

УДК 634.1:563:631.523

Применение криопротекторов, как нуклеаторов льда при хранении плодовых культур в парах жидкого азота

Павлов А.В., Вержук В.Г. vverzhuk@mail.ru

*ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Росси,
Россия, Санкт-Петербург, Адмиралтейский район, Морская Б. улица, 44*

*Показано влияние обработки криопротекторами на жизнеспособность почек плодовых культур после длительного хранения в парах азота. Обработка почек вишни перед замораживанием в жидком азоте различными по составу криопротекторами позволяет получать из них живые растения после размораживания и проращивания на свету *in vitro*. В данном процессе учитывается положительная роль криопротекторов с помощью которых можно аккумулировать свободную воду из клетки в межклеточную среду и тем самым уменьшить губительное действие льда, образующегося в процессе замораживания и подготовке геноплазмы растений к длительному хранению в парах азота. Применение криопротекторов на почках вишни показывает, что более эффективно на изучаемые сорта действует протектор на основе 40%-й сахарозы. Обработанные им вишневые почки сорта Встреча после хранения в парах азота показали 60,0% жизнеспособности, почки Чудо-вишня – 63,2%. Метод криоконсервации почек с помощью криопротекторной обработки перспективный и эффективный, который необходимо развивать для оценки образцов коллекций современного генофонда. Такая обработка стабилизирует внутриклеточный обмен веществ, криопротекторы как осмотики перемещают свободную воду из клетки в межклеточное пространство и таким образом становятся нуклеаторами льда, предохраняя клетку от разрушения.*

Ключевые слова: плодовые культуры – вишня, почки, криохранение, криопротекторы, генофонд

Applikation cryoprotectans as a nuclaator ice storage fruit crops liquid nitrogen vapor

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

*N.I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry, RAAS, St. Petersburg, Russia
Russia, Saint-Petersburg, Admiralteysky district, B. Morskaya street, 44*

*The influence ultra low temperatures on viability buds fruit-trees after prolonged storage in steams of liquid nitrogen was studied. Processing cherry buds before deep freezing in liquid nitrogen with different composition cryoprotectants permit to receive viable plants after defreezing and germination on the light *in vitro*. This process takes into account the positive role of cryoprotectants with which you can accumulate free water from the cell into the extracellular environment and thereby reduce the destructive effect of ice formed during freezing and preparing genoplazmy plants to long-term storage in nitrogen vapor. Application cryoprotectants kidney cherry shows that more effectively on the studied varieties protector acts on the basis of 40% sucrose minutes. Treated them cherry varieties kidney Vstrecha after storage in nitrogen vapor showed 60.0% viability, kidney Chudo- cherry - 63.2%. Cryopreservation method for buds by using cryoprotective treatment is perspective and effective. This method should be developed for evaluation of the samples from current genofonds collections. Such treatment stabilizes intracellular metabolism, cryoprotectors transplace free water from cell to intracellular space and thus cryoprotectors become nuclaator ice and protect cells from damage.*

Key words : large fruit –cherry, buds, cryopreservation, cryoprotectors, genofond.

Отмечая классический метод хранения плодовых культур путем высадки их в садах, питомниках и ягодниках, следует указать на перспективный и недорогой способ сохранения – это криоконсервация при сверхнизкой температуре жидкого азота или его парах при $-183 - 185^{\circ}\text{C}$ [1-3]. Достижение низких и сверхнизких температур ценно для нас тем, что в этих условиях мы встречаемся с новыми явлениями и фактами, помогающими проникать в суть строения материи, позволяющими использовать новые методы исследования [4]. При консервации используют такие части растений, как побеги, почки, пыльцу, меристемы и семена диких видов [5].

