

УДК 634.1.047:631.527:57.086

Сохранение селекционного материала плодовых и ягодных культур при сверхнизких температурах

А.В. Павлов, И.В. Поротников, imoster256@gmail.com

канд. биол. наук **В.Г. Вержук**, vverzhuk@mail.ru

д-р с.-х. наук **Г.А. Воробейков**

*Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова
190000, Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42-44*

Изучено влияние сверхнизких температур (минус 183–185°С) на жизнеспособность пыльцы яблони, почек и черенков сливы и алычи. Показано влияние концентрации сахарозы на прорастание пыльцы яблони сорта Болотовское: оптимальными являются концентрации 10 и 15% сахарозы. На прорастание пыльцы яблони сорта Болотовское оказывает влияние фактор освещенности – при проращивании в темноте жизнеспособность пыльцы в 1,5–2 раза выше, чем на свету. После действия сверхнизких температур при криоконсервации жизнеспособность пыльцы составила 36,4%, что в 1,5 раза выше, чем после низкотемпературного хранения (при проращивании в темноте при концентрации сахарозы 15%). Жизнеспособность черенков сливы после хранения в азоте находилась в диапазоне от 76,7±3,3% до 46,6±3,8% в зависимости от сорта. Привитые черенки алычи после сохранения в парах азота выявили примерно такую же приживаемость, как у сливы – от 60,0±4,3% до 45,2±3,1%. У черной смородины завязываемость ягод консервированной пыльцой при опылении во всех комбинациях скрещивания составляла 94,3–100%.

В работе впервые показано влияние освещенности на прорастание пыльцы яблони, что выражается в более чем полуторном превосходстве активности пыльцы при прорастании в темноте. Указанный результат, вероятно, связан с более широким диапазоном факторов влияющих на прорастание пыльцы в темноте. Практическое значение этого результата заключается в интенсификации процесса завязывания плодов и ягод более фертильной пыльцой.

Ключевые слова: криоконсервация; пыльца; черенки; почки; плодовые культуры; яблоня; слива; алыча; смородина.

DOI: 10.17586/2310-1164-2016-9-1-55-60

Conservation of fruit and berry breeding material at ultralow temperatures

A.V. Pavlov, I.V. Porotnikov, imoster256@gmail.com

Ph.D. **V.G. Verzhuk**, vverzhuk@mail.ru

D.Sc. **G.A. Vorobeykov**

*N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources
190000, Russia, St. Petersburg, Bolshaya Morskaya str., 42-44*

The influence of very low temperatures (minus 183–185°C) on the viability of an apple tree pollen, buds and cuttings of plum and cherry plum is analyzed. The effect of concentration of sucrose on pollen germination of Bolotovskii apple cultivars is shown: the optimum concentrations are 10 and 15% of sucrose. A factor of light has an impact on pollen germination of Bolotovskii apple cultivars: pollen germinated in the dark has 1.5–2 times higher viability than the one germinated in the light. After the cryopreservation by ultra-low temperature the viability of pollen was 36.4% which is 1.5 times higher than the one after low temperature storage (during germination in the dark when the sucrose concentration is 15%). The viability of plum cuttings after storage in nitrogen were in the range of from 76.7±3.3% to 46.6±3.8% depending on the variety. Grafted cuttings of plum after storage in nitrogen vapor showed about the same survival rate – from 60.0±4.3% to 45.2±3.1%. After pollination by canned

pollen in all combinations of crossing the setting of black currant berries was 94.3–100%. In the article the influence of light on the apple pollen germination resulting in activity of pollen increased by half during germination in the dark is shown for the first time. This result is probably associated with a wider range of factors influencing the germination of pollen in the dark. The practical significance of the result is the intensification of the setting process for fruits and berries by more fertile pollen.

Keywords: cryopreservation; pollen; cuttings; buds; fruit crops; apple; plum; cherry plum; currant.

