3-110-119>

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

ORCID

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

Gavrilova O.A. <https://orcid.org/0000-0003-2640-9659>

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

Verzhuk V.G. <https://orcid.org/0000-0002-6891-6272>

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