

УДК 57.086.13

ИЗУЧЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПЫЛЬЦЫ ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ СВЕРХНИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР

Замбурова Д.С., Шериева С.А., Ситников М.Н., Боготова З.И., Гидова Э.М., Паритов А.Ю., Хандохов Т.Х., Кармокова М.К.

ГОУ ВПО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова», Нальчик, e-mail: genetic@mail.ru

В ходе исследования проведена работа по криоконсервации пыльцы плодовых растений и изучена жизнеспособность пыльцы после воздействия сверхнизких температур (-196 °С) в лабораторных и полевых условиях. Исследования проводились на растениях абрикоса *Armeniaca vulgaris Lam.* двух сортов: Шалах и Краснощекий, и растениях яблони *Malus domestica* сортов Пинова, Майрак, Гала и Бребурн, с которых собиралась пыльца. Оценку жизнеспособности в лабораторных условиях проводили путем проращивания на различных питательных средах. В ходе проверки жизнеспособности в полевых условиях опылялись изолированные цветки исследуемых растений пыльцой, прошедшей криоконсервацию. Показана возможность длительного сохранения пыльцы в парах жидкого азота. Фертильность пыльцы после замораживания до сверхнизких температур сохраняется. На основе полученных результатов можно рекомендовать метод прямого замораживания пыльцы для создания коллекции пыльцы и реализации различных селекционных программ.

Ключевые слова: криоконсервация, фертильность пыльцы, сохранение генофонда, сверхнизкие температуры, плодовые культуры.

STUDY VIABLE POLLEN AFTER EXPOSURE TO FRUIT CROPS ULTRALOW TEMPERATURES

Zamburova D.S., Sherieva S.A., Sitnikov M.N., Bogotova Z.I., Gidova E.M., Paritov A.Yu., Handohov T.H., Karmokova M.K.

Kabardino-Balkarian State University n.a. H.M. Berbekov, Nalchik, e-mail: genetic@mail.ru

In the study, carried out the work on the cryopreservation of pollen and fruit plants examined the viability of pollen after exposure to very low temperatures (-196°C) in laboratory and field conditions. The studies were conducted on plants Apricot *Armeniaca vulgaris Lam.* two varieties: red-cheeked and Shalah, and plants of apple *Malus domestica* varieties, Mayrak, Gala, Pinova and Breburn from which collects pollen. Assessment of viability in vitro was carried out by germination on various nutrient media. During the test the viability of field, isolated pollinated flowers studied pollen held cryopreservation. The possibility of long-term preservation of pollen in liquid nitrogen vapor. Pollen fertility after freezing to very low temperatures is maintained. Based on these results we can recommend the method of direct freezing of the pollen to create a collection of pollen and the implementation of various breeding programs.

Keywords: cryopreservation, pollen fertility, preservation of the gene pool, ultra-low temperature, fruit crops.

Сохранение генофонда культурных растений – один из важнейших компонентов в сохранении природного биоразнообразия, которому уделяется большое внимание во всем мире. Связано это с ухудшением почвенно-климатических условий, вызванным мощным техногенным воздействием цивилизации на окружающую среду, от которого страдают человек и растения. Большое количество видов еще недостаточно изучено, однако многие из них 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 [4]. 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, цветущие в разное время года или географически удаленные; сокращать площади, занятые под сорта-опылители.

Использование метода длительного хранения пыльцы в криобанках дает возможность сохранять жизнеспособные пыльцевые зерна в таком количестве и столько, сколько потребуется для круглогодичного обеспечения и широкого обмена генетическим фондом как внутри страны, так и за ее пределами [3]. Целью нашей работы была оценка жизнеспособности пыльцы абрикоса и яблони после хранения в парах жидкого азота (-196 °С).

Для достижения поставленной цели нами решались следующие задачи: сбор пыльцы абрикоса и яблони в период интенсивного цветения; подготовка и замораживание пыльцы в жидком азоте при температуре -196 °С; размораживание пыльцы и проверка жизнеспособности в лабораторных условиях; опыление изолированных цветков.

Материалы и методы исследования

Исследования проводились на растениях абрикоса *Armeniaca vulgaris Lam.* двух сортов: Шалах и Краснощекий, и растениях яблони *Malus domestica* сортов Пинова, Майрак, Гала и Бребурн, с которых собиралась пыльца.