Введение

В настоящее время постоянно увеличиваются невосполнимые потери растительного разнообразия от воздействия водных стихий, пожаров, техногенных катастроф и других причин. Сохранить растительный мир от исчезновения возможно двумя путями: *in situ*, т.е. в естественных условиях, и *ex situ* – в генетических банках растений, коллекционных садах и ягодниках. Многие виды растений могут храниться в генетических банках в виде семян, при небольшой отрицательной температуре [1].

Однако, существует большое количество вегетативно размножающихся растений, которые из-за высокой гетерозиготности не могут быть сохранены в виде семян. Для длительного хранения таких растений используют криоконсервацию. Она представляет собой помещение вегетативных частей растений (почек, черенков), а также пыльцы и меристем, после предварительных подготовительных процедур (подсушивания и постепенного замораживания растительного материала) в жидкий азот или пары жидкого азота (при температуре минус 183–185°C) [2–4].

Адаптивные способности растительных организмов могут проявляться при различных температурах. Так подготовка плодов к хранению в охлажденном состоянии осуществляется в течение вегетационного периода и проводится путем обработки растений в период бутонизации регулятором роста [5]. Обработка растений с целью их подготовки к отрицательным температурам в зимний период осуществляется осенью [6], углубляя состояние покоя и позволяя растениям лучше перенести опасности возвратных заморозков весной [7]. Это создает необходимые предпосылки для роста и развития плодов и формирования у них защитных механизмов, позволяющих осуществлять хранение с меньшими потерями [8].

В тканях растений, подготовленных к отрицательным зимним температурам, увеличивается содержание эндогенных криопротекторов и антиоксидантов [9]. Благодаря последним, усиливаются гидрофильные свойства белков, что увеличивает долю связанной воды. Уменьшение количества свободной воды позволяет растениям с меньшими повреждениями перенести действие отрицательных температур зимой. Уменьшение повреждений зимой создает условия для формирования высококачественного урожая, способного храниться с минимальными потерями [10]. Подготовленные осенней обработкой растения вероятно лучше адаптированы и к условиям криоконсервации при температурах жидкого азота. Цель нашей работы состояла в исследовании длительного хранения при сверхнизких температурах плодовых растений в виде черенков, почек и пыльцы и их жизнеспособность после криоконсервации.

Криоконсервация обеспечивает длительное хранение коллекционных образцов в контролируемых условиях сверхнизких температур, а с помощью молекулярных маркеров можно проводить мониторинг генетической стабильности растительных ресурсов во время и после длительного хранения в парах жидкого азота.

Объекты и методы исследования

Материалом исследования служили черенки и почки сливы и алычи, а также пыльца яблони. Нарезку черенков проводили в садах ВНИИГ и СПР (г. Мичуринск) и Пушкинском филиале ВИИР (г. Павловск) когда температура воздуха опускалась до минус 5–6°C в течение 6–7 суток (декабрь). При консервации черенков применяли модифицированный метод Форслийна [2]. Черенки длиной 5–8 см подсушивали до влажности 28–34% при температуре минус 4–5°C. Затем замораживали двухступенчатым методом и погружали в пары азота. Жизнеспособность черенков после хранения учитывали путем прививок и окулировок в саду на взрослых деревьях [10].

Криоконсервация пыльцы плодовых культур позволяет селекционерам получать жизнеспособную пыльцу из разных регионов от сортов, различающихся по времени цветения [11]. Исходная жизнеспособность собранной и подсушенной пыльцы яблони, которую определяли по количеству проросших на искусственной среде пыльцевых зерен, составила 64,1%.

В ходе эксперимента провели учет жизнеспособности пыльцы яблони сорта Болотовское после низкотемпературного хранения (при –18°C) в течение 9 лет и после криоконсервации (при –185°C) в течение недели (пыльцу замораживали прямым погружением в пары жидкого азота). Проращивали пыльцу сутки (24 часа) на агаризованной питательной среде с различной концентрацией сахарозы на свету (фотопериод: 16 ч свет и 8 ч темнота при температуре +21°C) и в темноте (24 ч темнота в термостате при плюс 21–22°C).

