

Жизнеспособность пыльцы плодовых культур после низкотемпературного хранения и криоконсервации

В.Г. ВЕРЖУК, Н.Г. ТИХОНОВА, А.С. ЖЕСТКОВ

ГНУ ГНЦ РФ ВНИИР им. Н.И. Вавилова, Россия, Санкт-Петербург

В современный период при нестабильности климатических, экологических, хозяйственно-экономических условий, происходящих в нашей стране и за ее пределами, существует угроза невосполнимой потери ценных коллекционных образцов вегетативно размножаемых плодовых культур.

Практическое решение проблемы состоит в организации длительного хранения исчезающих образцов в контролируемых условиях при низких и сверхнизких температурах и создания через культуру *in vitro* оздоровленных генетических коллекций растений [1, 2].

Перспективным способом хранения плодовых культур является криоконсервация вегетирующих частей растений (однолетние побеги, почки), а также семян и пыльцы в жидком азоте или его парах при температуре $-183\div-185^{\circ}\text{C}$ [3-6].

Криоконсервация пыльцы позволяет сохранять генетический материал более продуктивных и ценных по хозяйственным качествам сортов для осуществления планируемых скрещиваний независимо от количества свежесобранной пыльцы и погодных условий.

Основным критерием сохранности пыльцы в условиях низкотемпературного и криогенного хранения является ее жизнеспособность. В природных условиях жизнеспособность пыльцы культурных растений весьма различна – от нескольких часов (у злаковых), месяцев (у плодовых) и лет (у пальм) [7-9]. На жизнеспособность пыльцы заметно влияют погодные условия, при которых происходит формирование и созревание пыльцевых зерен [7, 10, 11, 12]. Низкая температура воздуха и влажность – лучшие условия для сохранения пыльцы плодовых культур [11, 13, 14]. Высушенная после сбора пыльца переносит очень низкую температуру ($-183\div-196^{\circ}\text{C}$), не теряя своей жизнеспособности и фертильности [9, 13, 15, 16].

Материалы и методы

В настоящей работе изучали действие разных температур хранения и способов замораживания на жизнеспособность пыльцы различных сортов яблони, сливы и земляники, отличающихся по срокам цветения и созревания плодов. Сбор и

Адрес для корреспонденции: Вержук В.Г., ГНУ ГНЦ РФ им. Н.И. Вавилова, ул. Б. Морская, 42, Санкт-Петербург, Российская Федерация; тел.: +7 (812) 314-77-14, e-mail: verzhuk@yandex.ru

подсушивание пыльцы вышеуказанных культур осуществляли в коллекционном саду ПОС ВИР согласно методическим указаниям [17]. Часть пыльцы использовали для определения исходной жизнеспособности, а остальную – помещали в контейнеры с пробирками фирмы “Nunc” и закладывали на хранение при температуре -20 и -183°C . Пыльцу при -20°C хранили в морозильной камере холодильника марки “Gibson”. Замораживание пыльцы до сверхнизких температур осуществляли путем прямого погружения пробирок с пыльцой в азот, либо с предварительным охлаждением до -20°C в течение суток, основываясь на данных [6, 15], согласно которым режим быстрого замораживания пыльцы является наиболее благоприятным. Размораживание сохраняемого материала проводили в водяной бане при температуре 37°C в течение минуты.

Жизнеспособность пыльцы определяли методом проращивания в искусственной среде, содержащей 15%-й раствор сахарозы, на 0,5%-м растворе агар-агара. Одновременно контролировали процент нормально выполненных пыльцевых зерен их окрашиванием в ацетокармине. Количество проросших и окрашенных ацетокармином пыльцевых зерен подсчитывали под микроскопом при 100-кратном увеличении в 8-10 полях зрения в 3-х повторностях. По количеству проросшей пыльцы определяли процент жизнеспособности изучаемых сортов плодовых культур.