Сорта абрикоса: **Краснощекий** - сорт, выведенный в Никитском ботаническом саду в результате скрещивания сорта Королева Ольга с Ранним Риверса. 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.

Шалах - старый местный армянский сорт, широко распространённый, главным образом в Ереванском районе, пользующийся очень широкой популярностью как отличный столовый и консервный сорт, с крупными красивыми плодами высоких вкусовых качеств. В Никитский ботанический сад этот сорт был завезён ещё до Октябрьской революции, но в производственное испытание в других районах юга СССР передан лишь в 1934-1937 гг. Дерево средней величины с прочной кроной. Первые плоды дает на 5-6-й год. С дерева снимают до 30-35 кг абрикосов. Плоды среднего размера (25 г), округлой формы, светло-оранжевые. Мякоть сочная, сладкого, приятного вкуса [5].

Сорта яблони: **Пинова**, получен в Германии в 1986 году скрещиванием сортов

Кливия и Голден Делишес. Плоды вышесреднего размера, одномерные, округло конусообразные, с достаточно узкой верхушкой, зеленовато-желтые, с оранжево-красным штриховато-размытым румянцем, который покрывает 60-70% поверхности. В плодоношение вступает рано, на второй год роста в саду. Плодоносит ежегодно и щедро. Склонный к избыточному завязыванию плодов и перегрузке урожаем. На прореживание завязи и летнюю обрезку реагирует увеличением размеров и улучшением расцветки яблок.

Шкурка тонкая, но плотная, гладкая и блестящая. Мякоть желтая, очень плотная, ломкая, сочная, с приятным ароматом, отличного кисловато-сладкого вкуса.

Бребурн - получен в Новой Зеландии в 1952 г. от скрещивания сорта Леди Гамильтон X свободное опыление Гала и Грани Смит. Сорт скороплодный. Высоко-транспортабельный. Длительный вегетационный период. Диплоид. Цветёт поздно. Универсальный опылитель для всех зимних и поздних сортов. Склонен к периодичному плодоношению. Для потребления в свежем виде, салатов и выпечек. Окраска: оранжево-красная с небольшим размытым красным румянцем. Вкус: гармоничный, освежающий, с сильным ароматом, оригинальный.

Майрак - плоды среднего размера, в форме усеченного конуса, с ровной кожей, с небольшими шероховатостями, едва покрытыми «ржавчиной». Плоды имеют мраморный красно-коричневый окрас. Получен от скрещивания двух сортов: Гала + Майголд. Имеет очень плотные и сочные плоды, кисло-сладкие, ароматные, которые очень хорошо хранятся.

Гала - позднеосенний (иногда относят к раннезимнему) диплоидный сорт яблони, выведенный в 1962 году в Новой Зеландии в результате скрещивания двух сортов: Голден Делишес x Киддс оранж Ред. Форма плодов может быть округлой или округло-конической, одно яблоко весит в среднем 115-145 граммов (максимальный вес не превышает 170 г). Основной окрас плодов — желтый или зеленовато-желтый, покровная окраска выражена в форме полосато-размытого румянца оранжево-красного оттенка практически на всей поверхности плода. Мякоть имеет светло-желтый окрас и плотную, гранулированную структуру, на вкус - сочная, кисловато-сладкая, хрустящая, ломкая, с приятным, свежим орехово-карамельным ароматом [6].

Сбор пыльцы исследуемых сортов проводили в период интенсивного цветения. Затем пыльцевые зерна подсушивали в течение двух дней в помещении при температуре 25-30 °С и перемешивали каждый день. 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 см можно услышать звонкий звук падающих зерен [2].

Подсушенные пыльцевые зерна замораживали в жидком азоте (-196 °С) методом

витрификации, то есть непосредственным погружением в жидкий азот в специальных криопробирках. Экспозиция в жидком азоте составляла двое суток. Затем пыльцевые зерна размораживались. Часть пыльцы после криоконсервации использовалась для опыления изолированных цветков, а другая часть проверялась на жизнеспособность путем проращивания в питательной среде с агарозой и сахарозой разной концентрации вместе с контрольной пыльцой, собранной с тех же растений.

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 °С; переносом непосредственно из жидкого азота на воздух; быстрым прохождением температурного диапазона от -196 до -50 °С с последующим переходом до 0 °С. При необходимости после хранения в жидком азоте доведенную до 0 °С пыльцу можно хранить в течение нескольких дней в холодильнике в эксикаторе с хлористым кальцием [1].