Результаты и рекомендации

В результате проведенных исследований получены данные, указывающие на возможность длительного хранения различных объектов и частей плодовых растений при низких и сверхнизких температурах в парах жидкого азота. Данные жизнеспособности пыльцы яблони после низкотемпературного хранения при –18°C и в парах азота при –185°C представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Жизнеспособность пыльцы яблони (%) после хранения при температуре –18°C и –185°C

Концентрация сахарозы, %		2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	
Освещенность	Свет	–18°C	1,5	3,1	0,9	9,9	6	6,2	0,4	1,1	0
		–185°C	0,3	0,7	4,6	6,8	5,4	8,2	0,2	0,2	0
	Темнота	–18°C	3,9	13,9	28,1	22	13,3	11,9	0,9	4,7	0
		–185°C	0,8	7,1	18,9	36,4	17,4	17,2	3,2	1,4	0

Показано, что оптимальной для проращивания пыльцы яблони сорта Болотовское является концентрации сахарозы 10 и 15%. Также на проращивание пыльцы яблони значительное влияние оказывает фактор освещенности: при проращивании в темноте жизнеспособность пыльцы в 1,5–2 раза выше, чем на свету. Кроме того, при проращивании на оптимальной концентрации сахарозы 15% в темноте жизнеспособность пыльцы после криоконсервации составила 36,4%, что в 1,5 раза выше, чем после низкотемпературного хранения. Повышение по фертильности пыльцы после криоконсервации наблюдалось ранее при работе с черной смородиной [3]. Исследования фертильности пыльцы черной смородины показали высокую результативность длительного хранения. Завязываемость ягод при опылении данной пыльцой во всех проведенных комбинациях скрещивания была высокой и составила 94,3–100%.

Результаты данных по хранению черенков в парах азота, а затем привитых на взрослых деревьях в коллекционных садах, показаны в таблице 2.

Анализ привитых черенков сливы показал, что их жизнеспособность после криоконсервации находилась в диапазоне от 76,7±3,3% до 46,6±3,8% в зависимости от сорта, а максимальной жизнеспособностью черенков после прививки отличался сорт Харитоньевская поздняя – 76,7±3,3%.

Привитые черенки алычи после сохранения в парах азота выявили примерно такую же приживаемость, как у сливы, а именно: от 60,0±4,3% до 45,2±3,1%.

Таблица 2 – Жизнеспособность черенков сливы, привитых на деревья в коллекционных садах после хранения в парах жидкого азота

Сорт/№ каталога	Количество черенков		Процент жизнеспособности черенков /среднее из трех повторностей по каждому сорту (%)
	привитых	жизнеспособных	
Слива (филиал Майкопская станция ВИР)			
Анна Шпет/ к-3325	10	6	60,0±13,2
	10	6	
	10	6	
Великий Герцог/ к-3399	10	6	63,3±12,3
	10	7	
	10	6	
Венгерка итальянская / к-3442	10	5	56,6±8,3
	10	6	
	10	6	
Аль Эрик/к-3316	10	5	53,3±6,7
	10	5	
	10	6	
Omida/к-30700	10	5	50,0±2,8
	10	4	
	10	6	
Слива (г. Мичуринск, ВНИИГ и СПР)			
Харитоньевская поздняя	10	8	76,7±3,3
	10	7	
	10	8	
Заречная ранняя	10	6	63,0±13,1
	10	7	
	10	6	
Венгерка заречная	10	5	53,3±4,2
	10	5	
	10	6	
Светлячок	10	4	46,6±3,8
	10	5	
	10	5	

Заключение

По результатам исследований можно сделать следующие рекомендации и заключение: жизнеспособность черенков и почек сливы и алычи, привитых на деревьях после хранения в азоте, различалась в зависимости от сорта и находилась на уровне от 76,7±3,3% до 46,6±3,8%.