Результаты и обсуждение

Результаты по определению жизнеспособности пыльцы яблони приведены в табл.1. Полученные данные свидетельствуют о том, что исходная жизнеспособность пыльцы, проверенная лабораторным методом, зависит как от сортовых особенностей, так и от погодных условий в период ее формирования [13, 17]. Отмечено, что 2002 год для созревания пыльцы был по погодным условиям более благоприятным, а именно: плюсовые температуры в период цветения составили $15-20^{\circ}\text{C}$. Следует также указать, что окрашивание пыльцы ацетокармином, характеризующее ее зрелость, выполненность, не всегда коррелирует со способностью к прорастанию.

Доля жизнеспособных пыльцевых зерен после года хранения при -20°C оставалась на уровне

исходной. Небольшое понижение жизнеспособности пыльцы ряда сортов имело место при хранении в парах азота за исключением сорта Июльское Петрова, у которого жизнеспособность повысилась после -183°C . Резкого падения жизнеспособности пыльцы яблони в обоих режимах мы не наблюдали. При краткосрочном хранении не выявлено преимуществ криоконсервации перед низко-температурным режимом – для такого срока хранения температура -20°C и -183°C оказались одинаково приемлемы.

Сорта яблони по скорости созревания имели различную устойчивость пыльцы при хранении летних, осенних и зимних форм. Повышенная жизнеспособность пыльцы отмечена у эстонского сорта Теллисаари (65,8-67,7%) и Крапчатое (56,7-66,6%), а самая низкая – у летнего сорта Июльское Петрова (30,6-41,2%).

Жизнеспособность пыльцы сливы, изучали на семи сортах культуры с различными сроками цветения – от раннеспелых до позднеспелых. Процесс замораживания и размораживания пыльцы проводили аналогично сортам яблони.

Результаты определения исходной жизнеспособности и после 5-ти месяцев хранения пыльцы сливы в различных режимах приведены в табл. 2.

Таблица 2. Влияние режимов хранения на жизнеспособность пыльцы сливы домашней (*Prunus L.*)

Номер каталога	Название сорта	Происхождение	Исходная жизнеспособность, %	После 5 месяцев хранения, %	
				-20°C	-183°C
К- 29051	Награда Россошанская	Воронежская обл.	32,2±2,1	49,6±1,4	3,03±1,2
К- 4022	Скороспелка красная	Местный сорт	18,1±2,9	43,2±0,1	13,4±1,2
К- 15353	Волжская красавица	г. Самара	42,0±2,6	40,6±2,9	33,5±1,7
К- 28829	Венгерка Пулковская	Ленобласть	34,8±2,2	37,6±4,0	35,9±3,8
К- 15272	Ренклюд колхозный	г. Мичуринск	29,5±1,2	34,6±2,9	36,8±0,25
К- 36704	Тулльская черная	Местный сорт	18,8±0,9	18,5±2,0	19,3±2,4
К- 3957	Ренклюд реформа	г. Мичуринск	14,0±1,6	18,2±3,3	18,7±4,8

Таблица 1. Жизнеспособность пыльцы сортов яблони после разных режимов хранения (сбор 2002 года)

Сорт, образец	Доля пыльцы, окрашенной ацетокармином, %	Жизнеспособность пыльцевых зерен, %				
		Исходная	После 5 месяцев хранения		После года хранения	
			-20°C	-183°C	-20°C	-183°C
Июльское Петрова	60,2±4,1	33,5±3,2	30,6±1,9	33,8±2,8	33,5±3,2	41,2±0,5*
Ароматное	77,1±2,5	47,3±3,3	32,2±3,7	44,7±2,9	47,3±3,3	39,8±0,2*
Теллисаари	97,3±0,5	67,7±1,3	52,7±2,8	64,7±4,1	67,7±1,3	65,8±0,7
Крапчатое	98,2±0,7	66,6±1,2	63,0±1,4	59,3±2,2	66,6±1,2	56,7±3,1*
Скрижапель	90,4±0,4	69,2±1,5	61,6±2,6	55,1±0,9	69,2±1,5	–
№88	79,3±2,3	56,2±1,3	54,2±1,4	65,2±1,3	54,2±1,4	54,0±2,7
Коричное полосатое	85,0±1,5	69,7±3,6	44,9±1,6	62,6±1,2	44,9±1,6	51,0±0,7*