Рассматривая комплекс защитных систем, влияющих на жизнеспособность растительных клеток после длительного хранения в холоде, следует указать на положительную связь между содержанием сульфгидрильных групп в клетке и морозоустойчивостью растений [6]. Сульфгидрильные группы удерживают воду и препятствуют сближению молекул белков, усиливая таким образом морозоустойчивость клеток растений. При этом необходимо отметить, что внеклеточное образование льда, это единственная возможность жизни растений в условиях отрицательных температур, которая нуждается в нуклеаторах льда любой природы. Существует комплекс химических связей, выполняющий функции нуклеаторов льда во внутриклеточной среде [7]. Состав внутриклеточной среды, в которой функционируют макромолекулы, может регулироваться за счет синтеза и аккумуляции низкомолекулярных органических протекторных (защитных) соединений. К протекторным соединениям относятся аминокислоты, прежде всего такие, как, пролин, сахароспирты, бетаины и некоторые другие молекулы. Пролин является в растительном мире самым универсальным осмолитом, может выступать в роли осмолита, в роли источника азота, углерода и энергетического субстрата. Он обладает также антиоксидантным действием, понижая количество активных форм кислорода [8]. Пролин реагирует также на экспрессию стрессорных генов. Очень важна роль пролина как протектора структуры и функции макромолекул при стрессе.[9]. Вопросам стимуляции роста растений посвящены исследования [10-15], прогнозирование состояния растительных организмов рассмотрено в [16-32], а практическое применение в работах [33-35]. Инновационные вопросы отражены в [18-22].

Материал и методы

На примере различных сортов вишни (*Cerasus Mill*) были проведены исследования по хранению почек, отделенных от черенков(побегов) и обработанных перед замораживанием криопротекторами различной концентрации. Воздействуя криопротекторами на растительную клетку и ее содержимое, нами преследовалась цель получения живых растений из консервируемых почек в условиях *in vitro*. Согласно данным других авторов известно, что криозащитные вещества не только уменьшают размеры кристаллов льда в растительных тканях и их количество, но и снижают токсические и другие вредные эффекты обезвоживания [36].

Консервацию почек проводили на таких сортах вишни как Встреча (к-38449) и Чудо-вишня (к-42141) из коллекции сада Крымской опытно-селекционной станции (г. Крымск). Нарезку черенков проводили в первой декаде декабря, когда устанавливалась отрицательная температура воздуха - $6^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$. Для работ с криопротекторами

вегетативные почки отделяли от побега со слоем древесины. По каждому сорту опыт проводили в трех повторностях и в каждой повторности по 20-30 почек.

Содержание воды в тканях перед замораживанием измеряли определителем уровня влажности MA-100 фирмы Sartorius. В ходе работы вегетативные почки отделенные с кусочком древесины заливали криопротекторами и выдерживали в них 1 час при 20°C. Затем проводили постепенное замораживание материала до -48-50°C в замораживателе «Sanyo Medikal Freezer MDF-U442(T)» двухступенчатым методом с начальным интервалом 1-2°C в полчаса до температуры -30°-32°C и выдерживали 15 минут. На второй ступени процесса охлаждения скорость замораживания увеличивали до - 4° - 5°C/час и достигали температуры - 48° - 50°C. Затем криопробирки помещали в криотанки (ХБ – 0,5 м³) на хранение в парах азота при - 183° - 185°C. Через несколько недель хранения почки размораживали. Размораживание почек с шагом 5°C в течение 1,5-2 часов проводили в медицинском морозильнике марки «Sanyo Medikal Freezer – модель MDF – U442(T)», пока температура не доходила до 0°C, а затем отмывали в проточной холодной воде при 18-20°C в течение 1-2 минут. Жизнеспособность почек определяли путем проращивания в стерильных условиях на питательной среде в световой комнате при температуре 21°± 1°C и режимом 16 часов день, 8 часов ночь. Питательная среда составляла: 5 мг/л бензиламинопурина, 0,2мг/л индолилуксусной кислоты, соли и витамины с органическими добавками по Мурасиге-Скугу.

Результаты и обсуждение.

Анализ результатов применения криопротекторов на почках вишни показал, что более эффективно на изучаемые сорта действует протектор на основе 40%-й сахарозы. Обработанные им вишневые почки сорта Встреча, после хранения в парах азота показали 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%. Применение криопротекторов более высокой концентрации (55% и 65% сахарозы и глицерина) существенно не повлияло на процент жизнеспособности почек вишни.

Результаты исследований по хранению обработанных почек вишни и анализ жизнеспособности их отдельно по сортам приведены в таблице 1.

Таблица 1. Влияние криопротекторов на жизнеспособность почек вишни после хранения в парах жидкого азота при – 183 -185°C.

	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.

