

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СЕМЕННОГО МАТЕРИАЛА *SERRATULA DISSECTA*

Карагандинский государственный университет имени академика Е.А. Букетова,
Казахстан

В настоящее время усиливается воздействие антропогенного фактора на естественные фитоценозы, что ведет к фрагментации ареалов местообитания и сокращению численности популяций. Для сохранения биологического разнообразия фиторесурсов Казахстана все чаще используют криоколлекции хозяйственно-ценных видов растений, что позволит увеличить сырьевую базу для производства фитопрепаратов. При криоконсервации предпочтительнее использовать семенной материал, так как он не требует больших материальных затрат, гибель зародыша семени при воздействии экстремально низких температур происходит реже, чем у пыльцы или меристем растений. В настоящее время актуальной задачей является создание криоколлекций семенного материала редких и эндемичных видов растений. При введении в криобанки преимущество отдано эндемичным видам растений, т.к. они имеют ограниченный ареал распространения. Для получения наиболее жизнеспособных семян при криоконсервации были использованы криопротекторные вещества.

Объектом исследования являлся семенной материал *Serrarula dissecta* – Серпуха рассеченная из сем. *Asteraceae* – Астровые, собранный в 2015 г. Многолетнее травянистое растение высотой до 45 см. стебли от основания растопыренно-ветвистые, опушены простыми жесткими волосками, листья простые перисторассеченные, с зубчатыми долями, оканчивающимися хрящеватым остроконечием, корзинки мелкие, 0,5-1,5 см шириной, листочки обертки тонко опушенные, зеленые, редко с бурым пятнышком под остроконечием, собраны в щиток. Встречается на каменистых и щебнистых склонах гор, в равнинных степях Центрального и Восточного Казахстана, в Джунгарском Алатау. Эндемик [1].

Серпуха рассеченная является ценным лекарственным растением, т.к. содержит активные вещества фитоэкистероиды, обладающие анаболическим, гипополипидемическим, противовоспалительным, адаптогенным, гемореологическим свойствами. Химический состав серпухи представлен флавоноидами, алкалоидами, витаминами С и К, гидроксикоричными кислотами, дубильными веществами, кумаринами, эфирными маслами, сесквитерпеновыми лактонами, каротиноидами, аминокислотами. Серпуха обладает вяжущим, желчегонным, противорвотным, противохорадочным, противовоспалительным и успокаивающим нервную систему действием [2].

Семена подвергались быстрому замораживанию в жидком азоте (-196°C). Заморозка материала проводилась в пластиковых пробирках (криопробирки марки "Nunc"). Были применены следующие режимы оттаивания: быстрое – на водяной бане, медленное – при комнатной температуре. Посев семян производили сразу после размораживания. При криоконсервации были

использованы криопротекторные вещества, такие как глицерин и ДМСО в концентрации 1%, 3%, 5% [3-5]. После оттаивания семена отмывали от криопротекторов.

Исследование всхожести и энергии прорастания семян осуществляли по методическим указаниям М.С. Зориной и С.П. Кабанова, М.В. Мальцевой [6,7]. В лабораторных условиях семена проращивали в чашках Петри в 4-кратной повторности на 2-х слоях фильтровальной бумаги, смоченной дистиллированной водой. Семена дезинфицировали до замораживания 0,5% KMnO₄. Чашки Петри с семенным материалом помещали в климатическую камеру при температуре +24^oC. Для экспериментов специально семена не отбирали, отбраковывали только поврежденные, с измененной окраской или пустые. Статистическую обработку результатов вели по методике Н.Л. Удольской [8].

В процессе проведения экспериментов была установлена контрольная всхожесть семян серпухи рассеченной в 40,7±0,9%, а энергия прорастания – 32,1±1,0%. Проведя серию экспериментальных исследований, было установлено, что семена серпухи рассеченной в достаточной степени сохраняют жизнеспособность после замораживания в жидком азоте. Действие применяемых криопротекторов состоит в снижении количества свободной воды, повышении вязкости раствора.

