

УДК 634.1:581

Анализ эффективности методов криоконсервации по показателю жизнеспособности плодовых растений после криосохранения

Канд. биол. наук В.Г. Вержук, А.В. Павлов, vverzhuk@mail.ru

Всероссийский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова
Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42-44

Результаты исследований показали возможность криоконсервации геноплазмы растений на примере черенков и почек ряда плодовых культур, произрастающих в различных эколого-географических регионах России.

Применяя методы криоконсервации необходимо учитывать также характер и степень влияния факторов замораживания, а также исходное состояние биообъекта. Для определенных культур и сортов в работе с криопротекторами при замораживании почек необходим подбор различных питательных сред и режимов криоконсервирования. Следует отметить, что после сохранения черенков и почек в парах азота получены жизнеспособные растения после прививки на взрослые деревья, а разработка методик криосохранения косточковых и семечковых культур позволит сохранить ценные генотипы и сорта для дальнейшего применения в научных и хозяйственных целях.

Анализируя приживаемость черенков вишни и черешни после криосохранения следует отметить, что жизнеспособность черенков вишни находилась на уровне $87 \pm 6,2$ и $83 \pm 7,0\%$, у черешни в пределах $60 \pm 9,1$ и $70 \pm 8,5\%$, что тоже больше половины. Метод криоконсервации почек с помощью криопротекторной обработки перспективный и эффективный, который необходимо развивать для оценки образцов коллекций современного генофонда.

Ключевые слова: криоконсервация, криопротекторы, плодовые культуры- груша, вишня, черешня, слива, черенки, почки, сорта.

Analysis of the effectiveness of cryopreservation methods on indicators viability of fruit after cryopreservation

Ph. D. V. G. Verzhuk, A.V. Pavlov, vverzhuk@mail.ru

All-Russian Institute of Plant. N.I. Vavilov
St. Petersburg, st. Bolshaya Morskaya, 42-44

The results show the possibility of cryopreservation genoplazmy of plants on an example cuttings and kidneys of several fruit grown in different eco-geographical regions of Russia. Applying the methods of cryopreservation It is necessary to consider the nature and extent of influence of freez factors, as well as the initial state bioobject. It is necessary to select different culture media and modes of cryopreservation For certain crops and sorts in the work with cryoprotectants during freezing kidney. It should be noted that after saving cuttings and kidney grafts in nitrogen vapor, viable plants were produced after inoculation on mature trees, and the development of cryopreservation methods of stone and pome will preserve valuable genotypes and sorts for further use in scientific and economic purposes. Analyzing the survival rate of cuttings cherries after cryopreservation It should be noted that the viability of cherries grafts was at $87 \pm 6,2\%$ and $83 \pm 7,0\%$, at the cherries within 60 and $70 \pm 9,1 \pm 8,5\%$, that also more than half. Miracle Cherry is cherry sort which has an increased viability among of the studied varieties ($87 \pm 6,2$).

Keywords: cryopreservation, cryoprotectants, fruit - pear, cherry, cherry plum, cuttings, kidneys, sort.

Криобиология – молодая отрасль биологии, которая изучает действие низких температур на объекты животного и растительного мира. Явления, эффекты и свойства, проявляющиеся в низкотемпературной области, открывают перед учеными и инженерами широкий круг новых возможностей. В своем обзоре английский физик Ф. Сэймон отметил, «... это та область, в которой человек существенно превзошел саму природу».

Достижение низких и сверхнизких температур ценно для нас тем, что в этих условиях мы встречаемся с новыми явлениями и фактами, которые помогают проникать в суть строения материи, позволяют использовать новые методы исследования; наконец низкие температуры являются важным инструментом технического прогресса, особенно в области новой техники (Шубин Н.А.).

Сохранение генофонда культурных и дикорастущих видов растений является одной из основных задач в отечественном растениеводстве. В настоящее время около 100 тыс. видов растений находятся под угрозой исчезновения. Сохранение биологического разнообразия растений от исчезновения возможно двумя путями: 1 – сохранение *in situ* (в естественных условиях – полях, лесах, больших массивах садовых и ягодных насаждений) и 2 – сохранение *ex situ* (в образованных заповедниках, коллекционных садах и питомниках, различных генетических банках животных, рыб, растений, микроорганизмов и т.д.).

