ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>

ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВИЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СЕМЯН ПИЖМЫ УЛУТАВСКОЙ (*TANACETUM ULUTAVICUM*)

**Додонова А.Ш., Ишмуратова М.Ю.,
Тлеукунова С.У.**

Карагандинский государственный университет имени
академика Е.А. Букетова, Караганда, Казахстан
E-mail: margarita.ishmur@mail.ru

STUDY OF CRYOPRESERVATION CONDITIONS OF TANSY ULUTAVSKY'S (*TANACETUM ULUTAVICUM*) SEEDS

**Dodonova A.Sh., Ishmuratova M.Yu.,
Tleukenova S.U.**

Academic Ye.A. Buketov Karaganda State University,
Karaganda, Kazakhstan
E-mail: margarita.ishmur@mail.ru

В статье приведены результаты криоконсервации семенного материала эндемичного растения Центрального Казахстана пижмы улутавской (*Tanacetum ulutavicum*). Результаты исследований показали, что при шоковой заморозке в жидком азоте без применения криопротекторов лучшей тарой оказалась фольговая, размораживание необходимо вести при комнатной температуре. Применение криопротекторов позволило повысить показатели всхожести и энергии прорастания. Максимальные показатели получены при применении 10% раствора сахарозы, а также смеси глицерина 90% и ДМСО 10%. Предварительное охлаждение до -50°C в течение суток повышает выживаемость семян в 2 раза. Лучшим криопротектором в данном варианте оказался этиленгликоль в концентрации 50%.

Ключевые слова: криоконсервация, семенной материал, пижма улутавская, замораживание, оттаивание, криопротектор

In the article the results of cryopreservation of seed material of the endemic plant of the Central Kazakhstan tansy ulutavsky (*Tanacetum ulutavicum*) are presented. The results of the study showed that in case of shock freezing in liquid nitrogen without the use of cryoprotectors the best container was foil, thawing should be carried out at room temperature. The use of cryoprotectors has increased parameters of seed germination and germination energy. Maximum values are obtained by using 10% sucrose solution, as well as mixture of glycerol 90% and DMSO 10%. Preliminary cooling to -50°C during the one day increases the survival rate of seeds by 2 times. The best cryoprotectant in this variant of experience was ethylene glycol at a concentration of 50%.

Keywords: cryopreservation, seed materials, *Tanacetum ulutavicum*, freezing, thawing, cryoprotector

Поступила в редакцию: 2.09.2019

DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-3-359-363

ВВЕДЕНИЕ

Сохранение редких и исчезающих видов растений является важной задачей государства в рамках ратификации Конвенции о сохранении биологического разнообразия [The Convention..., 2014; Engelmann, 2011]. Одним из методов сохранения растительных объектов является создание крио коллекций семенного материала [Криоконсервация семян..., 2014; Saatkamp et al., 2009]. С помощью криоконсервации создаются банки растительной герма плазмы для пищевых, лекарственных, плодово-ягодных культур, редких и эндемичных видов растений [Hirano et al., 2005; Hu et al., 2013; Pavlov et al., 2019; Romadanova et al., 2017].

Однако, не существует единых требований для замораживания семян при сверх критических низких температурах, что предполагает отработку условий замораживания и оттаивания для каждого объекта индивидуально [Kholina, Voronkova, 2012; Reed, 2002].

Целью настоящего исследования являлась отработка режима замораживания семенного материала узко-эндемического растения Центрального Казахстана *Tanacetum ulutavicum* Tzvel.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись семена пижмы улутавской. Исходный материал был собран в горах Улытау (Карагандинская область) в 2-3 декадах августа 2016-2017 гг. При оценке условий замораживания семена помещали в тару, выдерживали в растворах различных криопротекторов, после чего помещали образцы в сосуд Дюара с жидким азотом [Додонова и др., 2017; Жимулев и др., 2014].

Образцы семян размораживали при комнатной температуре и на водяной бане, отмывали от криопротекторов и высаживали на чашки Петри на 2-слойную фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой. Во время наблюдения оценивали всхожесть и энергию прорастания по вариантам опыта [Зорина, Кабанов, 1987]. Использовали разные концентрации криопротекторов (глицерин, сахароза, ДМСО - диметилсульфоксид, этиленгликоль) и их смеси.

В качестве контроля использовали семена без замораживания – Контроль 1, и семена, подвергаемые двухступенчатому замораживанию без криопротекторов – Контроль 2..

