

УДК 631.243.36:635.264

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ СЕМЯН ЛУКА-БАТУНА НА ВСХОЖЕСТЬ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИХ ПРОРОСТКОВ

© 2014 г. И.А. Прокопьев, Г.В. Филиппова, А.А. Шенин

ФГБУН Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, Россия,
e-mail: a_prokopiev@mail.ru

Поступила в редакцию 18 февраля 2013 г. Принята к публикации 12 августа 2013 г.

На примере быстростареющих семян *Allium fistulosum* отмечено, что хранение при температурах +4, –6 и –18 °С, вне зависимости от применяемых газовых сред, не вызывает изменений лабораторной всхожести, митотической активности, частоты хромосомных aberrаций и отставаний в росте апикальной меристемы корешков проростков по сравнению с контролем. Показано, что наиболее оптимальными для хранения семян являлись условия: +4 °С (аргон, диоксид углерода), –6 °С (воздух, аргон, азот, диоксид углерода) и –18 °С (воздух), при которых отмечена наименьшая частота встречаемости микроядер в клетках корешков их проростков.

Ключевые слова: семена *Allium fistulosum*, низкотемпературное хранение, жизнеспособность семян, многолетнемерзлые грунты, газовые среды.

Сокращение мировых генетических ресурсов растений создает угрозу продовольственной безопасности планетарного масштаба. Так, по прогнозам Международного союза охраны природы (МСОП) и Международного фонда охраны природы (МФОП), к середине XXI в. 60 тыс. видов высших растений, т. е. 1/4 общего числа видов в мире, могут оказаться под угрозой исчезновения или серьезной генетической эрозии. В этой связи возросла актуальность в обеспечении надежного сохранения генетических ресурсов растений *ex situ*. Относительно безопасным и недорогим вариантом является длительное хранение семян при низких температурах (Филиппенко, 2007), особенно в условиях подземных хранилищ (глубина 8–25 м) в толще многолетнемерзлых пород (Кершенгольц и др., 2008, 2012). Одним из первых в 1920–1930-е годы начал сбор и изучение генетического многообразия культурных растений академик Н.И. Вавилов (1987), усилиями которого была собрана одна из богатейших коллекций генетических ресурсов растений в мире.

Известно, что основными факторами, влияющими на длительность хранения семян растений, являются температура, влажность, парциальное давление кислорода, а также исходная всхожесть семян (Roberts, 1972; Хорошайлов, 1981). Правильное регулирование вышеперечисленных параметров позволяет добиться долгосрочного сохранения жизнеспособности коллекций семян в условиях генных банков (Хорошайлов, 1981).

Цель работы – исследовать влияние различных условий хранения быстро стареющих семян лука-батуна на лабораторную всхожесть и цитогенетические характеристики их проростков.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве тест-объекта был выбран лук-батун (*Allium fistulosum* Regel) сорта Ладожский (лабораторная всхожесть – 97 %, сортовая чистота – 99,9 %), семена которого относятся к микробиотикам, т. е. срок их хранения без пересевов составляет не более 3 лет (Ewart, 1908).

Семена репродукции 2009 г. в том же году были заложены на хранение в воздушной среде при комнатной температуре $\approx +20$ °С и холодильнике при $+4$ °С в Институте биологических проблем криолитозоны СО РАН (г. Якутск); при -6 °С – в Институте мерзлотоведения им. П.И. Мельникова СО РАН (г. Якутск) в условиях толщи многолетнемерзлых грунтов на глубине 12 м и при -18 °С – в морозильной камере Института горного дела Севера им. Н.В. Черского СО РАН (г. Якутск). Для исследования влияния различных газовых сред (Ar , N_2 и CO_2) на длительность хранения семян *A. fistulosum* были выбраны температуры $+4$ °С и -6 °С. В течение 3 лет семена хранились в герметично закрытых стеклянных сосудах объемом 100 см³. Перед закладкой семян на хранение их влажность не превышала 6 %.

Снятые перед закладкой на хранение исходные показатели репродукции *A. fistulosum* 2009 г. (лабораторная всхожесть семян и цитогенетические характеристики их проростков) были приняты в качестве контроля.