При криоконсервации с применением криопротекторов показатели прорастания улучшились, по сравнению с контрольными значениями. Наилучшую всхожесть семенного материала показали семена, замораживаемые в 3%-ном растворе ДМСО (100%) (табл. 1).

Таблица 1 - Показатели прорастания семенного материала *Serratula dissecta* после криоконсервации

Криопротектор	Энергия прорастания,%		Всхожесть,%	
	Медленное оттаивание	Быстрое оттаивание	Медленное оттаивание	Быстрое оттаивание
Без криопротектора	48±0,9	54±1,1	62±0,8	64±0,9
Глицерин	58±0,5	74±1,0	64±0,7	80±0,6
1% ДМСО	46,9±0,7	39,5±0,9	53,2±1,0	55,7±0,7
3% ДМСО	50±0,9	83,3±0,5	68±0,9	100
5% ДМСО	52±1,0	60±0,6	60±0,8	74±0,9

Проведенные исследования доказали большую эффективность криозащитного действия ДМСО по сравнению с глицерином. Использование ДМСО при криогенном хранении обеспечивает более высокую сохранность жизнеспособности семян клеток. Лучшие показатели всхожести после криоконсервации продемонстрировали семена, предварительно обработанные 3% ДМСО и глицерином, замораживаемые в пластике и быстро размороженные на водяной бане – 100% и 80±0,6% соответственно (рис. 1).

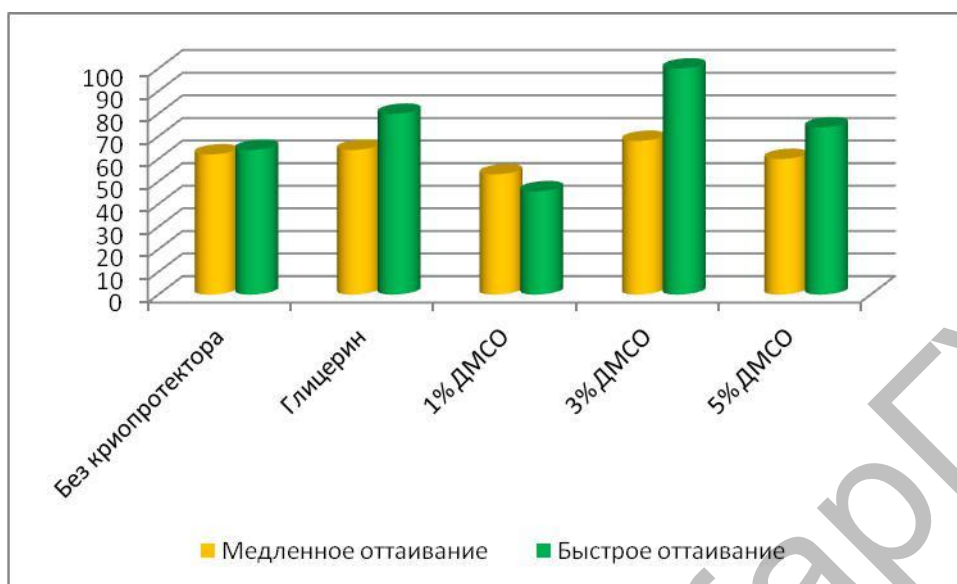


Рисунок 1 - Всхожесть семенного материала *Serratula dissecta* после воздействия экстремально низких температур

Всхожесть и энергия прорастания увеличивается у семенного материала, подвергаемого замораживанию в жидком азоте и быстрому размораживанию, по сравнению с контролем на 13,3% и 29,9% соответственно. Энергия прорастания увеличилась у семян, обработанных глицерином до $54 \pm 1,1\%$, по сравнению простым замораживанием (рис. 2).

