

## ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ И СВЕРХНИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ СЕМЯН ПЛОДОВЫХ И ЯГОДНЫХ РАСТЕНИЙ

Г.Ф. Сафина

Государственный научный центр РФ Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова РАСХН, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: g.safina@mail.ru

Изучали влияние низкотемпературного и криохранения, а также режимов замораживания–оттаивания при криоконсервации семян диких видов груши, яблони, крыжовника, красной и черной смородины на их жизнеспособность и динамику всхожести семян яблони. Показано, что семена плодовых и ягодных растений с влажностью 5–6 % можно хранить при температуре –18 °С в течение нескольких лет без снижения их жизнеспособности. Криоконсервация семян исследованных растений с оптимальной влажностью независимо от способа замораживания–оттаивания также не влияет на их жизнеспособность. Динамика всхожести и требования к стратификации семян яблони под действием замораживания до сверхнизких температур не меняются. Эти результаты предполагают, что хранение при –18 °С или в жидком азоте может быть использовано для семян диких видов плодовых и ягодных растений.

**Ключевые слова:** плодовые, ягодные культуры, криохранение, криоконсервация.

### Введение

В коллекции Всероссийского института растениеводства представлено большое количество дикорастущих видов плодовых и ягодных растений, которые являются важным источником разнообразных ценных для селекции признаков (Лихонос, 1969, 1974; Бурмистров, 2007). Сохранение коллекции в живом виде – процесс довольно трудоемкий, в связи с этим актуально создание дублетной коллекции. Самым простым и дешевым способом является длительное хранение генетической коллекции растений в виде семян, так как содержание влаги в семенах относительно невелико и при закладке их на низкотемпературное и криогенное хранение не требуется дорогостоящего оборудования и специальной подготовки (обезвоживание, обработка криопротекторами и др.). Наиболее предпочтительным вариантом для сортовой коллекции плодовых является сохранение образцов в виде вегетативного материала (побеги, почки), поскольку при семенном размножении сортовые признаки материнского растения в

потомстве теряются. В то же время популяции диких видов при семенном размножении сохраняют признаки вида. Поэтому для видовой коллекции вполне обосновано длительное хранение образцов в виде семян.

Длительность хранения семян в жизнеспособном состоянии в значительной степени зависит от влажности и температуры хранения (Huntzinger, 1971; Grisez, 1976; Omura *et al.*, 1978; Sanada *et al.*, 1980; Попов, 1982; Молодкин, 1986; Stanwood, Sowa, 1995; Pence, 1996). Для семян большинства видов растений оптимальная влажность лежит между 4 и 7 % (Stanwood, Bass, 1978). Неглубокое замораживание (–10, –18 °С) для хранения семян ряда культур является недостаточным. Наиболее перспективным считается хранение при температуре жидкого азота, которая позволяет теоретически неограниченное время сохранять всхожесть и генетическую полноценность семян. Рядом исследователей показана видоспецифичность реакции семян на температуру хранения и скорость замораживания–оттаивания (Sakai, Noshiro, 1975; Gresshoff, Gartner, 1977; Федосенко, 1978; Молодкин, 1986;

Тихонова и др., 1990, 1994; Далецкая, Полякова, 1994; Нестерова, Яшина, 1994). Относительно режимов замораживания и оттаивания данные литературы противоречивы. Для большей части изученных видов наиболее близким к контролю оказался режим быстрого замораживания до температуры жидкого азота. В качестве наиболее благоприятных режимов оттаивания после криоконсервации упоминаются различные температурные режимы: при комнатной температуре, в водяной бане при 30 °С, 40 °С и 60 °С.

Целью настоящей работы было исследовать влияние низкотемпературного хранения и разных способов замораживания–оттаивания при криогенном хранении на жизнеспособность семян диких видов груши, яблони, красной и черной смородины и крыжовника из коллекции ВИР.

### Материал и методы

Образцы свежесобранных семян подсушивали в сушильной камере при температуре 18 °С и относительной влажности воздуха 10 % до равновесной влажности, которая составляла 5–6 %. Условия сушки соответствовали стандартам для генбанков, установленным IPGRI (Genebank Standards, 1994). Жизнеспособность семян определяли тетразолюно-топографическим методом. Семена хранили при температуре –18 °С в течение 2–6 лет в герметично упакованных фольговых пакетах. Для криоконсервации семена погружали в жидкий азот в герметично закрытых пластиковых пробирках фирмы «Nunc» объемом 2 мл. На семенах отдельных образцов проверяли два режима замораживания: 1) быстрое заморажи-

вание путем погружения пробирок с семенами из комнатной температуры в жидкий азот; 2) двухступенчатое – с предварительным замораживанием пробирок с семенами до –18 °С, и разные режимы оттаивания: 1) на воздухе при температуре 20 °С; 2) в водяной бане в течение 1 мин при температурах от 30 до 50 °С.

