

УДК 634.1:581.1.036

## **Жизнеспособность побегов яблони, груши и обработанных криопротекторами почек черемухи после хранения в жидком азоте**

**Вержук В.Г.<sup>1</sup>, Павлов А.В.<sup>1</sup>, Орлова С.Ю.<sup>1</sup>, Дорохов Д.С.<sup>2</sup>, Котов В.М.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>vverzhuk@mail.ru

<sup>1</sup> *Всероссийский научно - исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург*

<sup>2</sup> *Всероссийский научно - исследовательский институт генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина, 393770, Тамбовская область*

<sup>3</sup> *Майкопская опытная станция Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им.Н.И.Вавилова,385746 , Республика Адыгея*

*Показано влияние сверхнизких температур на жизнеспособность черенков и почек плодовых культур после длительного хранения в парах азота. Обработка почек черемухи перед замораживанием в жидком азоте различными по составу криопротекторами позволяет получать из них живые растения после размораживания и проращивания на свету in vitro. При оценке жизнеспособности черенков и почек яблони и груши, сохраняемых в парах азота, получены положительные результаты после прививки черенков в саду на взрослые деревья. Из применяемых криопротекторов повышенная жизнеспособность почек черемухи оказалась после обработки их 40%-й сахарозой. Выращенные из почек растения на стерильной культурной среде MS позволяют получить в дальнейшем чистый растительный материал, свободный от различных болезней и вирусов.*

**Ключевые слова:** плодовые культуры – яблоня, груша, черемуха, вегетативные побеги, почки, криохрани- нение, криопротекторы, генофонд.

---

## **Estimation viability of shoots apple-tree, pear-tree and processing cryoprotectors bird-cherry buds after storage in liquid nitrogen**

**Verzhuk V.G.<sup>1</sup>, Pavlov A.V.<sup>1</sup>, Orlova S.Y.<sup>1</sup>, Dorokhov D.S.<sup>2</sup>, Kotov V.M.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *N.I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry, RAAS, St. Petersburg, Russia,*

<sup>2</sup> *I.V. Michurin All-Russian Research Institute of Genetic and Breeding Fruit Plants, RAAS, Tambov region, Russia*

<sup>3</sup> *Maikop Experiment Station of N.I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry, Maikop, Russia*

*The influence ultra low temperatures on viability grafts and buds fruit-trees after prolonged storage in steams of liquid nitrogen was studied. Processing bird-cherry buds before deep freezing in liquid nitrogen with different composition cryoprotectors permit to receive about 69 % viable plants after defreezing and germination on the light in vitro. In assessing the viability of kidney grafts and apples and pears stored in nitrogen vapor, positive results after grafting cuttings in the garden of mature trees. Of cryoprotectants used, increased the viability of bird cherry kidney was after treatment with 40% sucrose minutes. Grown plants from buds on a sterile culture medium MS allow to obtain further clean plant material, free from various diseases and viruses.*

**Key words:** large fruit – apple tree, pear tree, bird cherry, vegetative shoots, buds, cryopreservation, cryoprotectors, genofond.

---

Учитывая биологическую особенность плодовых растений, что большинство из них перекрестноопыляемые и при семенном размножении теряют признаки материнского растения и приобретают отцовские, то для сохранения сортов, ценных при генетических исследованиях, генофонд плодовых и ягодных культур необходимо хранить в живом виде. Классический метод сохранения генофонда состоит в поддержании дуплетных коллекционных насаждений, но это экономически дорого, из-за большой стоимости посадочного материала и работы по уходу за взрослыми растениями. Кроме того, нет гарантии сохранности уникальных генотипов вследствие действия неблагоприятных экологических, климатических, техногенных и антропогенных факторов [1]. Решение проблемы состоит в организации длительного хранения исчезающих видов и образцов в контролируемых условиях низких и сверхнизких температур, а также создания в культуре *in vitro* оздоровленных генетических коллекций растений [2, 3]. Перспективным современным способом хранения плодовых и ягодных культур является криоконсервация частей растений (побегов, почек, меристем, пыльцы и семян диких видов) в жидком азоте или его парах [4–10]. Вопросам стимуляции роста растений посвящены исследования [11-17], прогнозирование состояния растительных организмов рассмотрено в [18-34], а практическое применение в работах [35-37].