Не переносят сверхнизкую температуру лишь семена тропических растений, таких как какао, кокосовая пальма и др., поэтому их хранят в культуре *in vitro*. Учитывая биологическую особенность плодовых растений, а именно, то что все плодовые перекрестноопыляемые, и при семенном размножении признаки материнского растения практически не сохраняются в потомстве, то для сохранения отдельного сорта или образца, ценного для скрещивания в селекционной работе или в генетических исследованиях, перспективным способом хранения плодовых культур является криоконсервация вегетативных частей растений (однолетние побеги, почки, меристемы), а также пыльцы и некоторых семян в жидком азоте или его парах при $-183...-185^{\circ}\text{C}$.

Замораживанием древесных растений до сверхнизких температур начали заниматься еще в 60–70 годы прошлого века. Советский ученый И.И. Туманов и др. (1959), затем японец А. Sakai (1975) установили способность выживания плодовых веток после погружения в жидкий азот. В 80-е годы Б.Н. Вепринцев разработал программу по созданию криобанков в России, предназначенных для хранения в них живых объектов, включая и растительные, с дальнейшим восстановлением.

Криоконсервация – сложный многоэтапный процесс, который проводит экспериментатор с целью сохранить живыми клетки, ткани, органы в глубоком холоде в состоянии анабиоза (скрытой жизни). Главное преимущество хранения при очень низких температурах состоит, видимо, в способности значительно замедлять или даже останавливать метаболические процессы в тканях растений и животных.

Насколько известно, хранящийся при низких температурах материал остается генетически стабильным, что позволяет избежать генетических изменений, присущих организмам при развитии в обычных условиях. Криосохранение вегетативных побегов, почек и пыльцы плодовых культур имеет ряд преимуществ над другими способами хранения по следующим критериям:

1. поддерживается сортовая целостность культуры,
2. низкая стоимость поддержания по сравнению с садовыми посадками,
3. занимает мало места при хранении,
4. увеличивается длительность хранения на десятки и сотни лет.
5. достигается оптимизация хранения за счет изменения условий обезвоживания, замораживания и оттаивания.
6. удобная транспортировка для дальнейшего восстановления через окулировку, прививку или опыление пыльцой.

Разработка и усовершенствование существующих методов криоконсервации и криосохранения растений или отдельных его частей начата нами после создания материально-технической базы и завершения строительства в 2004 году криобиохранилища при Генетическом банке ВИР. Исследуемым материалом служили сорта коллекции плодовых и ягодных культур Павловской опытной станции ВИР, Майкопской опытной станции ВИР, Крымской опытно-селекционной станции и Всероссийского научно-исследовательского института генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина.

В течение ряда лет была проведена работа по криоконсервации и криосохранению таких плодовых и ягодных культур, как черная смородина, жимолость, яблоня, груша, черемуха обыкновенная. С начала работы криобанка ВИР и по настоящий период проводится закладка на длительное хранение пыльцы плодовых и ягодных культур.

Основное достижение при работе в условиях низких и сверхнизких температур ценно для нас тем, что в этих условиях мы встречаемся с новыми явлениями и фактами, которые помогают проникнуть в суть строения материи, позволяют использовать новые методы исследований, наконец, низкие температуры являются важным инструментом технического прогресса, особенно в области новой техники [1]. Криоконсервация, вернее криосохранение – сложный многогранный процесс, который проводит экспериментатор с целью сохранить живыми клетки, ткани, органы в глубоком холоде в состоянии анабиоза [2, 3].

Приступая к изучению методов криоконсервации плодовых культур мы взяли за основу метод криоконсервации черенков яблони, разработанный Форслином [4] с тем, чтобы унифицировать и применить его на других семечковых и косточковых плодовых культурах и сортах и это принципиально важно, потому, что разные сорта по своему реагируют на пониженные температуры.

В работе с вегетативными почками, отделенными от побегов, мы перед закладкой на хранение применяли различные криопротекторы, смысл которых состоял в том, что криопротекторы при охлаждении закладываемого на хранение материала уменьшают размеры кристаллов льда в клетках и снижают токсические и другие вредные эффекты при их обезвоживании [5–7].

Влияние воды на процессы, происходящие в растительных тканях, рассмотрено в ряде работ [8–12]. В работах [13–15] рассмотрены проблемы адаптации культурных растений к условиям отрицательных температур.

Материалы и методы

В данной работе преследовалась цель применения существующих методов криоконсервации и дальнейшее усовершенствование их для консервации черенков и почек плодовых культур, имеющихся в наших коллекциях.