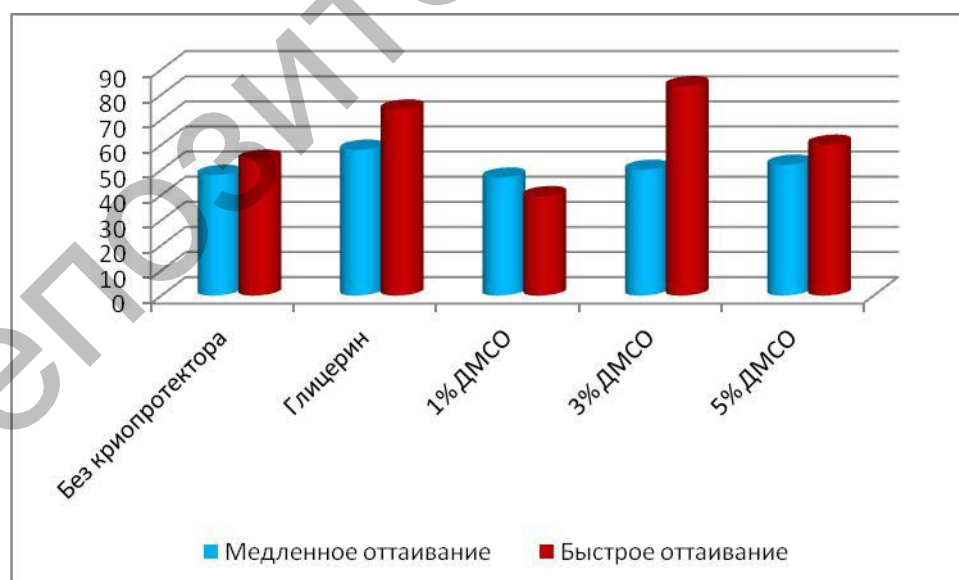


Рисунок 2 - Энергия прорастания семян *Serratula dissecta*, подвергшихся криоконсервации

Быстрый способ оттаивания для семян серпухи рассеченной является лучшим вариантом при криоконсервации с использованием криопротекторов, всхожесть при данном способе составила от 55,7% до 100%, что выше контрольных значений в среднем на 36,7%. Вероятно это связано с тем, что быстрое размораживание исключает процессы рекристаллизации в клетках зародыша семени. Оттаивание на воздухе приводят к более низкому сохранению жизнеспособности семян исследуемого вида – от 53,2 до 68%, по сравнению с размораживанием семян на водяной бане, но выше контрольных значений. Энергия прорастания по сравнению с исходными значениями увеличилась в среднем на 19,6%, всхожесть на 20,6%. Сравнив полученные результаты по применению криопротекторов, было определено, что глицерин и 3% ДМСО проявляют наилучшие криозащитные свойства. Снижение всхожести семян при предварительной обработке 1% и 5% ДМСО объясняется токсическими свойствами вещества, подавлением криозащитных механизмов.

Работа выполнена в рамках грантового проекта КН МОН РК «Изучение современного состояния популяций эндемичных растений Северного и Центрального Казахстана и разработка методов сохранения генетического материала» (2015-2017 гг.).

Список литературы

1 Павлов Н.В. Флора Казахстана. - Алмата: Из-во Академии наук Казахстана, 1960. –Т.9.- 639 с.

2 Додонова А.Ш., Гаврилькова Е.А., Вержук В.Г. Криохранение семенного материала *Serratula dissecta*. Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине. Международная научно-практическая конференция. – Москва, 2016. – С. 47-50.

3 Kaviani B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation // Australian Journal of Crop Sciens.-2011, № 5(6).- P.778-800.

4 Вержук В.Г., Павлов А.В. Анализ эффективности методов криоконсервации по показателю жизнеспособности плодовых растений после криосохранения // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств».-2015, №2.- С.162-167.

5 Нестерова С.В. Криоконсервация семян дикорастущих растений Приморского края: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.32: Владивосток, 2004 150 с. РГБ ОД, 61:04-3/1495.

6 Зорина М.С., Кабанов С.П. Определение семенной продуктивности и качества семян интродуцентов // Методики интродукционных исследований в Казахстане / Сборник научных трудов. – Алма-Ата: Наука, 1976. - С. 75-85.

7 Мальцева М.В. Пособие по определению посевных качеств семян лекарственных растений. - М., 1950. - 56 с.

8 Удольская Н.Л. Методика биометрических расчетов. – Алма-Ата: Наука, 1976.- 45 с.