Семена проращивали по ГОСТу 12038-84 в чашках Петри на фильтровальной бумаге в темноте при температуре 20 °С по 50 шт. в 4 повторностях. Лабораторная всхожесть определялась на 12-й день наблюдения. Исследование по определению частоты патологических митозов и микроядер проводилось на корешках не менее 10 проростков для каждого образца, которые фиксировали смесью 96 %-го этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1 в течение 12 ч и далее окрашивали ацетоорсеином. Препараты просматривали под световым микроскопом «Аxiostar plus» фирмы «Carl Zeiss» (Германия). Частоту встречаемости хромосомных aberrаций (мосты и фрагменты) и нарушений клеточных делений (отставание хромосом) учитывали анателофазным методом. Частоту микроядер (МЯ) определяли как отношение числа клеток с микроядрами к общему числу просмотренных клеток. Для определения активности деления клеток использовали показатель митотического индекса (МИ), который определяли отношением числа клеток, находящихся в митозе, от их общего числа (Паушева, 1974).

Результаты экспериментов представлены в виде средней арифметической величины и

ее стандартной ошибки. Сравнение средних значений выборок проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), значимость отличий от контроля определяли с помощью критерия Даннета для множественных сравнений при уровне $p \leq 0,05$. Расчет проводился с помощью пакета AnalystSoft, StatPlus – программа статистического анализа, v.2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно международному стандарту, разработанному FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations) и PGRI (International Plant Genetic Resources Institute), для обеспечения более длительного сохранения коллекции генетических банков растений необходимо поддерживать постоянную температуру около или ниже 0 °С и влажностью семян 3–7 % (в зависимости от вида растения), при этом наиболее предпочтительной является температура -18 ± 3 °С (Genebank Standards, 1994).

В результате проведенного исследования по изучению хранения семян *A. fistulosum* в воздушной среде при различных температурных режимах было показано, что только у семян, хранившихся в течение 3 лет при комнатной температуре ($\approx +20$ °С), наблюдалось значимое снижение, до 64,7 %, лабораторной всхожести по сравнению с контролем (аналогичные значения, полученные перед закладкой семян на хранение – 97,0 %; рис. 1, а).

В работе К. Chauhan и М. Swaminathan (1984) показано, что в процессе хранения семян клетки их проростков могут постепенно терять способность к делению. В связи с этим до закладки и после третьего года хранения семян нами исследована митотическая активность клеток апикальной меристемы корешков их проростков. Установлено, что во всех вариантах опыта данный показатель не отличался от исходного значения митотического индекса (МИ) (рис. 1, а).

Считается, что увеличение частоты образования различных хромосомных aberrаций и отставаний (ХА + отставания), а также формирования МЯ – ацентрических фрагментов, возникших в результате структурных нарушений хромосом, может свидетельствовать о начале процессов старения длительно хранившихся семян растений (Roberts, 1972; Villiers, 1974;

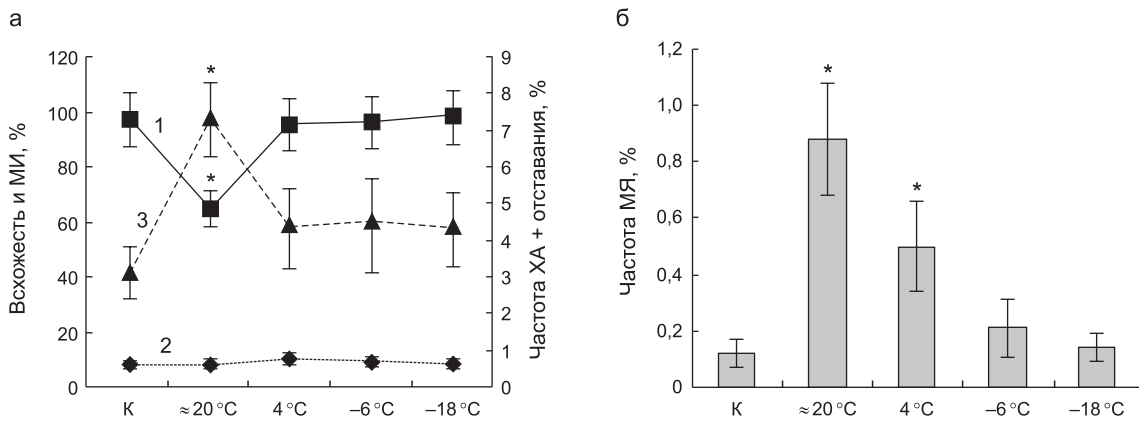


Рис. 1. Лабораторная всхожесть семян, митотический индекс (МИ), частота хромосомных aberrаций (а) и микроядер (б) в апикальной меристеме корешков проростков *Allium fistulosum* после трех лет хранения в воздушной среде.

1 – лабораторная всхожесть; 2 – МИ; 3 – частота ХА + отставания. К (контроль) – начальные физиологические и цитологические характеристики, полученные перед закладкой семян на хранение. * Различия, статистически значимые по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$.