Для проращивания семян после криоконсервации и низкотемпературного хранения с целью преодоления их покоя проводили стратификацию в холодильнике при температуре +4 °С.

Для каждого из вариантов брали выборки из 50 семян в 1–2 повторностях.

### Результаты и обсуждение

Низкотемпературное хранение (–18 °С) семян крыжовника (табл. 1) в течение 6 лет не вызывало снижения их жизнеспособности.

Аналогичные результаты получены с семенами груши (Сафина, Бурмистров, 2004), яблони и красной смородины (данные не приводятся).

Результаты опытов с разными режимами замораживания–оттаивания семян груши, яблони и красной смородины показали (табл. 2, 3, 4), что используемые режимы замораживания и оттаивания семян достоверно не меняют их жизнеспособность.

Поэтому в дальнейших исследованиях с семенами яблони, черной смородины и крыжовника при криоконсервации использовали самый простой способ – быстрое замораживание до температуры жидкого азота и оттаивание при комнатной температуре. Жизнеспособность во всех случаях остается на уровне исходной (табл. 1, 5, 6).

Таблица 1

Влияние низкотемпературного и криохранения на жизнеспособность семян крыжовника

Название образца	Жизнеспособность, %		
	исходная	после хранения при –18 °С в течение 6 лет	после криоконсервации
<i>Grossularia acicularis</i>	60,5	65,7 ± 5,9	65,8 ± 3,0
<i>Gr. divaricata</i>	54,5	49,1 ± 3,9	68,4 ± 5,8
<i>Gr. reclinata</i>	73,3	80,0 ± 6,3	64,3 ± 6,8
<i>Gr. robusta</i>	64,0	63,1 ± 6,1	74,4 ± 6,1

Таблица 2

Влияние разных температурных режимов замораживания-оттаивания при криоконсервации в жидком азоте на жизнеспособность семян груши

Название образца	Жизнеспособность, %											
	исходная	хранение в жидком азоте в течение 40 дней						предварительное замораживание до -18 °С				
		прямое погружение		Режим замораживания		предварительное замораживание до -18 °С		Режим замораживания		предварительное замораживание до -18 °С		
		на воздухе при t = 20 °С		в водяной бане, при t °С		на воздухе при t = 20 °С		в водяной бане, при t °С		на воздухе при t = 20 °С		
<i>Pyrus elaeagnifolia</i> Pall.N2	92 ± 0	88	30	40	50	83	30	40	50	90 ± 3	86	98
<i>P. elaeagnifolia</i> Pall.N5	98 ± 2	87	92	-	-	86 ± 2	96	-	-	96	-	-
<i>P. ovoidea</i> Rehd.	76 ± 8	86	-	57	86	-	-	-	-	-	73	83
<i>P. pyraster</i> Burgsd. N7	100 ± 0	98	94	-	-	98 ± 2	93	-	-	93	84	94
<i>P. elaeagnifolia</i> Кр.-4-73	78 ± 2	76	80	68	64	66	70	74	80	74	74	80
<i>P. caucasica</i> Л-69-104	94 ± 2	96	93	-	-	92	86	-	-	86	98	-

Таблица 3

Влияние замораживания и различных способов оттаивания на жизнеспособность семян яблони (*Malus cerasifera*) при криоконсервации в жидком азоте

Замораживание, исходная t °С	Жизнеспособность, %			
	исходная	Способ оттаивания		
		на воздухе при t = 20 °С	в водяной бане при t °С	
-18	99,5 ± 0,5	99,0 ± 1,0	98,0 ± 2,0	99,0 ± 1,0
-20	100,0 ± 0	100,0 ± 0	99,0 ± 1,0	100,0 ± 0

Таблица 4

Влияние различных способов замораживания и оттаивания на жизнеспособность семян красной смородины (*Ribes aureum*) при криоконсервации в жидком азоте

Способ замораживания	Жизнеспособность, %		
	исходная	способ оттаивания	
		на воздухе при t = 20 °С	в водяной бане при t = 37 °С
Прямое погружение в жидкий азот	81,9 ± 6,9	81,6 ± 4,6	86,4 ± 2,2
Предварительное замораживание до –18 °С		78,0 ± 7,6	83,6 ± 1,0