Метод криоконсервации, позволяющий поддерживать живые клетки, ткани, культуры при ультранизких температурах (-196 °С), обеспечивает хранение биологических материалов в течение длительного времени, так как при температуре жидкого азота прекращаются метаболическая активность и деление клеток, поэтому в них не происходит генетических изменений. На сегодня криоконсервация считается единственной приемлемой технологией для долговременного, надежного, низкочувствительного хранения различных категорий растительного материала, включая неортодоксальные семена, зиготические и соматические эмбриониды, суспензионные клетки, каллусы, протопласты, гаметы и меристемы [7].

Лабораторное определение относительной жизнеспособности пыльцы исследуемых сортов после криоконсервации проводилось методом проращивания на искусственных питательных средах с градиентным содержанием сахарозы. В трех вариантах опыта концентрация сахарозы составляла 5, 10, 15% соответственно. Процент жизнеспособности пыльцы определялся 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.

Результаты и обсуждение

Жизнеспособность пыльцы абрикоса

При подсчете проросших пыльцевых зерен абрикоса сорта Краснощекий на питательной среде с 15%-ной концентрацией сахарозы выяснилось, что проросло всего 33% пыльцевых зерен, подвергшихся влиянию сверхнизких температур. В питательной среде

концентрацией 10% проросло 47,5% пыльцевых зерен. Для абрикоса сорта Краснощекий максимальное число проросшей пыльцы наблюдалось в растворе с концентрацией сахарозы 5%, где проросло 50% пыльцевых зерен после криоконсервации (табл. 1).

Таблица 1

Жизнеспособность пыльцы после воздействия сверхнизких температур (-196 °С), %

Концентрация питательной среды, %	Название образца			
	Краснощекий		Шалах	
	Исходная, %	После криоконсервации, %	Исходная, %	После криоконсервации, %
5	60	50	37,5	34
10	56	47,5	50	47,2
15	38	33	50	41

В опыте с сортом Шалах были получены следующие данные: в питательной среде концентрацией 5% проросло только 34% пыльцевых зерен. На питательной среде с концентрацией сахарозы 15% проросло 40% пыльцевых зерен. Для абрикоса сорта Шалах максимальное число проросшей пыльцы наблюдалось в растворе с концентрацией сахарозы 10%, где проросло 47,2% пыльцевых зерен.

После проверки жизнеспособности пыльцы на искусственных питательных средах было проведено опыление изолированных цветков абрикоса сортов Краснощекий и Шалах. Дата опыления 20.04.2015 г.

Нами было обнаружено 38 образовавшихся завязей сорта Краснощекий и 24 завязи сорта Шалах. Также было проведено опыление цветков абрикоса сорта Краснощекий пыльцой абрикоса сорта Шалах, прошедшей криоконсервацию. Были получены 2 гибридные завязи. Дата обнаружения завязей 13.05.2015 г.

Жизнеспособность пыльцы яблони

Пыльца собиралась с растений яблони сортов Пинова, Майрак, Бребурн и Гала в период бутонизации, подсушивалась и замораживалась погружением в жидкий азот. После размораживания часть этой пыльцы использовалась для опыления предварительно изолированных цветков сортов Ред Фри, Айдаред, Лескенское и Сафаре, у которых заранее были удалены пыльники.

В таблице 2 представлены данные, которые показывают, что наибольшей способностью к прорастанию, независимо от концентрации сахарозы в питательной среде, обладает сорт Майрак. Оптимальной для прорастания пыльцы сорта Пинова является

концентрация сахарозы 10%, тогда как для сорта Гала этот показатель 15%. По литературным данным [6], жизнеспособность пыльцы сорта Гала колеблется от 73 до 89%, в наших исследованиях этот показатель несколько ниже, так как мы собирали пыльцу из нераспустившихся бутонов. Пыльца сорта Бребурн также наилучшим образом прорастает на питательной среде с 15%-ным содержанием сахарозы, причем снижение концентрации этого компонента в питательной среде вызывает снижение количества проросших пыльцевых зерен.