Kumar, Rai, 2006). Так, были обнаружены клетки с патологическими митозами (мосты и фрагменты, отстающие хромосомы) и микроядрами в апикальной меристеме корешков проростков *A. fistulosum* (рис. 2).

Показано, что после трех лет хранения семян частота ХА + отставание была в 2,4 раза выше исходной только при температуре $\approx +20^\circ$. Также выявлено, что при температурах $\approx +20^\circ$ и $+4^\circ\text{C}$ частота встречаемости МЯ была в 7,3 и 4,2 раза выше контроля соответственно (рис. 1, а, б). Отмечено, что неглубокое замораживание семян *A. fistulosum* в воздушной среде при температурах -6° и -18°C не приводит к увеличению частоты встречаемости МЯ в

клетках корешков их проростков в сравнении с исходными показателями.

Таким образом, существенное снижение (в 1,5 раза) лабораторной всхожести семян, хранившихся в воздушной среде при температуре $\approx +20^\circ\text{C}$ в течение 3 лет, вероятно, связано с возросшей частотой встречаемости ХА + отставание и МЯ в клетках тканей корешков проростков по сравнению с контролем и обусловлено более быстрым старением семян. Необходимо отметить, что при хранении семян в течение 3 лет при температурах -6° и -18°C наблюдалась меньшая по сравнению с вариантами $\approx +20^\circ$ и $+4^\circ\text{C}$ частота образования МЯ в тканях корешков их проростков. Полученные результаты

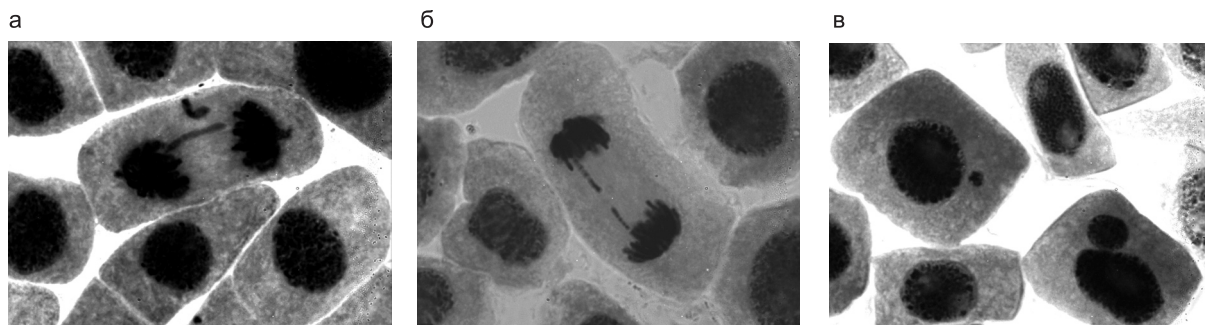


Рис. 2. Хромосомные aberrации, отставания и клетки с микроядрами в апикальной меристеме корешков проростков *A. fistulosum* (Об. 100×, окуляр 16).

а – мост и хромосома на «экваторе» в телофазе; б – отстающие хромосомы в ранней телофазе; в – клетки с микроядрами.

указывают на то, что температуры -18°C и -6°C при хранении семян *A. fistulosum* в воздушной среде являются наиболее оптимальными для замедления процессов старения семян.

Известно, что при повышении парциального давления кислорода в газовой среде наблюдается снижение жизнеспособности семян, обусловленное процессами свободнорадикального перекисного окисления мембранных липидов, вызванного образованием активных форм кислорода (Roberts, 1972; Wilson, McDonald, 1986; McDonald, 1999). В связи с этим появляется необходимость применения альтернативных анаэробных газовых сред, которые в сочетании с низкотемпературными режимами хранения семян могут продлить период их жизнеспособности (Roberts, 1972).

Для исследования были выбраны газовые среды Ar, N₂ и CO₂, не поддерживающие процесс дыхания семян, при постоянных околонулевых температурах $+4^{\circ}\text{C}$ и -6°C . Выбор

температур обусловлен тем, что большая часть коллекции семян в подземном хранилище «Кубанского генетического банка» филиала ВНИИР хранится при температуре $+4^{\circ}\text{C}$, а при -6°C осуществляется перспективное длительное хранение семян в толще многолетней мерзлоты (Филипенко, 2007; Кершенгольц и др., 2012).