В полученных данных по применению различных криопротекторов на почках вишни показано положительное влияние обработки протекторами на жизнеспособность почек плодовой культуры после длительного хранения в парах жидкого азота. Обработка почек вишни перед замораживанием в жидком азоте различными по составу криопротекторами позволяет получать них живые растения после размораживания и проращивания на свету *in vitro*. Метод криоконсервации почек с помощью криопротекторной обработки перспективный и эффективный, который необходимо развивать для оценки образцов коллекций современного генофонда.

Литература

1. Вержук В.Г., Павлов А.В., и др. Криоконсервация побегов и почек черемухи (*Radus Mill*) с применением различных криопротекторов и режимов замораживания. – Киев., 2011, С. 233-237.
2. Вержук В.Г., Павлов А.В., Тихонова О.А, Новикова Л.Ю. Жизнеспособность геноплазмы черной смородины (*Ribes nigrum L.*) обработанной криопротекторами и без них после хранения в парах жидкого азота. – Киев., 2012. С. 417-421.
3. 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.
4. Шубин Н.А. Прикладная криобиология. Криотехника и организация криобанков. Методы культивирования клеточек. СПб., 2008. С. 250-261.
5. Forsline P et al. Recovery and longevity of cryopreserved dormant apple buds // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1998. V. 123. № 3. P. 365 – 370.
6. Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур. М.: Дрофа, 2010. 638 с.
7. Бобко А. Л., Мурашев С.В., Вержук В.Г. Влияние антиоксидантов в древесной ткани плодовых растений в зимне-весенний период на холодильное хранение собранного урожая. Сборник научных работ// Низкотемпературные и пищевые технологии в XXI веке. Санкт-Петербург, 2013. С. 381-383.

8. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А., Физиология растений. М.: Высшая школа, 2005. 736 с.
9. Мурашев С.В., Вержук В.Г. Современная технология получения плодово-ягодной продукции с усиленными постоянно действующими защитными механизмами. // Плодоводство и ягодоводство России. – М.: 2009, Т. XXII, Ч. 2. – С. 153-158.
10. Мурашев С.В., Коломичева Е.А., Вержук В.Г., Бурмистров Л.А. Стимулирующее действие глицина на формирование плодов хеномелеса и сокращение потерь при хранении. // Вестник РАСХН – январь, №1, 2011. – С. 79-80.
11. Мурашев С.В. Сопоставление эффективности и безопасности защитных механизмов, индуцируемых в растительных организмах // Процессы и аппараты пищевых производств. 2013 № 2.
12. Мурашев С.В., Вержук В.Г., Бурмистров Л.А. Способ подготовки плодов семечковых культур к холодильному хранению. Патент РФ № 2283576 Заявл. 24.06.2004. Оpubл. 20.09.2006. Бюл. № 26.
13. Мурашев С.В., Вержук В.Г., Коломичева Е.А. Способ обработки плодово-ягодных культур (варианты). Патент РФ № 2485764. Заявл. 12.01.12. Оpubл. 27.06.2013. Бюл. 18.
14. Мурашев С.В., Вержук В.Г., Белова А.Ю. Стимуляция роста и повышение эффективности холодильного хранения ягод жимолости и облепихи после обработки растений аминокислотным препаратом БКА. // Сельскохозяйственная биология. – 2010, № 1. – С. 90-95.
15. Коломичева Е.А., Мурашев С.В. Действие аминокислотной обработки на состояние покоя растений, формировании плодов и их холодильное хранение // Процессы и аппараты пищевых производств. 2013 № 1.
16. Мурашев С.В., Вержук В.Г., Белова А.Ю. Способ диагностики плодов для прогнозирования сроков их хранения (варианты). Патент РФ № 2338187. Заявл. 15.12.2006. Оpubл: 10.11.08. Бюл. № 31.
17. Вержук В.Г., Мурашев С.В., Белова А.Ю. Способ определения степени лежкости плодов (варианты). Патент РФ № 2352102. Заявл. 15.12.2006. Оpubл: 20.04.09. Бюл. № 11.
18. Мурашев С.В., Вержук В.Г., Белова А.Ю. Способ определения влияния технологических характеристик плодов на сроки их хранения. Патент РФ № 2352101. Заявл. 15.12.2006. Оpubл: 20.04.09. Бюл. № 11.
19. Вержук В.Г., Мурашев С.В., Белова А.Ю. Способ прогнозирования сроков хранения плодов. Патент РФ № 2352100. Заявл. 15.12.2006. Оpubл. 20.04.09. Бюл. №11.
20. Бобко А.Л., Мурашев С.В., Вержук В.Г. Способ предварительного прогнозирования лежкости плодов и ягод при хранении. Патент РФ, № 2485759. Заявл. 17.01.2012. Оpubл. 27.06.2013. Бюл. № 18.
21. Мурашев С.В., Вержук В.Г., Бобко А.Л. Способ прогнозирования хранения плодово-ягодной продукции (варианты). Патент РФ, № 2485754. Заявл. 17.01.2012. Оpubл. 27.06.2013. Бюл. 18.
22. Вержук В.Г., Мурашев С.В., Бобко А.Л. Способ диагностики растительных тканей для раннего прогнозирования хранения плодов и ягод. Патент РФ № 2484617. Заявл. 17.01.2012. Оpubл. 20.06.2013. Бюл. № 17.