Таблица 2

Жизнеспособность пыльцы яблони после воздействия сверхнизких температур (-196 °С), %

Концентрация питательной среды, %	Название образца							
	Пинова		Майрак		Бребурн		Гала	
	Исходная, %	После криоконсервации, %	Исходная, %	После криоконсервации, %	Исходная, %	После криоконсервации, %	Исходная, %	После криоконсервации, %
5	42,7	40,3	78,4	80,2	64,2	63,8	62,4	60,1
10	71,2	68,8	89,3	92,4	82,1	80,7	74,8	72,5
15	67,6	67,1	96,5	97,3	89,4	88,8	91,3	90,7

Проверка жизнеспособности пыльцы исследуемых сортов яблони в полевых условиях путем опыления предварительно изолированных цветков показала, что после воздействия сверхнизких температур фертильность пыльцы сохраняется. Дата опыления 20.04.16. Наилучшую жизнеспособность в полевых условиях показала пыльца сорта Майрак. При использовании пыльцы этого сорта в качестве отцовской формы удалось получить 53 завязи в каждой комбинации.

При опылении сортов Ред Фри, Айдаред, Лескенское и Сафаре пыльцой сортов Пинова и Гала также были получены хорошие результаты. Количество завязей во всех комбинациях составило 38 и 34 соответственно. Пыльца сорта Бребурн в нашем эксперименте оказалась несколько менее фертильна, чем пыльца других сортов, однако нами были получены завязи при опылении этой пыльцой каждого экспериментального сорта, общее количество завязей составило 27, меньше всего завязей было обнаружено в комбинации ♂Бребурн x ♀Лескенское, где удалось зафиксировать всего 3 завязи. Это можно объяснить сложными погодными условиями в период опыления и развития, а также отсутствием агрохимических

обработок на экспериментальном участке сада. Дата обнаружения завязей 04.06.16.

Выводы

Проверка жизнеспособности пыльцы исследуемых сортов путем опыления изолированных цветков показала, что после воздействия сверхнизких температур фертильность пыльцы сохраняется.

Проверка жизнеспособности пыльцы абрикоса на питательных средах с градиентным содержанием сахарозы показала, что пыльца сорта Краснощекий оказывается наиболее жизнеспособной в питательной среде с концентрацией 5%. Жизнеспособность пыльцы сорта Шалах оказалась наивысшей в среде с концентрацией 10%.

Проверка жизнеспособности пыльцы яблони сортов Пинова, Майрак, Бребурн и Гала на питательных средах с градиентным содержанием сахарозы показала, что наиболее оптимальной для прорастания пыльцы сорта Пинова является питательная среда с содержанием сахарозы 10%. Для сортов Бребурн и Гала наиболее оптимальной для прорастания пыльцы является 15%-ная концентрация сахарозы в питательной среде. Пыльца сорта Майрак хорошо прорастает во всех питательных средах. Проверка жизнеспособности пыльцы яблони после воздействия сверхнизких температур путем опыления изолированных цветков показала, что фертильность пыльцы сохраняется на достаточно высоком уровне.

На основе полученных результатов можно рекомендовать метод прямого замораживания пыльцы плодовых растений для реализации различных селекционных программ.

Список литературы

1. Вепринцев Б.Н., Ротт Н.Н. Консервация генетических ресурсов. — Пущино : ОНТИ, Научный центр биологических исследований АН СССР, 1984. — С. 40-46.
2. Вержук В.Г., Тихонова Н.Г., Дорохов Д.С. Действие низких и сверхнизких температур на фертильность пыльцы яблони (*Mallus domestica* L.) // VIII Международный симпозиум «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». — М., 2009. — С. 72-76.
3. Вержук В.Г., Тихонова О.А., Павлов А.В., Еремина О.В., Борзых Н.В. Хранение генетических ресурсов садовых культур при доступном режиме сверхнизких температур жидкого азота // Международная научно-практическая конференция «Хранение и использование генетических ресурсов садовых и овощных культур». — Крымск, 2015. — С. 128-130.
4. Вержук В.Г., Филипенко Г.И., Тихонова Н.Г., Жестков А.С., Лупышева Ю.В., Пупкова Н.А., Михайлова Е.В., Савельев Н.И., Дорохов Д.С. Разработка методов

криосохранения генетических ресурсов растений плодовых и ягодных культур // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. — 2009. — Т. 166. — С. 353-357.

5. Жуковский П.М. Культурные растения и их сородичи. - Л. : Колос, 1971. — С. 477-483.

6. Седов Е.Н., Корнеева С.А., Серова З.М. Колонновидная яблоня в интенсивном саду. — Орел : ВНИИСПК, 2013. — 64 с.

7. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. - 2011. - V. 47. - P. 5–16.