

## Влияние хранения пыльцы яблони и вишни при низких и сверхнизких температурах на ее жизнеспособность

Г.Ф. САФИНА, Н.Г. ТИХОНОВА, В.Г. ВЕРЖУК, Н.А. ШУБИН

Государственный научный центр "Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова", г. Санкт-Петербург

## Storage Influence of Apple and Cherry Pollen at Low and Ultralow Temperatures on Its Viability

G.F. SAFINA, N.G. TIKHONOVA, V.G. VERZHUK, N.A. SHUBIN

State Scientific Center "N.I. Vavilov Research Institute of Plant Industry", St. Petersburg

Исследовано влияние низких и сверхнизких температур хранения на жизнеспособность пыльцы ряда сортов яблонь и кислой вишни. После 5 мес хранения пыльцы при температуре около 0°C жизнеспособность её заметно снизилась. У пыльцы яблонь, хранившейся при -20°C, в некоторой степени также снизилась жизнеспособность, и, наоборот, увеличилась у пыльцы кислой вишни, хотя вначале она была ниже. После 5 мес хранения при -196°C жизнеспособность пыльцы изученных сортов яблонь и кислой вишни фактически не отличалась от исходной. Исключение составил сорт вишни Элита рубиновая, околонулевая всхожесть которого увеличилась после пятимесячного хранения при всех исследованных температурных режимах. Криосохранение пыльцы плодовых культур является наиболее предпочтительным из всех изученных методов хранения.

**Ключевые слова:** пыльца, низкие температуры, криосохранение, жизнеспособность, всхожесть.

Досліджено вплив низьких та наднизьких температур зберігання на життєздатність пилку ряду сортів яблуні та кислої вишні. Після 5 міс зберігання пилку за температури, близької до 0°C, життєздатність його значно зменшувалася. У пилка яблунь, який зберігався за температури -20°C, життєздатність, у деякій мірі, також зменшувалася, і, навпаки, збільшувалася для пилка кислої вишні, хоч початково вона була нижчою. Після 5 міс зберігання за -196°C життєздатність пилка вивчених сортів яблунь і кислої вишні не відрізнялася від початкової. Виключенням був сорт вишні Еліта рубінова, майже нульова схожість якого підвищувалася після 5-місячного зберігання за всіх досліджених температурних режимах. Кріозбереження пилку плодів культур найбільше переважає над усіма нами вивченими методами збереження.

**Ключові слова:** пилко, низькі температури, кріозбереження, життєздатність, схожість.

The influence of low and ultralow storage temperature on pollen viability of various apple and sour cherry cultivars has been studied. In five months of pollen storage at temperatures about 0 °C its viability noticeably decreased. In apple pollen stored at -20°C viability was also reduced in some extent, and vice versa it increased for sour cherry pollen though initially was low. After five months' storage at -196°C pollen viability for studied apple and sour cherry cultivars in fact did not differ from the initial one. The sour cherry cultivars Elita Rubinovaya was the only exception, as its nearly zero germinating ability has apparently increased after five-month storage at all investigated temperature regimens. Fruit crop pollen cryopreservation is regarded as the most favourable one of all studied storage modes.

**Key-words:** pollen, low temperatures, cryopreservation, viability, germinating power.

Хранение пыльцы плодовых позволяет сохранять коллекцию наиболее продуктивных и ценных по хозяйственным качествам сортов и осуществлять планируемые скрещивания независимо от наличия свежесобранной пыльцы.

Основным критерием сохранности пыльцы в условиях низкотемпературного и криогенного хранения является ее жизнеспособность.

В естественных условиях у разных видов жизнеспособность пыльцы различна: от нескольких часов (у злаков) до нескольких месяцев (у плодовых, табака) и даже лет (у пальм) [1, 2, 11, 12]. На жизнеспособность заметно влияют погодные условия, при которых происходит формирование и созревание пыльцевых зерен [3, 4].

*Адрес для корреспонденции:* Сафина Г.Ф., Государственный научный центр "Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова", ул. Б. Морская, 42, г. Санкт-Петербург, 190000, Россия; тел.: +7 (812) 314-77-14, факс: +7 (812) 117-87-62, e-mail: g.filipenko@vir.nw.ru

Storage of horticultural pollen enables to preserve the collection of more productive and valuable on their agricultural quality sorts and to plan crossing independently on the presence of freshly collected pollen.