### **Материал и методы.**

Материалом исследования взяты образцы сортов яблони (*Malus Mill.*) и груши (*Pyrus L.*), нарезанные в саду ГНУ ВНИИГ и СПР им. И.В. Мичурина (г. Мичуринск ) и Майкопской опытной станции ВИР; побеги черемухи (*Radus Mill.*) нарезали в Павловской опытной станции ВИР. Замораживание черенков, обработку почек криопротекторами и хранение в парах жидкого азота проводили в криобанке ВИРа им. Н.И. Вавилова. Черенки для криоконсервации нарезали длиной 25-30 см в период покоя деревьев, при температуре воздуха -6 - 8°C. Перед закладкой на хранение черенки делили на сегменты длиной 6 – 8 см с 2 -3 почками и подсушивали при - 5°C в низкотемпературном инкубаторе, уменьшая исходную влажность побегов до оптимальной влажности 28 – 35%. Затем черенки замораживали методом программного замораживания со скоростью 0,5°C/мин до -30°C, с последующим увеличением скорости до 1°C/мин и -90°C после чего погружали на длительное хранение в пары азота ( - 183 -185°C ). Весной для оценки жизнеспособности черенки размораживали и прививали на ветви взрослых деревьев в садах. Через 1,5 – 2 месяцев после прививки ( обычно май – июнь месяцы ) оценивали процент прижившихся черенков, рост и развитие в летний период. Почki черемухи вместо подсушивания обрабатывали криопротекторами, предохраняющими ткани от разрушения, а затем замораживали и помещали в жидкий азот. Применяли такие проникающие в растительные клетки протекторы как - 25% и 40%-й глицерин и 25% и 40%-ю сахарозу. Почki помещали в криопробирки, выдерживали в криопротекторах 1 час при 20°C, затем замо-

раживали до 48-50°C в замораживателе фирмы «Sanyo Medikal Freezer – модель MDF-U442(T)» и погружали в пары азота на хранение. После 2-х месяцев хранения почки размораживали при +18°C... +20°C, отмывали от криопротекторов и определяли их жизнеспособность, проращивая на питательной среде MS, с добавлением ростовых гормонов (БАП, 1 мг/л).

### Результаты и обсуждение

Оценка жизнеспособности побегов яблони и груши после хранения в парах жидкого азота и привитых на взрослых деревьях дана в таблицах 1 и 2. Результаты данных табл.1 показали, что приживаемость привитых черенков яблони находилась в пределах от 40,0 ± 12,6% до 83,0 ± 8,9%. Более высокая жизнеспособность привитых черенков была у сортов Успенское ( 83,0 ± 8,9% ) и Болотовское (82,0 ± 8,8% ), низкий процент жизнеспособности черенков наблюдался у формы 32 – 26, закладки в 2008-2009гг.

Таблица 1.

**Жизнеспособность побегов яблони (*Malus Mill.*) после хранения в парах азота (- 183 - 185°C ) и привитых весной в саду. г. Мичуринск, 2011г.**

Сорт , форма	Количество черенков привитых в саду, шт.	Количество прижившихся черенков, шт.	Жизнеспособность, %
Антоновка обыкновенная	6	3	50 ± 20,4
Болотовское	19	16	82,0 ± 8,8
Пуйкис	10	5	50,0 ± 15,8
Успенское	18	15	83,0 ± 8,9
11-6-2(2009-2010г)	7	5	71,0 ± 17,2
32-26 (2009-2010г)	14	9	64,0 ± 12,8
32-26 (2008-2009г)	15	6	40,0 ± 12,6

Таблица 2.