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Всхожесть семян пижмы улутавской в контроле 1 составила 52,0 % при энергии прорастания 43,5 %. Анализ полученных данных по вариантам опыта (табл. 1) показывает, что быстрое замораживание в жидком азоте («шоковая заморозка») сохраняет жизнеспособность семенного материала, однако, во всех вариантах опыта показатели всхожести и энергии прорастания оказались ниже контрольных значений.

Следует отметить, что лучший способ оттаивания при «шоковой» заморозке – при комнатной температуре, тогда как использование водяной бани показало резкое снижение жизнеспособности семян.

Применение криопротекторов при «шоковой» заморозке значительно увеличивает показатели всхожести и энергии прорастания. Так, варианты опыта, превысившие контроль 1, отмечены для раствора сахарозы 10%, а также для смеси глицерина в концентрации 90% и ДМСО в концентрации 10%.

Предварительное охлаждение в течение суток повышает выживаемость семян в 2 раза. Охлаждение до -30°C привело к снижению всхожести семян по сравнению с контролем, а до -50°C способствовало лучшему сохранению жизнеспособности.

Таблица 1. Всхожесть и энергия прорастания семян пижмы улутавской при различных условиях криоконсервации

Вид эксперимента		Энергия прорастания, %	Всхожесть, %
Контроль 1		43,5±1,9	52,0±3,3
Замораживание без применения криопротекторов			
В конвертах из фольги	A	26,0±1,0	34,0±1,0
	B	5,0±0,1	5,0±0,1
В пластиковых пробирках	A	21,0±0,8	29,0±0,8
	B	7,0±0,2	20,0±0,5
В тканевой таре	A	18,0±1,0	22,0±0,4
	B	6,0±0,2	12,0±0,4
Замораживание с применением криопротекторов			
Глицерин	A	20±1	22±1
	B	38±1,1	44±1,1
Сахароза 10%	A	62±1,5	72±1,5
	B	-	-
Сахароза 20%	A	24±0,9	30±0,9
	B	-	-
Сахароза 10%, глицерин 50%	A	4±0,1	44±0,9
	B	12±0,5	36±0,7
ДМСО	A	4±0,2	26±0,8
	B	4±0,2	6±0,2
ДМСО 10%, глицерин 90%	A	48±1,0	72±1,2
	B	12±0,6	22±0,8
Двухступенчатое замораживание и оттаивание при комнатной температуре			
Медленное охлаждение до -30°C, погружение в жидкий азот		9,6±0,2	9,6±0,2
Медленное охлаждение до -50°C, погружение в жидкий азот		40±0,8	40±0,8

Примечание: A - медленное оттаивание при +22°C; B – быстрое размораживание на водяной бане

Однако, 2-этапное замораживание без применения криопротекторов оказалось не эффективным, так как выявлено значительное снижение количества выживших семян: всхожесть в этом случае составила 27,5±3%, энергия прорастания 25±2,5%, что практически в два раза ниже контрольных значений. Для повышения эффективности 2-ступенчатого замораживания нами были использованы различные криопротекторы и их смеси (табл. 2).

Таблица 2. Всхожесть и энергия прорастания семян пижмы улутавской при 2-ступенчатом замораживании с применением криопротекторов

Криопротектор	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %
Контроль 1	43,5±1,9	52,0±3,3
Контроль 2	25,0±2,5	27,5±3,0
Глицерин 100%	42,0±5,8	51,0±3,5
Глицерин 50%	51,8±3,6	55,3±3,8
Глицерин 25%	28,5±2,5	33,0±4,1
Глицерин 12%	17,8±6,1	19,3±0,8
ДМСО 10%	32,0±0,7	36,0±5,0
ДМСО 5%	44,5±3,2	47,3±3,6
Этиленгликоль 100%	18,0±2,5	24,0±3,5
Этиленгликоль 50%	68,0±2,5	70,8±2,6
Этиленгликоль 30%	60,0±5,2	62,0±5,0
ДМСО 5%+этиленгликоль 50%	27,8±3,4	27,7±3,4
ДМСО 5%+глицерин 50%	40,8±4,6	43,3±3,9

Результаты показали, что смеси криопротекторов не оказали должного защитного эффекта на сохранение семенного материала пижмы при 2-этапном замораживании. Применение чистых веществ приводило к более эффективному сохранению семенного материала.