Установлено, что трехлетнее хранение семян *A. fistulosum* в различных газовых средах при температурах $+4^{\circ}\text{C}$ и -6°C не вызывает изменений лабораторной всхожести, митотической активности и частоты ХА + отставание в апикальной меристеме корешков проростков по сравнению с контролем (рис. 3, а, в). Между тем частота встречаемости микроядер в клетках корешков проростков из семян, хранившихся только в условиях $+4^{\circ}\text{C}$ в среде воздуха и N₂, увеличивалась в 4,3 и в 4,8 раз по сравнению с контролем соответственно (рис. 3, б, г). При этом механизм «аномального» увеличения час-

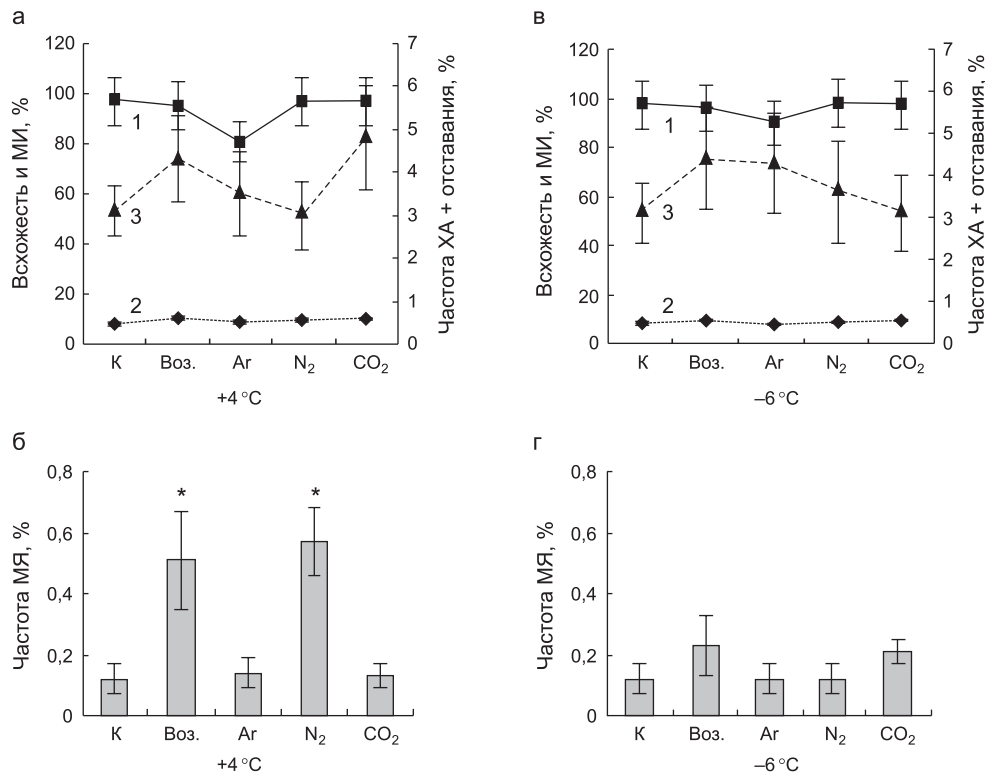


Рис. 3. Лабораторная всхожесть семян, митотический индекс, частота хромосомных aberrаций и отставаний (а, в), а также микроядер (б, г) в апикальной меристеме корешков проростков *Allium fistulosum* после 3 лет хранения при температурах $+4^{\circ}\text{C}$ и -6°C в различных газовых средах.

1 – лабораторная всхожесть; 2 – МИ; 3 – частота ХА + отставания. К (контроль) – начальные физиологические и цитологические характеристики, полученные перед закладкой семян на хранение; Воз. – воздух. * различия, статистически значимые по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$.

тоты МЯ в среде N₂ в литературе не описан и требует дальнейшего изучения.

Таким образом, снижение лабораторной всхожести семян *A. fistulosum* после 3 лет хранения при температуре ≈ +20 °С в воздушной среде, вероятно, связано с возросшей частотой встречаемости хромосомных aberrаций и отставаний, а также микроядер в клетках апикальной меристемы корешков проростков. Показано, что наиболее оптимальными условиями для хранения семян *A. fistulosum* в воздушной среде являлись температуры –6° и –18 °С, при которых отмечена наименьшая частота встречаемости микроядер в клетках корешков их проростков по сравнению с температурами ≈ +20 °С и +4 °С.