**Жизнеспособность побегов груши (*Pyrus L.*) после хранения в парах азота (-183 - 185°C ) и привитых весной в саду. Майкопская оп.станция ВИР, 2011г.**

Сорт	Количество черенков привитых в саду, шт.	Количество прижившихся черенков, шт.	Жизнеспособность, %
Рассвет	30	26	86,7±6,2
Глива Курская	30	26	86,7±6,2
Ал Янаг	30	23	76,6±7,7
Китайская 16	30	22	73,3±8,1
Кок Сулу	30	25	83,3±6,8
Енисейка	30	23	76,6±7,7
Нарядная Млеевская	30	20	66,6±8,6

Данные жизнеспособности побегов груши ( табл. 2 ), привитых в саду МОС ВИР, также показали различную приживаемость по сортам - от  $66,6 \pm 8,6\%$  до  $86,7 \pm 6,2\%$ . Высокая жизнеспособность привитых черенков наблюдалась у сортов Рассвет и Глива Курская –  $86,7 \pm 6,2\%$ . Наименьшая приживаемость черенков была у сорта Нарядная Млеевская, хотя сам процент жизнеспособности довольно высокий –  $66,6 \pm 8,6\%$ . Возможно такие различия указывают на специфику сортов, отличающихся внутренней структурой и сроками созревания побегов, что в итоге отражается на подготовке к перезимовке годовичных приростов.

Результаты по замораживанию почек черемухи обыкновенной (*Padus Mill.*), предварительно обработанных различными криопротекторами, представлены в таблицах 3 и 4. Данные табл. 3 показывают, что при обработке почек сорта Августина 25% раствором сахарозы, после хранения в азоте и проращивания их на питательной среде, жизнеспособность составляла  $72,0 \pm 6,1\%$ . При увеличении концентрации криопротектора и обработке опытного материала 40%-м раствором сахарозы, жизнеспособными после хранения оказались  $80,0 \pm 6,4\%$  почек. После пересадки в стаканчики со средой они хорошо развивались, формируя зеленые побеги.

Таблица 3

**Влияние криопротекторов на жизнеспособность почек черемухи сорта Августина после хранения в парах жидкого азота ( - 183 - 185°C )**

Варианты применяемых криопротекторов	Количество почек черемухи, обработанных криопротекторами( всего и жизне-способных после хранения в парах жидкого азота ( -183 - 185°C ).		Жизнеспособность почек ( % )
	Всего	жизнеспособных	
25% раствор сахарозы	25	18	$72,0 \pm 6,1$
40% раствор сахарозы	25	20	$80,0 \pm 6,4$
25% раствор глицерина	29	20	$68,9 \pm 13,7$
40% раствор глицерина	26	19	$73,1 \pm 7,8$

При сохранении почек черемухи сорта Ранняя круглая (табл.4), обработанных криопротекторами различной концентрации, следует отметить их различную жизнеспособность. После обработки почек 25% раствором сахарозы, жизнеспособных оказалось  $40,0 \pm 12,9\%$ . С увеличением концентрации сахарозы до 40%, количество жизнеспособных почек увеличилось до  $80,6 \pm 7,1\%$ , как и у сорта Августина с аналогичной концентрацией. Обработка раствором глицерина выявила меньшее число живых почек на 25%-ой концентрации раствора ( $54,83\%$ ) по сравнению с 40% концентрацией ( $69,6 \pm 10,4\%$  ).

