

ИНСТИТУТ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ КРИОЛИТОЗОНЫ СО РАН
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ СО РАН

КРИОХРАНЕНИЕ СЕМЯН: ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Ответственные редакторы:
академик *И. Ф. Жимулёв*
чл.-корр. РАН *Н. Г. Соломонов*
докт. биол. наук *В. А. Соколов*



НОВОСИБИРСК
ИЗДАТЕЛЬСТВО СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

2014

УДК 631.52
ББК 41.31
К 82

Криохраниение семян: итоги и перспективы / Отв. ред. И. Ф. Жимулёв, Н. Г. Соломонов, В. А. Соколов; Ин-т биологических проблем криолитозоны СО РАН, Ин-т молекулярной и клеточной биологии СО РАН. Новосибирск: Издательство СО РАН, 2014. – 112 с.

В книге рассмотрены проблемы организации, функционирования и перспективы использования вечномёрзлых грунтов Якутии для длительного хранения семенного материала растений. Работы по использованию естественных источников низких температур в СССР были начаты по инициативе академика ВАСХНИЛ Д. Д. Брежнева в конце семидесятых годов прошлого столетия, задолго до запуска международного проекта на Шпицбергене. К сожалению, они в силу разных причин не были широко поддержаны и велись фактически энтузиастами. Тем не менее, благодаря их усилиям был приобретен определенный опыт и сформировались принципы создания хранилища, организации его функционирования и подбора материалов для хранения. Но, несмотря на многочисленные усилия, исполнители проекта не смогли достичь взаимопонимания с руководством ВНИРа по совместной (при идеологическом руководстве ВНИРа) работе по данному проекту. Тем не менее, перед исполнителями стоит громадная задача по привлечению к работе с сохранением генофондов материалов культурных растений, имеющихся у сибирских селекционеров, ботаников, лесоводов и просто заинтересованных граждан, имеющих частные коллекции уникальных сортообразцов растений, которые могут представлять ценность как источники генетического разнообразия или носители ценных признаков для селекции. Поэтому настоящее издание будет интересно широкому кругу специалистов, работающих с коллекциями растений и заинтересованных в создании банка гермплазмы.

Утверждено к печати Ученым советом
Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН

Рецензенты:

докт. геол.-мин. наук, акад. АН РС(Я) *В. В. Шепелев*
докт. биол. наук, акад. АН РС(Я) *Н. С. Данилова*

ISBN 978-5-7692-1389-2

© ИБПК СО РАН, 2014

© ИМКБ СО РАН, 2014

© Оформление. Издательство СО РАН, 2014

10. НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИИ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН РЕДКИХ И ИСЧЕЗАЮЩИХ ВИДОВ

Основным свойством всех живых организмов является воспроизводство себе подобных. Это обеспечивает непрерывность и преемственность жизни, функционирование биосферы в целом. Изучение репродуктивных особенностей видов, включая особенности латентного периода, является важным этапом при описании биологии видов. Исследование биологии прорастания семян – одно из основных направлений при изучении латентного периода. Полученные результаты важны как для практических целей – для создания и поддержания живых коллекций и семенного фонда, так и для решения теоретических вопросов – систематического, филогенетического направления, выявления эволюционно-адаптационного потенциала таксонов разного уровня. Подобные исследования проводятся давно, но касаются большей частью сельскохозяйственных, декоративных и лекарственных видов [4, 5, 9–11, 24]. Сведения по биологии прорастания редких и исчезающих видов растений малочисленны [16, 18, 20, 22].

Целью работы является выявление информативных признаков для характеристики биологии прорастания семян редких и исчезающих видов растений и сохранения их жизнеспособности.

Одним из условий сохранения вида в ботаническом саду является систематическая смена поколений (через 1–7 лет) путем семенного размножения [17]. Для этого необходимо иметь запас высококачественных семян интродуцированных популяций и знания о биологии прорастания семян. При изучении особенностей биологии прорастания семян рассматриваются следующие вопросы: определение условий и динамики прорастания семян, продолжительность сохранения и жизнеспособности семян, изучение периода покоя и долговечности семян.