На прорастание пыльцы яблони сорта Болотовское значительное влияние оказывают фактор освещенности и действие сверхнизких температур при криоконсервации. Полученные положительные данные по жизнеспособности растений после криоконсервации на примере хранения коллекции плодовых и ягодных культур дают возможность применения этих методов в научной и практической работе.

Литература

1. Филипенко Г.И. Развитие системы низкотемпературного хранения и криоконсервации генофонда растений в ВИР имени Н.И. Вавилова // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. СПб., 2007. Т. 164. С. 263–272.
2. Forsline F. et. al. Recovery and longevity of cryopreserved dormant apple buds. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1998, V. 123, no. 3, pp. 365–370.
3. Вержук В. Г., Тихонова Н.Г., Тихонова О.А. Фертильность пыльцы черной смородины (*Ribes nigrum* L.) при низких и сверхнизких режимах хранения // Материалы VII Международного симпозиума «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования» (Пушино, 18–22 июня 2007 г.). М.: РУДН, 2007. Т. 2. С. 66–68.
4. Высоцкий В.А. Биотехнологические приемы в современном садоводстве // Плодоводство и ягодоводство России. Т. XXVI. М., 2011. С. 3–10.
5. Мурашев С.В., Вержук В.Г., Бурмистров Л.А. Способ подготовки плодов семечковых культур к холодильному хранению: пат. 2283576 Российская Федерация. 2004. Бюл. № 26.
6. Мурашев С.В., Вержук В.Г., Коломичева Е.А. Способ обработки плодово-ягодных культур (варианты): пат. 2485764 Российская Федерация. 2012. Бюл. № 18.
7. Коломичева Е.А., Мурашев С.В. Действие аминокислотной обработки на состояние покоя растений, формирование плодов и их холодильное хранение (теоретические положения) // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия: Процессы и аппараты пищевых производств. 2013. № 2(16).
8. Бобко А.Л., Мурашев С.В. Адаптация к гипотермии плодово-ягодных растений и прогнозирование способности полученного урожая к холодильному хранению // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия: Процессы и аппараты пищевых производств. 2013. № 3(17).
9. Мурашев С.В., Гончарова Э.А., Бобко А.Л. Ферментативная активность в тканях растений в состоянии покоя и ее связь с продуктивностью и хранением запасующих органов в охлажденном состоянии // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15. № 3(5). С. 1670–1672.
10. Вержук В.Г., Павлов А.В., Тихонова О.А., Борзых Н.В., Дорохов Д.С. Оценка жизнеспособности геноплазмы плодовых культур после криосохранения в парах жидкого азота при –183–185°C // Факторы экспериментальной эволюции организмов: сб. науч. тр. Киев: ЛОГОС, 2013. Т. 13. С. 27–30.
11. Ситников М.Н., Вержук В.Г., Павлов А.В. Изучение жизнеспособности пыльцы яблони MALUS DOMESTICA BORKH. с использованием сред с различным содержанием сахарозы после криоконсервации // Сборник тезисов Международной научной конференции «Генетические ресурсы растений – основа продовольственной безопасности и повышения качества жизни» (Санкт-Петербург, 6–8 октября 2014 г.). СПб.: Р-КОПИ, С. 32.