Its viability is a main criterion of pollen integrity in condition of low temperature and cryogenic storage.

In natural condition viability of different pollen species varies from some hours (in cereals) to some months (in fruits, tobacco) and even years (in palm-tree) [1, 2, 11, 12]. Weather has noticeably influenced its viability when forming and ripening of pollen-grains occur [3, 4]. Low humidity and air temperature on the opinions of some researchers are the best conditions to preserve pollen viability [3, 5, 8]. Dry pollen may

*Address for correspondence:* Safina G.F., N.I. Vavilov Research Institute of Plant Industry, 42, B. Morskaya Str., St. Petersburg, Russia 190000; tel.: +7 812 314 7714, fax: +7 812 117 8762, e-mail: g.filipenko@vir.nw.ru

По мнению ряда исследователей, лучшими условиями сохранения жизнеспособности пыльцы являются низкие влажность и температура воздуха [3, 5, 8].

В сухом состоянии пыльца может переносить очень низкие температуры ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), не теряя своей жизнеспособности и фертильности [1, 5, 8, 11-14].

Цель работы – изучение влияния различных температурных режимов хранения пыльцы яблони и вишни на ее жизнеспособность.

### Материалы и методы

Для исследований брали пыльцу различных по срокам созревания сортов вишни и яблони из коллекционного сада Павловской опытной станции ВИР. Сбор и подсушивание пыльцы осуществляли согласно методическим указаниям [6]. Часть подсушенной пыльцы использовали для определения исходной жизнеспособности, а остальную пыльцу помещали в контейнеры – пробирки фирмы “Nunc” и закладывали на хранение при температурах:  $0\pm 2$ ,  $-20$  и  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Пыльцу замораживали до сверхнизких температур прямым погружением пробирок в жидкий азот. Исследования [8, 15] свидетельствуют о том, что режим быстрого замораживания пыльцы является наиболее благоприятным. Размораживали пыльцу в водяной бане при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение одной минуты.

Жизнеспособность определяли общепринятым методом проращивания в искусственной среде, содержащей 15%-й раствор сахарозы на 0,5%-м растворе агар-агара. Одновременно контролировали процент нормально выполненных пыльцевых зерен методом окрашивания 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.

### Результаты и обсуждение

Результаты определения жизнеспособности пыльцы вишни приведены в табл. 1. Пыльца вишни исследуемых сортов имеет невысокий процент прорастания на искусственной среде и значительно варьирует в зависимости от сорта. Эти результаты согласуются с литературными данными о низком уровне жизнеспособности пыльцы этой культуры [4, 9, 10].

Дополнительную информацию о качестве пыльцы дают данные по окрашиванию ее ацетокармином (табл. 1). Процент окрашенной пыльцы тоже невысок и различен у разных сортов, однако он выше по сравнению с процентом проросшей

endure very low temperatures ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) preserving viability and fertility [1, 5, 8, 11-14].

Research aim is to study the influence of different storage temperature regimens of apple and cherry pollens on its viability.

### Materials and methods

In our research there was used the pollen of sorts of different gestation term for cherry and apple trees from the Pavlovskaya experimental station garden collection of N.I. Vavilov Research Institute of Plant Industry. Collection and drying of pollen were performed according to methodical instructions [6]. A part of dried pollen was used for examining initial viability, the rest of pollen was placed into containers with test-tubes (“Nunc”) and left for storage at  $0\pm 2$ ,  $-20$  and  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Pollen was frozen down to ultralow temperatures by directed immersion of test-tubes into liquid nitrogen [8]. The findings [15] indicate that rapid freezing regimen of pollen is more favourable. Pollen was thawed on water bath at  $37^{\circ}\text{C}$  for one minute.

Viability was determined by traditional methods of seedling emergence in artificial medium, containing 15% sucrose in 0.5% agar-agar based solution. Simultaneously there was controlled the percentage of normally performed pollen-grains by staining in acetocarmine. Number of emergence and stained by acetocarmine pollen-grains were counted under microscope at 100-fold magnification in 8-10 vision fields in 3 repetitions.