В лаборатории интродукции редких и исчезающих видов растений Центрального сибирского ботанического сада СО РАН с 1965 г. ведутся работы по семеноведению редких и исчезающих видов растений Сибири. Создана семенотека, включающая 320 популяций (221 вид), большинство из которых – виды, входящие в списки Красных книг как регионального статуса, так и государственного. Кроме этого, проводятся исследования с использованием метода родового комплекса на примере видов рода *Viola* (Violaceae). Семена редких и исчезающих видов хранятся при комнатной температуре в бумажных пакетах. При изучении биологии прорастания семян используются традиционные методики [1, 3, 5, 6, 10, 21]. Исследование биологии прораста-

ния семян включает в себя четыре основных аспекта: оптимальные условия прорастания семян, выявление типа покоя семян, характеристика динамики и всхожести семян, определение периода сохранения жизнеспособности семян.

При исследовании биологии прорастания семян конкретного вида необходимо определить режим опыта (лабораторный и полевой), ложе для семян, начало, конец и продолжительность этапов опыта. Полевой опыт проводят в три срока: весенний, летний, осенний, в четырехкратной повторности по 100 семян. Это позволяет выявить необходимость тепловой и холодной стратификации.

На прорастание семян оказывают влияния различные факторы эндогенного и экзогенного характера. Семена каждого вида характеризуются определенной нормой реакции на ряд экологических факторов при прорастании, основные из них – температура и свет. Потребность семян в данных факторах – отражение длительной эволюции конкретного вида. Степень проявления нормы реакции, обусловленной генотипом, находится в большой зависимости от конкретных условий формирования и прорастания семян. Среди экзогенных факторов, влияющих на прорастание семян, главенствующую роль принадлежит типу покоя семян. Семена одних дикорастущих видов после созревания могут быстро прорасти при благоприятных условиях (достаточная влажность, хорошая аэрация). Семена других видов находятся в состоянии анабиоза, с замедленными или почти не протекающими процессами метаболизма. Изучению природы покоя семян и условий его преодоления посвящены работы многих авторов, а основанные на классификации типов покоя разработаны М. Г. Николаевой. Причины, вызывающие затрудненное прорастание семян, различны: водонепроницаемость покровов, твердосемянность, содержание ингибиторов, недоразвитие зародыша, его физиологическое состояние. Оптимальные режимы для прорастания семян определяются опытным путем. Для культурных (декоративных и сельскохозяйственных) видов биология прорастания семян наиболее изучена, определены оптимальные условия прорастания, биологическая и хозяйственная долговечность. Эти показатели имеются в изданиях ГОСТ [14, 15]. Для дикорастущих растений, особенно редких и исчезающих видов, биология прорастания семян изучена недостаточна. Еще большие пробелы существуют в определении влияния криохранения семян на прорастание семян и их долговечность.

В работе М. Г. Николаевой с соавторами [12а] впервые дана сводка сведений о прорастании покоящихся семян 3000 видов растений земного шара. Наиболее эффективным и доступным приемом нарушения глубокого покоя семян является стратификация, при которой диапазон температур составляет от 0 °С до +7 °С. Длительность стратификации 1–15 суток для семян с неглубоким покоем и 2–4 месяца для семян с глубоким покоем. Прорастание семян при высоких положительных температурах – это основное биологическое свойство многих видов, которое сохраняется в течение всей их длительной эволюции. Широкая норма реакции позволяет существовать видам в суровых условиях Сибири. Для семян сибирских видов характерно прорастание в ши-

роком диапазоне: как при высоких положительных температурах 18–30 °С, так и при низких положительных температурах 0–+6 °С; в последнем случае значительно увеличиваются периоды до прорастания и прорастания. Анализ прорастания семян видов одного рода показал различную их реакцию на температурные условия. Так, семена *Primula macrocallix* и *P. pallasii* прорастают при различных температурах. У семян ряда видов обнаружено как различное влияние света на процесс прорастания, так и индифферентность по отношению к свету [17]. В связи с вышеизложенным при выборе режимов для проращивания семян в условиях лаборатории мы основываемся на сочетании двух важных факторов – свет и температура.