References

1. Filipenko G.I. Razvitie sistemy nizkotemperaturnogo khraneniya i kriokonservatsii genofonda rastenii v VIR imeni N.I. Vavilova [Development of system of low-temperature storage and cryopreservation of a gene pool of plants in VIR of N. I. Vavilov]. *Works on applied botany, genetics and selection*. St. Petersburg, 2007, V. 164, pp. 263–272.
2. Forsline F. et. al. Recovery and longevity of cryopreserved dormant apple buds. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1998, V. 123, no. 3, pp. 365–370.
3. Verzhuk V. G., Tikhonova N.G., Tikhonova O.A. Fertil'nost' pyl'tsy chernoi smorodiny (*Ribes nigrum* L.) pri nizkikh i sverkh nizkikh rezhimakh khraneniya [Pollen fertility of black currant (*Ribes nigrum* L.) at low and ultra low storage modes]. *Proceedings of the VII International symposium "New and non-conventional plants and prospects of their use"*. Moscow, 2007, V. 2, pp. 66–68.
4. Vysotskii V.A. Biotehnologicheskie priemy v sovremennom sadovodstve [Biotechnological techniques in modern horticulture]. *Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii*. Moscow, 2011, V. XXVI, pp. 3–10.
5. Murashev S.V., Verzhuk V.G., Burmistrov L.A. *Sposob podgotovki plodov semechkovykh kul'tur k kholodil'nomu khraneniyu* [Way of preparation of fruits pome crops for the refrigerating storage]. Patent RF no. 2283576. 2004.
6. Murashev S.V., Verzhuk V.G., Kolomicheva E.A. *Sposob obrabotki plodovo-yagodnykh kul'tur (varianty)* [Way of processing of fruit and berry cultures (options)]. Patent RF no. 2485764. 2012.
7. Kolomicheva E.A., Murashev S.V. Deystvie aminokislotnoy obrabotki na sostoyanie pokoya rasteniy, formirovanie plodov i ikh kholodil'noe khranenie (teoreticheskie polozheniya) [Action of amino acids

- processing on a condition of rest of plants, formation of fruits and their refrigerating storage (theoretical provisions)]. *Scientific journal NRU ITMO. Series: Processes and equipment for food production*. 2013, no. 2(16).
8. Bobko A.L., Murashev S.V. Adaptaciya k gipotermii plodovo-yagodnykh rasteniy i prognozirovaniye sposobnosti poluchennogo urozhaya k kholodilnomu khraneniyu [Fruit plants hypothermia adaptation and prediction of yielded crop cold storage ability]. *Scientific journal NRU ITMO. Series: Processes and equipment for food production*. 2013, no. 3(17).
 9. Murashev S.V., Goncharova E.A., Bobko A.L. Fermentativnaya aktivnost v tkanyakh rasteniy v sostoyanii pokoya i eyo svyaz s produktivnostyu i khraneniem zapasayushchikh organov v okhlazhdennom sostoyanii [The enzymatic activity in plant tissues at rest and its relation to productivity and storage of storage organs in a refrigerated state]. *News of the Samara scientific center of the Russian Academy of Sciences*. 2013, V. 15, no. 3(5), pp. 1670–1672.
 10. Verzhuk V.G., Pavlov A.V., Tikhonova O.A., Borzykh N.V., Dorokhov D.S. Otsenka zhiznesposobnosti genoplazmy plodovykh kul'tur posle kriokhraneniya v parakh zhidkogo azota pri minus 183–185°C [Assessment of viability of a genoplazma of fruit crops after cryopreservation in vapors of liquid nitrogen at minus 183–185 °C]. *Collection of scientific works "Factors of experimental evolution of organisms"*. Kiev, LOGOS, 2013, V. 13, pp. 27–30.
 11. Sitnikov M.N., Verzhuk V.G., Pavlov A.V. Izuchenie zhiznesposobnosti pyl'tsy yabloni MALUS DOMESTICA BORKH. s ispol'zovaniem sred s razlichnym soderzhaniiem sakharozy posle kriokonservatsii [Studying of viability of pollen of an apple-tree of MALUS DOMESTICA BORKH. with use of environments with various content of sucrose after a cryopreservation]. *Abstracts of the International Scientific Conference "Plant genetic resources – the basis of food security and quality of life" (St. Petersburg, October 6–8, 2014)*. St. Petersburg, R–KOPI Publ., 2014, p. 32.

Статья поступила в редакцию 26.01.2016