Лучшие показатели всхожести и энергии прорастания при 2-этапном замораживании были отмечены в варианте опыта с этиленгликолем в концентрации 50 %.

Таким образом, можно сделать выводы, что применение криоконсервации является безопасным для зародыша семени, длительный контакт с криопротекторами при температуре ниже -20°C не оказал токсического влияния на биологический материал.

На основании проведенных экспериментов можно сделать следующие выводы:

1. Лучшей тарой для криоконсервации без применения криопротекторов является фольговая, лучший способ оттаивания – при комнатной температуре.
2. Оптимальными условиями замораживания семян *Tanacetum ulutavicum* применением крипротекторов являются замораживание в растворе 10%-ной сахарозы или смеси глицерина и ДМСО; размораживать семена следует медленно - при комнатной температуре.
3. Предварительное охлаждение в течение суток повышает выживаемость семян в 2 раза. При 2-ступенчатом замораживании лучшие результаты получены при предварительном охлаждении до -50°C.
4. Криопротекторы необходимы при 2-этапном замораживании семенного материала пижмы улутавской, так как их отсутствие приводит к выживанию только половины семян. Среди криопротекторов наилучшей защитной способностью обладает этиленгликоль в концентрации 50%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Додонова А.Ш., Ишмуратова М.Ю., Гаврилькова Е.А., Тлеукунова С.У. Рекомендации по криосохранению семенного материала лекарственных и эндемичных видов растений. Караганда: Полиграфист, 2017. 120 с.
2. Жимулев И.Ф., Соломонов Н.Г., Соколов В.А. Криохранение семян: итоги и перспективы. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2014. 110 с.
3. Зорина М.С., Кабанов С.П. Определение семенной продуктивности и качества семян интродуцентов // В сб. Методики интродукционных исследований в Казахстане. Алма-Ата: Наука, 1986. С. 75-85.
4. The Convention on Biological Diversity and the Nagoya Protocol: Intellectual Property Implications. United Nations: UNCTAD, 2014. 215 p.
5. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // In Vitro Cell Dev Biol Plant. 2011. Vol. 47. No. 1. P. 5–16. DOI: [10.1007/s11627-010-9327-2](https://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2)

6. Hirano T., Ishikawa K., Mii M. Cryopreservation of immature seeds of *Ponerorchis graminifolia* var. *suzukiana* by vitrification // *Cryo Letters*. 2005. Vol. 26. No. 3. P. 139-146. PMID: 16082440.
7. Hu W.H., Yang Y.H., Liaw S.I., Chang Ch. Cryopreservation of the seeds of a Taiwanese terrestrial orchids, *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. by vitrification // *Botanical Studies*. 2013. Vol. 54. Article number 33. DOI: [10.1186/1999-3110-54-33](https://doi.org/10.1186/1999-3110-54-33)
8. Kholina A.B., Voronkova N.M. Seed cryopreservation of some medicinal legume // *Journal of Botany*. 2012. Article ID 186891, 7 pages. DOI: [10.1155/2012/186891](https://doi.org/10.1155/2012/186891)
9. Pavlov A.V., Verzhuk V.G., Orlova S.Yu., Radchenko O.Ye., Yerashenkova M.V., Dodonova A.Sh., Gavrilkova Ye.A., Sitnikov M.N., Filipenko G.I., Murashev S.V. Cryopreservation as a method to preserve some fruit and berry crops and wild medicinal plants // *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2019. Vol.29. No.1. P.44-57. DOI: [10.15407/cryo29.01.044](https://doi.org/10.15407/cryo29.01.044)
10. Reed B.M. The basics of in vitro storage and cryopreservation // *National Clonal Germplasm Repository*, Corvallis, O.R. USA. 2012. P. 34-46.
11. Romadanova N.V., Kushnarenko S.V., Karasholakova L.N. Development of a common PVS2 vitrification method for cryopreservation of several fruit and vegetable crops // *In vitro Cell Dev Biol Plant*. 2017. Vol. 53. No. 4. P. 382-393. DOI: [10.1007/s11627-017-9849-y](https://doi.org/10.1007/s11627-017-9849-y)
12. Saatkamp A., Affre L., Dutoit T., Poschlod P. The seed bank longevity index revisited: limited reliability evident from a burial experimental and database analyses // *Ann. Bot.* 2009. Vol. 104. P. 715-725.