В результате проведенных исследований нами выделены три основных режима для прорастания семян: одноэтапный, двухэтапный – начинается с холодной стратификации; трехэтапный, который начинается и заканчивается тепловой стратификацией. Температура при тепловой стратификации также может варьировать. В наших опытах семена проращиваются либо при комнатной температуре (20–23 °С), либо в режиме климатостата с установленным фотопериодом (17 ч продолжительность светового периода) и температурным режимом +28 °С при свете и +17 °С в отсутствие света. Для некоторых видов тепловая стратификация проводится при отсутствии света в течение суток в суховоздушном термостате. Для большинства изученных видов растений для прорастания семян продолжительность холодной стратификации составляет 1 месяц, а для некоторых видов этот период может продолжаться более чем 2 месяца и даже в течение года. При одноэтапном режиме проращивания опытную партию семян закладываем в марте, а при двухэтапном опыте семена для первого этапа (холодной стратификации) – в феврале. Первый этап длится 1 месяц. При трехэтапном режиме первый этап (теплая стратификация) начинается в ноябре и длится 2–4 недели. Второй этап (холодная стратификация) продолжается до марта. Если по результатам предварительных опытов установлено, что необходимая длительность 2 этапа – 2–4 недели, тогда первый этап трехэтапного опыта следует начинать в январе. Для определения покоя семян опыт проводится в нескольких повторностях, начиная со свежесобранных семян и повторяя через 1–2 месяца. Продолжительность одноэтапного и последнего этапа двух- и трехэтапного опыта – 30–60 дней от начала прорастания семян при растянутом прорастании. При активном прорастании опыт заканчиваем, если в течение 7 дней семена не прорастают. В каждом режиме – опыт в 4-кратной повторности по 100 семян. Если материал представлен малым числом семян, уменьшаем число семян в повторности или вместо 4-кратной повторности закладываем семена в двух или трех повторностях. Семена проращиваем в стеклянных или пластиковых чашках Петри среднего размера (диаметр 9 см) на комбинированном ложе (кварцевый песок и бумажный фильтр) для мелких семян и на кварцевом песке для крупных семян. Использование прокаленного кварцевого песка позволяет удерживать влагу на поверхности бумажного фильтра, кроме того, хорошо видны мелкие семена. Семена увлажняем по мере необходимости, обычно через день. Семя

считаем проросшим при формировании корешка, размер которого равен величине семени. Подсчет проросших семян проводим от начала прорастания ежедневно в течение недели, затем – через день. При сильном поражении семян плесенью их промываем в 50%-м растворе спирта и помещаем на чистое ложе.

При оценке результатов опыта учитываем режим опыта, дату начала опыта, продолжительность опыта (дни), период до прорастания семян (дни), период прорастания (дни), всхожесть (%), энергию прорастания (%), интенсивность энергии прорастания (%) и максимальную всхожесть (%). Энергия прорастания – это доля семян, проросших в первые 3–5 дней от начала прорастания [21]. День, на который определяется энергия прорастания, видоспецифичен, это также показатель ГОСТ. Для видов, у которых он не установлен, принимается день, указанный в ГОСТ для родственных видов, или день, до которого от начала прорастания появилось максимальное число проростков. Так, для большинства видов рода *Viola* биология прорастания семян не изучена, энергию прорастания мы определяем на 5-й день. Кроме традиционных параметров – всхожесть и энергия прорастания, считаем целесообразным вычислять интенсивность энергии прорастания (отношение энергии прорастания к всхожести, в процентах). По своей сути интенсивность энергии прорастания является количественным выражением качественного признака динамики прорастания семян: высокие значения данного признака определяют интенсивное прорастание в начальном периоде прорастания, а низкие – растянутое прорастание. Изучение биологии прорастания семян у видов рода *Viola* показало, что интенсивность энергии прорастания семян характеризует динамику прорастания и в меньшей степени зависит от срока хранения семян, чем всхожесть и энергия прорастания.

По классическим методикам проращивание семян осуществляется в 3–4-кратной повторности, но часто можно наблюдать, как в одном или двух вариантах при равных условиях по непонятной причине семена почти не прорастают в отличие от других вариантов. Таким образом, представление показателей в виде среднего арифметического значения является малоинформативным. Поэтому результаты прорастания семян мы представляем в виде диапазона минимального и максимального значений параметра, а сравнение признаков проводим по максимальным значениям.