23. Мурашев С.В., Коломичева Е.А., Вержук В.Г. Учет нелинейного характера естественной убыли массы растительной продукции при хранении // Хранение и переработка сельхозсырья, 2012, № 7. – С. 31-33.

24. Бобко А.Л., Мурашев С.В., Вержук В.Г. Влияние антиоксидантов в древесной ткани плодовых растений в зимнее-весенний период на холодильное хранение собранного урожая // Процессы и аппараты пищевых производств. 2013 № 1

25. Бобко А.Л., Мурашев С.В. Адаптация к гипотермии плодово-ягодных растений и прогнозирование способности полученного урожая к холодильному хранению // Процессы и аппараты пищевых производств. 2013 № 2.

26. Мурашев С.В., Гончарова Э.А., Бобко А.Л. Ферментативная активность в тканях растений в состоянии покоя и её связь с продуктивностью и хранением запасующих органов в охлажденном состоянии // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – Т. 15, № 3(5), 2013. – С. 1670-1673.

27. Мурашев С.В., Вержук В.Г., Белова А.Ю. Раннее прогнозирование потерь плодовой продукции при холодильном хранении // Процессы и аппараты пищевых производств. 2011. № 1. С. 167-172.

28. Белова А.Ю., Мурашев С.В., Вержук В.Г. Влияние пигментов в листьях растений на формирование и свойства плодов. // Процессы и аппараты пищевых производств. март, 2012.

29. Вержук В.Г., Мурашев С.В., Белова А.Ю. Определение упругости ткани плодов яблони, груши, хеномелеса для прогнозирования потерь при холодильном хранении. // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. № 4, 2012. – С. 10-12.

30. Verzhuk V.G, Murashev S.V., Belova A.Yu. Determination of tissue elasticity of apple, pear, and quince fruits for predicting losses during cold storage. // Russian agricultural sciences. 2012, vol. 38, № 4, pp. 272-274.

31. Калацевич Н.Н., Мурашев С.В. Влияние состояния воды на физико-химические свойства растительной продукции и её потери массы при холодильном хранении // Процессы и аппараты пищевых производств. 2013 № 1.

32. Мурашев С.В. Осмотически связанная вода // Процессы и аппараты пищевых производств. 2013 № 2.

33. Мурашев С.В., Болейко Л.А., Вержук В.Г., Жестков А.Н. Определение свойств и практическое применение антоцианового пигмента из ягод клюквы (*Oxycoccus Hill.*) // Кондитерское производство – 2011, № 2. – С. 8 – 11.

34. Мурашев С.В., Болейко Л.А., Вержук В.Г., Жестков А.Н. Исследование свойств и практическое применение антоцианового пигмента, полученного из ягод клюквы методом лиофильной сушки. Процессы и аппараты пищевых производств. – 2011. № 2. С. 271-281.

35. Мурашев С.В., Болейко Л.А., Вержук В.Г., Жестков А.С. Исследование свойств и практическое применение антоцианового пигмента, полученного из ягод аронии черноплодной методом лиофильной сушки. – Процессы и аппараты пищевых производств. 2012. № 2. С. 167-174.

36. Попов А.С. Криоконсервация культивируемых клеток. Методы культивирования клеток. СПб., 2008. С.236-250.