После длительного хранения в парах азота был проведен анализ эффективности методов криоконсервации путем определения жизнеспособности черенков и почек с помощью их прививок и окулировок в коллекционных садах на взрослые деревья. Для этого в начале декабря были нарезаны в садах вегетативные побеги годичного прироста различных сортов таких культур как груша, яблоня, вишня, черешня, слива. Нарезку проводили в состоянии покоя деревьев при температуре -6 – -8°C в течение 10–12 дней. Черенки для консервации нарезали длиной 6–8 см не более, имеющие 2–3 почки и перед замораживанием их подсушивали в низкотемпературном инкубаторе при -4 – -5°C , доводя исходную влажность (48–56%) до необходимой -28 – -35% .

Затем черенки постепенно охлаждали до температуры $-(48-50)^{\circ}\text{C}$ в замораживателе SanyoMedikalFreezer, модель MDF – U 442(T), двухступенчатым методом с начальным интервалом $1-2^{\circ}\text{C}$ в полчаса до температуры $-(30-32)^{\circ}\text{C}$. Во второй ступени охлаждения скорость замораживания увеличивали до $-(3-4)^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ и доводили до температуры $-(48-50)^{\circ}\text{C}$, после чего черенки помещали в большие криотанки на хранение в парах азота при $-(183-185)^{\circ}\text{C}$.

Размораживание черенков проводили также постепенно: сначала в морозильнике SanyoMedikalFreezer до температуры $-1-0^{\circ}\text{C}$, с последующим оттаиванием в холодной воде при $18-20^{\circ}\text{C}$. После проведения прививки черенков и окулировки почек на взрослых деревьях в саду, определяли их жизнеспособность в процентном отношении от количества выживших и всего проведенных прививок.

Изучая влияние криопротекторов на жизнеспособность почек после хранения в парах азота мы применяли такие проникающие в клетки растений протекторы, как 25-ти и 40-процентный раствор сахарозы и 25-ти и 40-процентный раствор глицерина.

Отделенные от черенка почки помещали в криобирки, заливали криопротекторами и выдерживали в них один час при 20°C . Затем проводили постепенное замораживание почек до $-(48-50)^{\circ}\text{C}$ в замораживателе фирмы SanyoMedikalFreezer интервалом -5°C в течение 1,5–2ч и помещали их на длительное хранение в пары азота. Через четыре недели почки вынимали из криотанка, размораживали при $18-20^{\circ}\text{C}$, промывали в дистиллированной воде и определяли их жизнеспособность, проращивая в чашках Петри на стерильной питательной среде. Из питательных сред использовали среды Мурасиге-Скуга (MS) с добавлением ростовых гормонов (БАП, ИУК, НУК) и витаминов.

Результаты и обсуждение

После длительного хранения в парах азота (6 месяцев и более) была проведена работа по определению жизнеспособности сохраняемых черенков и почек путем их прививки и окулировки на взрослых деревьях в коллекционных садах опытных станций ВИРа.

Анализ и оценка посткриогенного хранения черенков сортов груши привитых в коллекционном саду Майкопской опытной станции ВИР выявила, что их жизнеспособность после прививки находилась на уровне от $60\pm 9,1$ до $90\pm 5,6\%$. У окулированных почек жизнеспособность тоже была на хорошем уровне и составляла от $65\pm 8,9$ до $85\pm 6,6\%$. Из изучаемого набора сортов повышенными значениями жизнеспособности выделились такие сорта как Ак-сулу (к-2510), Эмиль Грейс(к-2721), Ласточка(к-1442), Сувенир де Ривз (к-3162).

По жизнеспособности сливы были получены различные результаты от $30\pm 7,1$ до $80\pm 5,8\%$ в зависимости от агроэкологической зоны выращивания и погодных условий на момент проведения прививки. Если проведение прививок совпадало с благоприятной погодой (сумрачные, облачные дни с осадками) приживаемость черенков была на высоком уровне, в сухие и ясные дни показатели жизнеспособности снижались. По сливе более высокая приживаемость черенков наблюдалась в средней полосе России(в Мичуринске).

Данные жизнеспособности сохраняемых в парах азота и привитых черенков вишни и черешни в коллекционном саду Крымской опытной станции, приведена в таблице 1.