Важным остается вопрос о продолжительности сохранения жизнеспособности семян (долговечности) в разных экологических условиях. В семеноводстве выделяют биологическую (всхожесть более 0 %) и хозяйственную (сохранение кондиционной всхожести) долговечность семян. Кондиционная всхожесть указывается в документах ГОСТ и определена для цветочных и сельскохозяйственных культур. В литературе также отмечается важность выяснения генетической долговечности – срок, при котором не происходит изменение генотипа [7]. Определение данного признака недостаточно разработано.

В исследованиях по долговечности семян, кроме указанных выше параметров, мы учитываем год сбора семян, срок хранения семян, долговечность

Биология прорастания семян редких и исчезающих видов растений

Вид	Условия прорастания семян	Всхожесть в 1 год хранения, %	Биологическая долговечность, лет	Интродукционно-рентабельная долговечность, лет
Alliaceae				
<i>Allium montibicalense</i> Frisen	Комнатная температура	64	6	5
Iridaceae				
<i>Iris laevigata</i> Fisch. et C.A.Mey	2 этапа, холодная стратификация 6 мес.	93	4	3
<i>Paradantopsis dichotoma</i> (Pall.) Lenz	Комнатная температура	100	Более 8	Более 8
Papaveraceae				
<i>Papaver kuvajevii</i> Schaulo et Sonnikova	Комнатная температура	58	6	5
Polygonaceae				
<i>Atraphaxis frutescens</i> (L.) C. Koch	2 этапа, холодная стратификация 3 мес.	78	Более 3	Более 3
Rosaceae				
<i>Coluria geoides</i> (Pallas) Ledeb.	Комнатная температура	84	Более 5	Более 5
Violaceae				
<i>Viola alexandrowiana</i> (Becker) Juz.	Комнатная температура	80	4	4
<i>Viola czemalensis</i> Zuev	3 этапа, холодная стратификация 2 месяца	58	4	2
<i>Viola dactyloides</i> Schultes	Комнатная температура	100	7	5
<i>Viola ircutiana</i> Turcz	Комнатная температура	74	4	3
<i>Viola irinae</i> N.Zolot.	Комнатная температура	100	8	4

семян (биологическую и интродукционно-рентабельную) и период падения всхожести семян на 50 % (период потери половины всхожести) – P_{50} . Период потери половины всхожести (P_{50}) отмечался в ряде работ [19, 23]. Кроме этого, мы считаем, что для размножения и поддержания образцов коллекции целесообразно учитывать срок хранения семян при лабораторной всхожести более 10 % [2]. Этот срок определяем как интродукционно-рентабельную долговечность. В таблице представлены результаты исследований по биологии прорастания семян у редких и исчезающих видов растений Сибири.

Благодаря знаниям биологии прорастания семян, используя лабораторно-теплично-грунтовый метод [1], возможно выращивать растения из малого числа семян с минимальными потерями, что особенно актуально для редких и исчезающих видов растений. Однако для некоторых видов лабораторно-

теплично-грунтовый метод показал отрицательные результаты, но при грун-товом посеве получены положительные результаты у таких видов: *Atraphaxis frutescens* (L.) C.Koch. (Polygonaceae), *Stelleropsis altaica* (Thieb.) Pobed. (Thymelaeaceae).

Таким образом, для изучения биологии семян редких и исчезающих ви-дов растений используются традиционные методики с модификациями для конкретного вида. Поиск оптимальных условий для прорастания часто со-пряжен с наличием большого числа семян. Поэтому для изучения редких и исчезающих видов необходимо иметь устойчивые интродукционные популя-ции. Использование лабораторно-теплично-грунтового метода размножения способствует решению данной задачи. Динамику прорастания семян характе-ризует интенсивность энергии прорастания семян. Для характеристики долго-вечности семян целесообразно использовать период потери половины всхо-жести (P_{50}) и интродукционно-рентабельную долговечность.