Таблица 5

Влияние криоконсервации семян яблони (*Malus* Mill.) (замораживание семян диких видов с исходной температурой –18 °С, *Malus domestica* – с исходной температурой 20 °С; оттаивание на воздухе при 20 °С) на их жизнеспособность

Название образца	Жизнеспособность, %	
	исходная	после криоконсервации
<i>M. baccata</i> var. <i>sibirica</i>	87,3 ± 4,7	74,3 ± 7,6
<i>M. purpurea</i>	100,0 ± 0	98,0 ± 2,0
<i>M. floribunda</i> сорт Nikita	100,0 ± 0	100,0 ± 0
<i>M. sargentii</i>	83,8 ± 3,8	80,0 ± 5,0
<i>M. soulardii</i>	85,6 ± 3,2	94,0 ± 2,0
<i>M. cerasifera</i>	99,5 ± 0,5	99,0 ± 1,0
<i>M. orientalis</i>	91,0 ± 1,0	94,0 ± 2,0
<i>M. domestica</i> , сорт Caravell	85,7	83,3
<i>M. domestica</i> , сорт Синап Татарский	75,0	69,2

Таблица 6

Влияние криоконсервации на жизнеспособность семян черной смородины

Название образца	Жизнеспособность, %	
	исходная	после криоконсервации
<i>Ribes nigrum</i>	78,6 ± 2,1	81,2
<i>R. nigrum</i> ssp. <i>europaeum</i>	68,4 ± 1,0	71,0
<i>R. nigrum</i> ssp. <i>sibiricum</i>	75,6 ± 3,0	73,2
<i>R. pauciflorum</i>	50,0 ± 1,0	53,7

Далее исследовалось влияние криоконсервации на динамику всхожести семян яблони. Как показали наши опыты, криоконсервация не повлияла на сроки стратификации и ход прорастания.

Динамика прорастания семян яблони у всех исследованных видов за исключением

*M. baccata* (рис. 1, а) не имела значительных отклонений в вариантах: низкотемпературное (–18 °С) и криохраниение (–196 °С). После криоконсервации прорастание семян *M. baccata* несколько замедлилось, но всхожесть осталась на том же уровне. Период прорастания всех образцов длился не более 100 дней, что укладывается

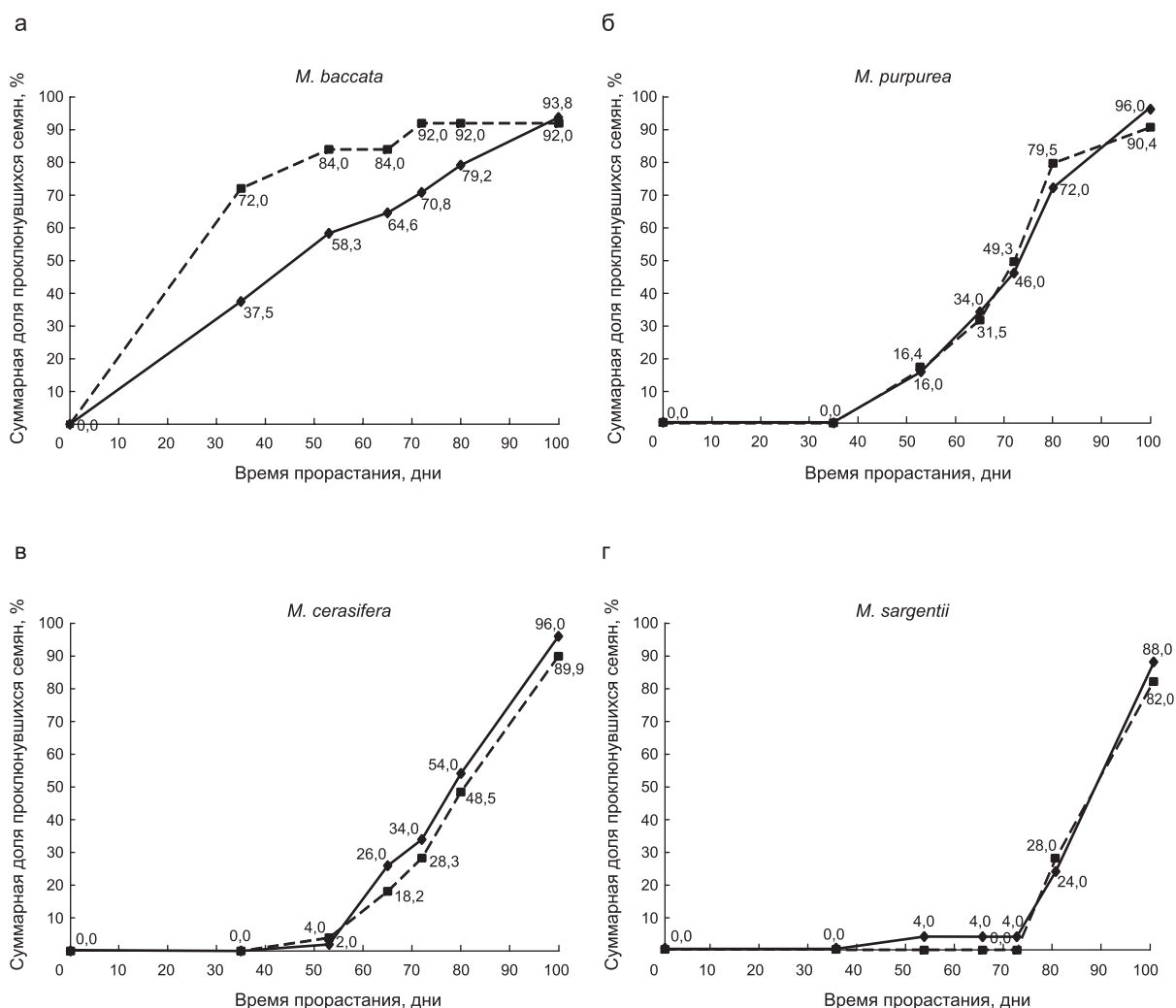
в обычные рамки стратификации семян яблони. У *M. baccata*, хранившейся при температуре (-18 °С), срок стратификации семян закончился на 70-й день. По продолжительности периода от начала стратификации до появления первых зачаточных корешков (у 5 % семян) выделилось 4 группы (рис. 1, а–г; на рис. 1, б, в приведены по одному образцу из данной группы):