Таблица 4

**Влияние криопротекторов на жизнеспособность почек черемухи сорта Ранняя круглая после хранения в парах жидкого азота( - 183 - 185°С)**

Варианты применяемых криопротекторов	Количество почек, обработанных криопротекторами ( всего и жизнеспособных после хранения в парах жидкого азота (- 183 - 185° С )		Жизнеспособность почек, %
	всего	жизнеспособных	
25% раствор сахарозы	30	12	40,0±12,9
40% раствор сахарозы	31	25	80,6±7,1
25% раствор глицерина	31	17	54,8±12,7
40% раствор глицерина	33	23	69,6±10,4

### Заключение

При оценке жизнеспособности черенков и почек яблони и груши, сохраняемых в парах азота, получены положительные результаты после прививки черенков в саду на взрослые деревья. Обработка почек черемухи перед замораживанием в жидком азоте различными по составу криопротекторами позволяет получать из них живые растения после размораживания и проращивания на свету *in vitro*. Из применяемых криопротекторов, повышенная жизнеспособность почек черемухи оказалась после обработки их 40%-й сахарозой. Выращенные из почек растения на стерильной культуральной среде MS позволяют получить в дальнейшем чистый растительный материал, свободный от различных болезней и вирусов.

### Список литературы

1. Грищенко В.И., Копейка Е.Ф., Петрушко М.П. Проблемы криобиологии и сохранение генетических ресурсов // Материалы международной конференции «Сохранение генетических ресурсов». СПб, 19-22 октября 2004г. Цитология, Т 46, №9. С. 784-785.
2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология растений.- М., 1964.-18 с.
3. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений.- Киев, 1980.- 142с.
4. Forslin P.I, Towill L.E., Waddel J.W. Recovery and longevity of cryopreserved dormant apple buds // J. Amer Sos. Hort. Sci.- 1998.-Vol. 123, №3.-P.365-370.
5. Kozaki I., Omura M., at al. Germplasm Preservation of Fruit Trees //Preservation of Plant Genetic Resources. Japan International Cooperation Agency.- 1988.- P. 65—74.
6. Соловьева М.А. Формирование признаков морозостойкости плодовых растений и методы оценки селекционного материала на устойчивость к низким и переменным

температурам// Сб. Науч. тр. « Селекция плодовых и ягодных культур» Новосибирск, 1998.- С.15-25.

7. *Вержук В.Г., Мурашев С.В., Тихонова Н.Г., Жестков А.С., Бобко А.Л., Дорохов Д.С.* Влияние эндогенных веществ моно- и дисахаридов на жизнеспособность плодовых растений после хранения в парах жидкого азота. // Плодоводство и ягодоводство России. – М.: 2011, т. XXVI. – С. 17-23.

8. *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. Санкт-Петербург.2009, Т.166, С. 353-357.

9. *Лозина – Лозинский Л.К.* Адаптация и устойчивость организмов и клеток к низким и сверхнизким температурам // Очерки по криобиологии. Наука, Ленинградское отделение, Л. 1972. С. 191-204.

10. *Высоцкий В.А.* Биотехнологические приемы в современном садоводстве. Плодоводство и ягодоводство России. 2011. М. Т. XXV1.

11. *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.

12. *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.

13. *Мурашев С.В.* Сопоставление эффективности и безопасности защитных механизмов, индуцируемых в растительных организмах // Процессы и аппараты пищевых производств. 2013 № 2.

14. *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.

15. *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.

16. *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.

17. *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.

18. *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.

19 *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.

20. *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.

21. *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.

22. *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.

23. *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.

24. *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.

25. *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.

26. *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 // *Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств»*. 2013. № 1

27. *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.

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

29. *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.

30. Белова А.Ю., Мурашев С.В., Вержук В.Г. Влияние пигментов в листьях растений на формирование и свойства плодов. // Процессы и аппараты пищевых производств. 2012. №1.

31. 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.

32. 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.

33. Калацевич Н.Н., Мурашев С.В. Влияние состояния воды на физико-химические свойства растительной продукции и её потери массы при холодильном хранении // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств». 2013 № 1.

34. Мурашев С.В. Осмотически связанная вода // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств». 2013 № 2.

35. 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.

36. 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.

37. 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.