Примечания: * – НСР при 5% уровне достоверности

Из таблицы 2 видно, что жизнеспособности пыльцы сливы, аналогично яблони, зависит от сортовых особенностей и климатических условий в период ее созревания. В 2004 году в период цветения ряда сортов сливы (II декада мая) понижение температуры воздуха до $5-8^{\circ}\text{C}$ отразилось на жизнеспособности пыльцы. Период цветения затянулся на 1,5-2 недели. В итоге у таких сортов как Скороспелка красная, Тульская черная, Ренклюд реформа процент жизнеспособности оказался в пределах 14,0-18,1%. Более высокой исходной жизнеспособностью пыльцы характеризовались сорт Волжская красавица – 42,0% и местный сорт Венгерка Пулковская – 34,8%.

Результаты после 5-ти месяцев хранения пыльцы в различных режимах показали, что для большинства сортов более благоприятным было хранение при температуре -20°C . При таком режиме выделились сорта Награда Россошанская (49,6%) и Скороспелка красная (43,2%), но у них оказалась самая низкая жизнеспособность после хранения в азоте. У остальных сортов, кроме Волжской красавицы, наблюдалось некоторое повышение жизнеспособности. Более выровненным по данному показателю при изучаемых режимах оказался сорт Волжская красавица (33,5÷42,0%).

Для изучения исходной жизнеспособности пыльцы земляники и после ее криоконсервации были взяты 4 вида культуры: *Fragaria vesca*, *F. viridis*, *F. moschata* и *F. moschata* × *F. moupinensis*. Сбор, подсушивание, замораживание и проращивание пыльцы земляники проводили согласно вышеуказанной методике. Данные по исходной жизнеспособности пыльцы земляники и после 5-ти месяцев хранения в азоте приведены в табл. 3.

Изучение способов замораживания пыльцы земляники показало, что более предпочтительным способом (по сравнению с прямым погружением в пары азота) является погружение в азот после предварительного замораживания при -20°C в течение суток. Из таблицы 3 видно, что жизнеспособность пыльцы земляники после хранения снизилась по сравнению с исходной, за исключением *F. moschata*, у которой после двухэтапного замораживания изменения жизнеспособности не наблюдалось.

Выводы

Из полученных данных по низкотемпературному хранению пыльцы различных плодовых культур при -20°C и в парах азота (-183°C) можно сделать следующие выводы.

1. Сохранение жизнеспособности пыльцы плодовых культур зависит от ее физиологического состояния и сортовых особенностей.

2. При непродолжительном хранении пыльцы температурные режимы -20 и -183°C одинаково приемлемы.

3. В ряде случаев сверхнизкая температура (-183°C) вызывала увеличение жизнеспособности пыльцы после хранения по сравнению с исходной.

Литература

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология растений.– М., 1964.– 18 с.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений.– Киев, 1980.– 142 с.
3. Вержук В.Г., Тихонова Н.Г., Шубин Н.А. и др. Криоконсервирование меристем картофеля и низкотемпературное хранение побегов плодовых культур // Сб. тезисов Международной науч. конф. "Проблемы физиологии растений севера".– Петрозаводск, 2004.– С. 38.
4. Соловьева М.А. Формирование признаков морозостойкости плодовых растений и методы оценки селекционного материала на устойчивость к низким и переменным температурам // Сб. научн. тр. "Селекция

Таблица 3. Жизнеспособность пыльцы земляники после 5-ти месяцев хранения в различных режимах

Вид земляники	Жизнеспособность, %		
	Исходная	После 5 месяцев хранения при -183°C	
		Непосредственное погружение в жидкий азот	Погружение после предварительного замораживания при -20°C
<i>Fragaria vesca</i>	34,9±2,75	13,7±1,2	17,0±2,0
<i>F. moschata</i>	35,9±0,95	29,3±1,6	37,1±3,4
<i>F. moschata</i> × <i>F. moupinensis</i>	0	0	0
<i>F. viridis</i>	38,8±3,5	17,6±0,5	21,1±1,2

плодовых и ягодных культур".– Новосибирск, 1998.– С.15-25.