а) *M. baccata* с продолжительностью периода – 35 дней; б) *M. purpurea*, *M. domestica* – 55 дней; в) *M. orientalis*, *M. cerasifera*, *M. soulardii* и *M. floribunda* var. Nikita – 65 дней; г) *M. sargentii* – 75 дней.

Наибольшая скорость и интенсивность прорастания (максимальный процент семян

проклюнулись в минимальные сроки) отмечалась у образца *M. baccata*. Наиболее длительного периода прорастания требовали семена *M. sargentii*. Эти образцы принадлежат к различным эколого-географическим группам, поэтому разная скорость прорастания, возможно, связана с их генетическими особенностями.

Анализируя литературные данные, мы предположили, что противоречивые результаты по влиянию различных способов замораживания–оттаивания на жизнеспособность семян различных групп растений связаны с недостаточной степенью их подсушивания, так как оно зачастую производилось в неконтролируемых условиях лаборатории. Возможно, при недо-



**Рис. 1.** Динамика прорастания семян яблони после низкотемпературного и криохранилища (а – *Malus baccata*, б – *M. purpurea*, в – *M. cerasifera*, г – *M. sargentii*).

Сплошная линия – криохранилище (-196 °С), прерывистая линия – низкотемпературное хранение (-18 °С).

статочном подсушивании семян в отдельных случаях оставалась свободная вода, которая при замерзании образовывала кристаллы льда, разрушающие клеточные структуры.

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы: при длительном хранении семян важнейшим фактором является влажность. При соблюдении рекомендуемых IPGRI условий ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  с 5–6 %-й влажностью) семена дикорастущих видов плодовых и ягодных культур можно хранить в течение нескольких лет без снижения их жизнеспособности. Криоконсервация семян исследованных растений с влажностью 5–6 % не влияет на их жизнеспособность, при этом режим замораживания и оттаивания значения не имеет. Поэтому при криоконсервации рекомендуется использовать самый простой способ – быстрое замораживание путем погружения пробирок с семенами в жидкий азот и оттаивание их при комнатной температуре.

### Благодарности

Автор благодарит сотрудников отдела генетических ресурсов плодовых и ягодных культур ВНИИ растениеводства Л.А. Бурмистрова, Н.А. Попкову, О.А. Тихонову и М.Н. Петрову за предоставление растительного материала и консультации.