### Results and discussion

The results of viability determining for cherry pollen viability were illustrated in Table 1. The pollen of studied cherry cultivars has low percent of emergence on artificial medium and significantly varies depending on sorts. These results conform with literature data about low level of this crop pollen viability [4, 9, 10].

Additional information about pollen quality is given by the data of its staining with acetocarmine (Table 1). Percent of stained pollen is also low and different for various cultivars, however it is higher in comparison with the percent of emerged pollen and characterizes only ripen pollen but not its viability.

Some of supposed causes of cherry pollen low viability for studied cultivars are unfavorable weather conditions within the period of pollen formation and ripening (sharp temperature changes with short-term frosts).

Difference in emergence degree was found 5 months later pollen storage at various temperature regimes. Pollen storage at temperature  $0\pm 2^{\circ}\text{C}$  resulted into a sharp reduction of its emergence in 3 sorts (Prima, Zhukovskaya and Urozhajnyaya) of 4 ones. Elita

пыльцы и характеризует лишь зрелость пыльцы, а не ее жизнеспособность.

Одной из предполагаемых причин низкой жизнеспособности пыльцы вишни исследованных сортов являются неблагоприятные погодные условия в период формирования и созревания пыльцы (резкие перепады температур с кратковременными заморозками).

После 5 мес хранения пыльцы при различных температурных режимах обнаружена разница в степени прорастания. Хранение пыльцы при температуре 0÷2°C привело к резкому снижению ее прорастания у 3-х (сорта Прима, Жуковская и Урожайная) из 4-х сортов. У пыльцы сорта Элита рубиновая, имевшей практически нулевое исходное прорастание, хранение при температуре 0÷2°C заметно его повышает.

Хранение пыльцы вишни в течение 5 мес при температуре –20 и –196°C не снижает ее прорастания. В случае сорта Элита рубиновая хранение при температуре, близкой к 0°C, приводит к значительному повышению жизнеспособности пыльцы. Сходные результаты получены И.Н. Голубинским в опытах с пылью яблони и груши, подвергшейся воздействию слабых отрицательных температур [1].

Причины стимулирующего действия отрицательных температур на прорастание пыльцы с исходно низким уровнем прорастания пока непонятны. Можно предположить, что это явление по своему механизму сходно с процессом стратификации или скарификации семян, находящихся в покое, и требует дальнейшего исследования.

Исходный уровень прорастания пыльцы яблони исследованных сортов был выше, чем у пыльцы вишни (табл. 2), что связано, по-видимому, с видовыми особенностями этих культур. Окрасивание пыльцы ацетокармином также свидетельствует о большем количестве зрелой пыльцы у яблони. Ранее при изучении режимов хранения пыльцы яблони нами было показано [7], что из двух исследованных температур (0 и –20°C) более благоприятной является температура –20°C, поэтому для дальнейших исследований были взяты температуры –20 и –196°C. Хранение пыльцы яблони в течение пяти месяцев при –196°C не повлияло на степень прорастания пыльцы (табл. 2), в то время как хранение при –20°C несколько снизило процент прорастания.

**Таблица 1.** Жизнеспособность пыльцы вишни после 5 мес хранения в различных температурных режимах

**Table 1.** Viability of cherry pollen in 5 months' storage under different temperature regimens

Сорт Cultivars	Окрашивание ацетокармином,% Acetocarmine staining,%	Исходное Initial	Прорастание,% Emergence of seedlings,%		
			После 5 мес хранения при температуре, °C After 5 months' storage at temperature, °C		
			0÷2	– 20	– 196
Прима Prima	70,3±1,0	28,2±0,4	13,6±1,4	31,8±2,7	24,9±1,6
Жуковская Zhukovskaya	79,4±2,1	10,8±2,3	2,7±0,1	19,8±2,9	10,9±2,5
Урожайная Urozhajnaya	34,8±9,8	15,7±1,3	3,7±0,7	14,8±1,5	11,1±0,5
Элита рубиновая Elita rubinovaya	45,6±4,5	0,13±0,08	4,4±1,5	6,1±0,3	5,4±0,2

Rubinovaya cultivar pollen, which had about zero initial emergence the storage at 0÷2°C significantly increased it.