Использование различных газовых сред (Ar, N₂ или CO₂) при температурах +4 °С и –6 °С не вызывает изменений лабораторной всхожести, митотической активности, частоты хромосомных aberrаций и отставаний в апикальной меристеме корешков их проростков по сравнению с контролем. Между тем при хранении семян в условиях температуры +4 °С в средах воздуха и N₂ частота образования микроядер была выше в 4,3 и 4,8 раз по сравнению с контролем соответственно.

В целом на примере быстростареющих семян *A. fistulosum* показано, что из всех исследованных условий хранения наиболее эффективными являлись температуры: +4 °С (Ar, CO₂); –6 °С (воздух, Ar, N₂, CO₂) и –18 °С (воздух), однако с позиций энергосбережения вне зависимости от внешних источников энергии) и надежности хранения (при различного рода природных и техногенных катаклизмах) целесообразнее использовать естественный холод круглогодично стабильных температур (–6 °С) многолетнемерзлых грунтов Центральной Якутии.

Работа выполнена при поддержке междисциплинарных интеграционных проектов

СО РАН № 122 «Криосфера как среда жизнеобеспечения и сохранения биоразнообразия» на 2009–2011 гг. и № 7 «Разработка научных основ технологии длительного хранения семян сельскохозяйственных, редких, исчезающих, древесных и других хозяйственно ценных и перспективных видов растений в толще многолетнемерзлых пород» на 2012–2014 гг.

ЛИТЕРАТУРА

- Вавилов Н.И. Организация сельскохозяйственной науки в СССР. М.: Агропромиздат, 1987. 383 с.
- Кершенгольц Б.М., Иванов Б.И., Десяткин Р.В. и др. Использование естественного холода многолетнемерзлых пород для длительного хранения генетических ресурсов // Информ. вестн. ВОГиС. 2008. Т. 12. № 4. С. 524–533.
- Кершенгольц Б.М., Жимулев И.Ф., Гончаров Н.П. и др. Сохранение генофонда растений в условиях многолетней мерзлоты: состояние, преимущества, перспективы // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. № 3. С. 675–682.
- Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1974. 288 с.
- Филиппенко Г.И. Развитие системы низкотемпературного хранения и криоконсервации генофонда растений в ВИР им. Н.И. Вавилова // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 2007. Т. 164. С. 263–272.
- Хорошайлов Н.Г. Длительное хранение семян. Л.: ВИР, 1981. 86 с.
- Chauhan K.P.S., Swaminathan M.S. Cytogenetical effects of ageing in seeds // Genetica. 1984. V. 64. P. 69–76.
- Ewart A.J. On the longevity of seeds // Proc. Roy. Soc. Victoria. 1908. V. 21. P. 1–210.
- Kumar G., Rai P.K. Cytogenetical impact of ageing in six inbreds lines of maize (*Zea mays* L.) // The Nucleus. 2006. V. 49. P. 179–183.
- McDonald M.B. Seed deterioration: Physiology, repair and assessment // Seed Sci. Technol. 1999. V. 27. P. 177–237.
- Pukacka S. Changes in membrane lipid components and antioxidant levels during natural ageing of seeds of *Acer platanoides* // Physiol. Plant. 1991. V. 82. P. 306–310.
- Roberts E.H. Viability of Seeds. L.: Chapman and Hall Ltd, 1972. 448 p.
- Villiers T.A. Seed aging: Chromosome stability and extended viability of seeds stored fully imbibed // Plant Physiol. 1974. V. 53. P. 875–878.
- Wilson D.O., McDonald M.B. The lipid peroxidation model of seed aging // Seed Sci. Tech. 1986. V. 14. P. 269–300.

EFFECT OF DIFFERENT CONDITIONS OF WELSH ONION SEED STORAGE ON GERMINATION AND CYTOGENETIC CHARACTERISTICS OF THEIR SEEDLINGS

I.A. Prokopiev, G.V. Filippova, A.A. Shein

Institute for Biological Problems of the Cryolithozone,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Yakutsk, Russia,
e-mail: a_prokopiev@mail.ru

Summary

By the example of fast-ageing *Allium fistulosum* seeds, it is shown that the storage temperature of +4, –6 and –18 °C, regardless of the used gas atmosphere does not affect laboratory germination, mitotic activity, or the frequency of chromosome aberrations and lags in the apical meristem of seedling roots in comparison to the control. The conditions best for seed storage are: +4 °C (argon, carbon dioxide), –6 °C (air, argon, nitrogen, carbon dioxide) and –18 °C (air), as proven by the lowest frequency of micronuclei in root cells of seedlings.

Key words: *Allium fistulosum* seeds, low-temperature storage, seed viability, permafrost, gas atmosphere.