### Литература

- Бурмистров Л.А. Генетические ресурсы плодовых культур и их использование в селекции в свете развития учения Н.И. Вавилова // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 2007. Т. 164. С. 194–207.
- Далецкая Т.В., Полякова Е.Н. Влияние криоконсервации на прорастание семян и некоторые стороны метаболизма // Биофизика живой клетки. 1994. Т. 6. С. 81–85.
- Лихонос Ф.Д. О происхождении сортов культурной яблони // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1969. Т. 40. Вып. 3. С. 12–32.
- Лихонос Ф.Д. Обзор видов в роде *Malus* Mill. // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1974. Т. 52. Вып. 3. С. 16–34.
- Молодкин В.Ю. Значение влажности семян некоторых зерновых и зерновых бобовых культур при криоконсервации в жидком азоте // Бюл. ВИР. 1986. № 165. С. 22–24.
- Нестерова С.В., Яшина С.Г. Криоконсервация семян некоторых редких и декоративных растений флоры Дальнего Востока // Биофизика живой клетки. 1994. Т. 6. С. 91–93.
- Попов А.С. Сохранение семян и меристем высших растений с помощью глубокого замораживания. Пуццино: НЦБИ АН СССР, 1982. 15 с.
- Сафина Г.Ф., Бурмистров Л.А. Низкотемпературное и криогенное хранение семян груши *Pyrus L.* // Цитология. 2004. Т. 46, № 10. С. 851.
- Тихонова В.Л., Ильина Л.В., Макеева И.Ю., Яшина С.Г. Влияние низких и сверхнизких температур хранения на лабораторную всхожесть семян дикорастущих травянистых растений. 1. Семена без периода покоя // Криобиология. 1990. № 4. С. 23–28.
- Тихонова В.П., Яшина С.Г., Шабаева Э.В. Изучение роста и развития дикорастущих травянистых растений из семян, прошедших криоконсервацию // Биофизика живой клетки. 1994. Т. 6. С. 86–90.
- Федосенко В.А. Использование сверхнизких температур для длительного хранения семян (методы и техника) // Бюл. ВИР. 1978. № 77. С. 53–57.
- Genebank Standards. Rome: FAO/IPGRI. 1994.
- Gresshoff P., Gartner E. Cryopreservation of *Arabidopsis thaliana* and other seeds by storage in liquid nitrogen // Arabidopsis Inform. Serv. 1977. V. 14. P. 12.
- Grisez T.J. Black cherry seeds stored 8 years // Tree Planter's Notes. 1976. V. 27. P. 20–21.
- Huntzinger H.J. Long-term storage of black cherry seed – is it effective? // Tree Planter's Notes. 1971. V. 22. P. 3–4.
- Omura M., Sato Y., Seike K. Long-term preservation of Japanese pear seeds under extra-low temperatures // Long-term Preservation of Favourable Germplasm in Arboreal Crops / Eds T. Akihama, K. Nakajama. Rome: IBPGR, 1978. P. 26–30.
- Pence V.C. Germination, desiccation and cryopreservation of seeds of *Populus deltoides* Bartr // Seed science and technology. 1996. V. 24. № 1. P. 151–157.
- Sakai A., Noshiro M. Some factors contributing to the survival of crop seeds cooled to the temperature of liquid nitrogen // Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow. 1975. P. 317.
- Sanada T., Yoshida T., Haniuda T. Studies on the method of seed storage in apple breeding. 1. Suitable method for short-term storage // Bull. Fruit Tree Res. Sta. Ser. C. 1980. V. 7. P. 1–14.
- Stanwood P., Bass L. Ultracold preservation of seed germplasm // Plant Cold Hardiness and Freezing Stress. 1978. 361 p.
- Stanwood P.C., Sowa S. Evaluation on onion (*Allium cepa* L.) seed after 10 years of storage at  $-5$ ,  $-18$ , and  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  // Crop Sci. 1995. V. 35. № 3. P. 852–856.

**THE INFLUENCE OF LOW AND ULTRALOW TEMPERATURE ON VIABILITY  
OF FRUIT AND BERRY SEEDS**

**G.F. Safina**

State Scientific Centre N.I.Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry of RAAS,  
St.Petersburg, Russia, e-mail: g.safina@mail.ru

**Summary**

The influence of low-temperature and cryogenic preservation, as well as of different freezing-thawing modes on seed viability in wild pear, apple, gooseberry, red and black currant species has been studied. Dynamics of apple seed germination has also been tested. Seeds of fruit and berry plants with 5–6 % moisture content have been shown to store at –18 °C for several years without lossing of viability. Provided that moisture content is optimal in seeds of the studied crops, their viability is not influenced by cryopreservation either. The dynamics of germination and stratification requirements do not change in apple seeds under the influence of freezing down at ultralow temperatures. The obtained results show that storage at –18 °C or in liquid nitrogen may be recommended for seeds of wild fruit and berry species.