Исследования выполнены при финансовой поддержке грантов РФФИ № 13-04-00351, Интеграционного проекта между СО РАН и УрО РАН № 20 и № 12-С-4-1028 и Программы «Биологическое разнообразие» № 30 Прези-диума РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дюрягина Г. П. К методике интродукции редких и исчезающих растений // Бот. журн. 1982. Т. 67, № 5. С. 679–687.
2. Елисафенко Т. В. Некоторые особенности биологии прорастания семян видов рода *Viola* L. При интродукции (г. Новосибирск) // Современная ботаника в Рос-сии / Матер. XIII съезда РБО. Тольятти, 2013. С.
3. Елисафенко Т. В. Изучение особенностей латентного периода растений на при-мере видов секции *Mirabiles* рода *Viola* (*Violaceae*). I. Семенная продуктивность и биология прорастания семян // Растит. мир Азиатской России. 2012. № 2 (10). С. 66–72.
4. Жизнеспособность семян / Под ред. М. К. Фирсовой. М.: Колос, 1978. 415 с.
5. Ишмуратова М. М., Ткаченко К. Г. Семена травянистых растений: особенности латентного периода, использование в интродукции и размножении in vitro. Науч-ное издание. Уфа: Гилем, 2009. 116 с.
6. Методические указания по семеноведению интродуцентов. М.: Наука, 1980. 64 с.
7. Мехтизаде Э. Р., Акпаров З. И., Мамедова С. А. Прогноз генетической долговеч-ности семян // Современные проблемы науки и образования. Электронный науч-ный журнал. 2007. № 3. С. 16–20.
8. Николаева М. Г. Покой семян // Физиология семян. М.: Наука, 1982. С. 125–183.
9. Николаева М. Г. Биология прорастания семян бересклета в связи с его видовыми особенностями и географическим происхождением // Бот. журн. 1956. Т. 41, № 3. С. 393–403.
10. Николаева М. Г. Биология прорастания семян ясеня (*Fraxinus*) в связи с система-тическим положением и распространением его видов // Там же. 1958. Т. 43, № 5. С. 679–683.
11. Николаева М. Г. Некоторые итоги изучения покоя семян // Там же. 1977. Т. 62. № 9. С. 1350–1368.

12. Николаева М. Г. Физиология глубокого покоя семян. Л.: Наука, 1967. 204 с.
- 12а. Николаева М. Г., Разумова М. В., Гладкова В. И. Справочник по проращиванию покоящихся семян. Л.: Наука, 1985. 347 с.
13. Николаева М. Г., Лязгунова И. В., Поздова Л. М. Биология семян. СПб.: Изд-во СПбГУ, 1999. 232 с.
14. Семена овощных, бахчевых культур, кормовых корнеплодов и кормовой капусты. Сортовые и посевные качества. Общие технические условия. ГОСТ Р 52171-2003 М.: ИПК Издательство стандартов, 2004. 16 с.
15. Семена цветочных, ароматических и кормовых культур. М.: ИПК Издательство стандартов, 2004. 27 с.
16. Семенова Г. П. Изучение семян редких видов флоры Сибири в Центральном сибирском ботаническом саду // Вопросы обогащения генофонда в семеноведении интродуцентов: Тез. докл. VIII Всесоюз. совещ. (5–8 апреля 1987). М.: Совет ботанических садов, Главный ботанический сад АН СССР, 1987. С. 109–110.
17. Семенова Г. П. Редкие и исчезающие виды флоры Сибири: биология, охрана. Новосибирск: Гео, 2007. 408 с.
18. Семенова Г. П. Экология прорастания семян редких и исчезающих видов флоры Сибири // Сибир. экол. журн. 2002. № 2. С. 221–236.
19. Стрельцов Б. Н., Рукавишников А. М., Кортанов В. А. Хранение цветов. М.: Агропромиздат, 1988. 204 с.
20. Филиппова Л. Н. Биология развития растений рода *Viola* L. при введении их в культуру // Ботанические исследования за Полярным кругом. Л.: Наука, 1987. С. 23–42.
21. Флоря В. Н. Интродукция и акклиматизация растений в Молдавии (лекарственные, витаминоносные, медоносные). Кишинев: Штиинца, 1987. 296 с.
22. Deno N. C. Second supplement to seed germination theory and practice. State College, PA: N.C.Deno, 1998. 101 p.
23. Dowsett C. A., James T. K., Trivedi P. D. Adaption of a technique for the accelerated ageing of weed seeds to evaluate their longevity // New Zealand Plant Protection. 2012. V. 65. P. 69–73.
24. Telewski F. W., Zeevaart J. A. D. The 120-yr period for Dr. Beal's seed viability experiment // Am. J. Bot. August, 2002. V. 89, N 8. P. 1285–1288.