Таблица 1

Жизнеспособность черенков вишни и черешни после криоконсервации и прививки в саду на Крымской ОСС, 2012–2013 гг

№ п/п	Сорт, № каталога	Количество прививок, шт		Жизнеспособность, %
		всего	прижившихся	
Вишня				
1	Встреча(к-38449)	30	25	$83\pm 7,0$
2	Чудо-вишня(к-42141)	30	26	$87\pm 6,2$
Черешня				
1	Исполинская Бадана	30	18	$60\pm 9,1$
2	Мелитопольская черная (к-18181)	30	21	$70\pm 8,5$

Обработка криопротекторами почек вишни показала, что более эффективно на изучаемые сорта действует протектор на основе 40-процентной сахарозы. Обработанные им вишневые почки сорта Встреча, после хранения в парах азота выявили 60,0% жизнеспособности, почки сорта Чудо-вишня – 63,2%.

Применение глицерина как протектора почек также являлось в целом положительно, но жизнеспособность почек оказалась ниже и составляла у сорта Встреча 55,6–57,1% у Чудо-вишни 60,0–60,9%. Результаты исследований по хранению обработанных почек вишни и анализ жизнеспособности их отдельно по сортам приведены в таблице 2.

Таблица 2

**Влияние криопротекторов на жизнеспособность почек вишни после хранения
в парах жидкого азота при – 183–185°С**

	Сорт	№ каталога	Варианты применяемых криопротекторов	Жизнеспособность почек, %
Вишня (Крымская ОПС)				
1	Встреча	к - 38449	25% раствор сахарозы	54.2±10.4
			40% раствор сахарозы	60.0±13.1
			25% раствор глицерина	55.6±12.1
			40% раствор глицерина	57.1±9.5
2	Чудо-вишня	к-42141	25% раствор сахарозы	61.5±9.7
			40% раствор сахарозы	63.2±11.4
			25% раствор глицерина	60.0±13.1
			40% раствор глицерина	60.9±10.4

Заключение

Результаты исследований показали возможность криоконсервации геноплазмы растений на примере черенков и почек ряда плодовых культур, произрастающих в различных эколого-географических регионах России. Применяя методы криоконсервации необходимо учитывать характер и степень влияния факторов замораживания, а также исходное состояние биообъекта.

Метод криоконсервации почек с помощью криопротекторной обработки перспективный и эффективный, который необходимо развивать для оценки образцов коллекций современного генофонда.

Обработка различными криопротекторами на сохранность отделенных вегетативных почек показала, что более эффективно действует протектор с использованием 40-процентной сахарозы. Почки вишни у сорта Встреча показали жизнеспособность в размере 60,0%, у сорта Чудо-Вишня она увеличилась до 63,2%.

По черешне у сорта Исполинская Бадана жизнеспособность почек при обработке сахарозой составляла до 56,0%, у сорта Мелитопольская черная – 47,8%. Обработка почек глицерином выявила меньшее количество живых почек в процентном отношении у изучаемых сортов.

Литература

1. Шубин Н.А. Прикладная криобиология. Криотехника и организация криобанков // Методы культивирования клеток: сб. ст. СПб, 2008. С.50-261.
2. Попов А.С. Криоконсервация культивируемых клеток // Методы культивирования клеток: сб. ст. СПб., 2008. С. 236-250.

3. Forsline et al. Recovery and longevity of cryopreserved dormant apple buds. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1998. 123(3). pp. 365-370.
4. *Вержук В.Г., Павлов А.В. и др.* Криоконсервация побегов и почек черемухи (*PadusMill*) с применением различных криопротекторов и режимов замораживания. Киев, 2011. С. 233-237.
5. *Вержук В.Г., Павлов А.В., Тихонова О.А., Новикова Л.Ю.* Жизнеспособность геноплазмы черной смородины (*Ribesnigrum L.*) обработанной криопротекторами и без них после хранения в парах жидкого азота. Киев, 2012. С. 417-421.
6. *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. Киев, 2013. Т.13., С. 27-30.
7. *Мурашев С.В.* Осмотически связанная вода // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия: Процессы и аппараты пищевых производств. 2013. № 4(18).
8. *Мурашев С.В., Гончарова Э.А., Бобко А.Л.* Ферментативная активность в тканях растений в состоянии покоя и ее связь с продуктивностью и хранением запасяющих органов в охлажденном состоянии // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15. № 3(5). С. 1670-1673.
9. *Чиркова Т.В.* Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2002. 240 с.
10. *Титов А.В., Акимова Т.В., Уланова В.В. и др.* Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. М.: Наука, 2006. 144 с.
11. *Трунова Т.И.* Растение и низкотемпературный стресс. М.: Наука, 2007. 54 с.
12. *Кошкин Е.И.* Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур. М.: Дрофа, 2010. 638 с.