5. Forsline P.I., Towill L. E., Waddel J. W. et al. Recovery and longevity of cryopreserved dormant apple buds // J. Amer. Soc. Hort. Sci.– 1998.– Vol. 123, N3.– P. 365-370.
6. Kozaki I., Omura M., Matsuta N., Moriguchi T. Germplasm Preservation of Fruit Trees // Preservation of Plant Genetic Resources. Japan International Cooperation Agency.– 1988.– P. 65-74.
7. Verzhuk V., Safina G., Tikhonova N., Shubin N. Viability of Fruit Crop Scions and Apple Pollen Stored at Low and Ultralow Temperatures (Cryopreservation) // Agriculture. Scientific articles.– 2002.– Vol. 78, N2.– P. 283-288.
8. Вержук В.Г., Сафина Г.Ф., Тихонова Н.Г., Шубин Н.А. Жизнеспособность побегов и пыльцы плодовых культур при действии низкой и сверхнизкой температуры // Сельскохозяйственная биология.– 2005.– №3.– С. 50-54.
9. Стрибуль Т.Ф., Шевченко Н.А. Методические подходы к криоконсервированию меристемальных тканей // Материалы Международной конференции "Сохранение генетических ресурсов".– СПб, 2004.– С. 867-868.
10. Высоцкая О.Н., Попов А.С. Сравнение технологических приемов криосохранения апикальных меристем растений // Материалы Международной конференции "Сохранение генетических ресурсов".– СПб, 2004.– С. 774-775.
11. Голубинский И.Н. Биология прорастания пыльцы.– Киев: Наук. думка.– 1974.– С. 88-107.
12. Дуганова Е.А. О жизнеспособности пыльцы яблони, груши и айвы // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции.– Л., 1973.– Т. 40.– Вып. 3.– С. 43-49.
13. Филиппова Т.В. Возможность длительного хранения пыльцы кукурузы при температуре -196°C // Теоретические основы селекции.– Новосибирск, 1985.– С. 64-68.
14. Дорошенко А.В. Физиология пыльцы // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции.– Л., 1928.– С. 224-241.
15. Исаев С.И., Домрачева И.И. Жизнеспособность пыльцы новых сортов яблони и их исходных форм // Биол. науки.– 1973, №7.– С. 108-112.
16. Котоман Е.М., Беспечальная В.В. Особенности опыления и оплодотворения вишни в условиях Молдавии // Физиолого-биохимические исследования плодовых пород.– Кишинев, 1989.– С. 63-71.
17. Манжулин А.В., Яшина И.М. Хранение пыльцы картофеля при сверхнизких температурах // Сельскохозяйственная биология.– 1984, №4.– С. 56-59.

18. Томясян В.С. О динамике прорастания и сохраняемости жизнеспособности пыльцевых зерен у некоторых розоцветных // Биол. журнал Армении.– 1987.– Т. 40, №6.– С. 508.
19. Сытник К.М., Мануильский В.Д. Криоконсервация и длительное хранение эмбрионов и пыльцы растений.– Пуццино, 1983.– С. 5-31.
20. Parfitt D.E., Almendi A.A. Liquid Nitrogen Storage of Pollen from File Cultivated Prunus Species // Hort. Science.– 1984.– Vol. 19, N1.– P. 69-70.
21. Нестеров Я.С. Изучение коллекции семечковых культур и выявление сортов интенсивного типа: Методические указания.– Л., 1986.– С. 69-75.