Cherry pollen storage during 5 months at –20 and –196°C does not reduce its emergence. Elita Rubinovaya cultivar storage at the temperature close to 0 leads to considerable rise in pollen viability. Similar results were obtained by I.N. Golubinskiy in the experiments with apple and pear pollens subjected to the influence of moderate negative temperatures [1].

The reasons of stimulating effect of negative temperatures on pollen emergence with initially low level of emergence are not clear yet. We may suppose that this phenomenon mechanism is similar to stratification or scarification of seeds being in rest and requires further study.

Initial emergence rate of apple pollen for studied cultivars was higher than in cherry pollen (Table 2), that is associated probably with species features of these cultures. Pollen staining by acetocarmine also indicates a large amount of ripen apple pollen. Previously when studying the storage regimens for apple pollen we have shown [7] that among two temperatures under study (0÷20°C) the most favourable is –20°C, therefore for further studies – 20 and –196°C were selected. Storage of apple pollen during 5 months at –196°C did not affect pollen emergence rate (Table 2), meanwhile as storage at –20°C slightly reduced emergence percent.

The changes in pollen viability under low temperature storage depend on cultivars peculiarity, that is confirmed with the data in papers [7, 15].

## Conclusions

Thus, among studied regimens of apple and cherry pollen storage the most favourable is cryogenic one (–196°C). Regimen of rapid freezing and thawing of

**Таблица 2.** Жизнеспособность пыльцы яблони после 5 мес хранения в различных температурных режимах  
**Table 2.** Viability of apple pollen after 5 months of storage in different temperature regimens

Сорт Cultivars	Окрашивание ацетокармином,% Acetocarmine staining,%	Прорастание,% Emergence of seedlings,%		
		Исходное Initial	После 5 мес хранения при температуре, °C After 5 months' storage at temperature, °C	
			-200	-196
Июльская Петрова Iyul'skaya Petrova	60,2±4,1	33,5±3,2	30,6±1,9	33,8±2,8
Ароматное Aromatnoe	77,1±0,1	47,3±3,3	32,3±3,7	47,2±1,8
Теллиссари Tellissari	97,3±0,5	67,7±1,3	52,7±2,8	64,7±4,1
Крапчатое Krapchatoye	98,2±0,7	66,6±1,2	63,0±1,4	59,3±2,2

Как и в работах [7, 15] наблюдаются сортовые особенности в изменении жизнеспособности пыльцы в условиях хранения при низких температурах.

### Выводы

Таким образом, из исследованных режимов хранения пыльцы яблони и вишни наиболее благоприятным является криогенное хранение (-196°C). Режим быстрого замораживания и оттаивания пыльцы яблони и вишни при криоконсервировании не влияет на ее жизнеспособность. При отсутствии условий для криоконсервирования возможно непродолжительное хранение пыльцы в морозильных камерах при температуре около -20°C.

### Литература

1. Голубинский И.Н. Исследования прорастания пыльцевых зерен на искусственных средах.– Харьков, 1962.– 20 с.
2. Дуванова Е.А. О жизнеспособности пыльцы яблони, груши и айвы // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции.– 1973.– Т. 40, Вып.3.– С. 43-49.
3. Исаев С.И., Домрачева И.И. Жизнеспособность пыльцы новых сортов яблони и их исходных форм // Биол. науки.– 1973.– №7.– С. 108-112.
4. Котоман Е.М., Беспечальная В.В. Особенности опыления и оплодотворения вишни в условиях Молдавии // Физиолого-биохимические исследования плодовых пород.– Кишинев, 1989.– С. 63-71.
5. Манжулин А.В. Яшина И.М. Хранение пыльцы картофеля при сверхнизких температурах // Сельхоз. биология.– 1984.– №4.– С. 56-59.
6. Нестеров Я.С. Изучение коллекции семечковых культур и выявление сортов интенсивного типа: Метод. указания.– Л., 1986.– С. 69-75.

apple and cherry pollen during cryopreservation does not influence its viability. With the absence of any conditions for cryopreservation short-term storage of pollen is possible in freezing chambers at temperature about -20°C.

### References

1. Golubinskiy I.N. Study of pollen-seeds emergence on artificial media.– Kharkov, 1962.– 20 p.
2. Duganova E.A. Pollen viability of apple, pear and quince trees // Trudy po prikladnyy botanike, genetike i selektsii.– 1973.– Vol. 40, N3.– P. 43-49.
3. Isaev S.I., Domracheva I.I. Pollen viability of new apple tree cultivars and their initial forms // Biol. Nauki.– 1973.– N7.– P. 108-112.
4. Kotoman E.M., Bespechalnaya V.V. Peculiarities of pollinating and fertilization of cherry tree in Moldavia // Physiological and biochemical studies of horticultural species.– Kishinev, 1989.– P. 63-71.
5. Manzhulin A.V., Yashina I.M. Storage of potato pollen at ultralow temperatures // Selskokhozyajstvennaya biologiya.– 1984.– N4.– P. 56-59.
6. Nesterov Ya. S. Study of seed cultures collection and revealing cultivars of intensive type: Methodical recommendation.– Leningrad, 1986.– P. 69-75.
7. Safina G.F., Tikhonova N.G. Pollen viability of apple tree at different storage regimens // Genetically resources of cultivated plants.– St. Petersburg, 2001.– P. 49-50.
8. Sytnik K.M., Manul'skiy V.D. Cryopreservation and long-term storage of plant embryos and pollen.– Puschino, 1983.– 31 p.
9. Tovmasyan V.S. About emergence of dynamic of seedlings and integrity of pollen-grains viability in some Rosaceae // Biological Journal of Armenia.– 1987.– Vol.40, N6.– P. 508.
10. Udachina E.G. Biological peculiarities of pollinating of new cherry cultivars.– Moscow, 1976.– P. 21.
11. Filippova T.V. Possibility of long-term storage of corn pollen at -196°C // Theoretical grounds of selection.– Novosibirsk, 1985.– P. 64-68.
12. Kozaki I., Omura M., Matsuta N., Moriguchi T. Germplasm preservation of fruit trees // Preservation of Plant Genetic Resources. Ref. No.1 – Japan International Cooperation Agency, 1988, p. 65-74
13. Parfitt D.E., Almehti A.A. Liquid nitrogen storage of pollen from five cultivated prunus species // Hort. Science.– 1984.– Vol.19, N1.– P. 69-70.
14. Parfitt D.E., Almehti A.A. Cryogenic storage of grape pollen // Am. J. Enol. Vitic.– 1983.– Vol. 34, N4.– P. 227-229.
15. 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.

Accepted in 07.11.2004

7. Сафина Г.Ф., Тихонова Н.Г. Жизнеспособность пыльцы яблони при различных режимах хранения // Генетические ресурсы культурных растений.– СПб, 2001.– С. 49-50.
8. Сытник К.М., Манульский В.Д. Криоконсервация и длительное хранение эмбрионов и пыльцы растений.– Пушкино, 1983.– 31 с.
9. Тоemasян В.С. О динамике прорастания и сохраняемости жизнеспособности пыльцевых зерен у некоторых розоцветных // Биол. журнал Армении.– 1987.– Т. 40, №6.– С. 508
10. Удачина Е.Г. Биологические особенности опыления новых сортов вишни.– М., 1976.– 21 с.
11. Филиппова Т.В. Возможность длительного хранения пыльцы кукурузы при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  // Теоретические основы селекции.– Новосибирск, 1985.– С. 64-68.
12. Kozaki I., Omura M., Matsuta N., Moriguchi T. Germplasm preservation of fruit trees // Preservation of Plant Genetic Resources. Ref. No.1 – Japan International Cooperation Agency, 1988.– P. 65-74
13. Parfitt D.E., Almehti A.A. Liquid nitrogen storage of pollen from five cultivated prunus species // Hort. Science.– 1984.– Vol.19, N1.– P. 69-70.
14. Parfitt D.E., Almehti A.A. Cryogenic storage of grape pollen // Am. J. Enol. Vitic.– 1983.– Vol. 34, N4.– P. 227-229.
15. 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.

*Поступила 07.11.2004*