

ТЕОРІЯ, МЕТОДИ І ПРАКТИЧНІ АСПЕКТИ ІНТРОДУКЦІЇ ТА РЕІНТРОДУКЦІЇ

ІІІ. ЗБЕРЕЖЕННЯ РІДКІСНИХ РОСЛИН

УДК 577.95; 575; 592/599

Е.Р. Арапет'ян, М.О. Щербина, Ю.М. Усатенко

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Університетська, 1, Львів, 79014 Україна
e-mail: emarapetyan@gmail.com

ЗБЕРІГАННЯ НАСІННЯ МАЛОПОШИРЕНИХ ХВОЙНИХ РОСЛИН ПРИ УЛЬТРАНИЗЬКІЙ ТЕМПЕРАТУРІ

Насіння, рідкий азот, схожість, збереження, кріоконсервація

ЗБЕРІГАННЯ НАСІННЯ МАЛОПОШИРЕНИХ ХВОЙНИХ РОСЛИН ПРИ УЛЬТРАНИЗЬКІЙ ТЕМПЕРАТУРІ. Е.Р. Арапет'ян, М. О. Щербина, Ю.М. Усатенко. – Представлені дослідження впливу умов зберігання для насіння семи видів деревних рослин. Насіння досліджуваних видів з родини Pinaceae – *Abies balsamea* (L.) Mill., *Larix americana* Michx., *Pinus cembra* L., *P. peuce* Griseb., *Tsuga canadensis* (L.) Carriere; з родини Taxaceae – *Taxus baccata* L.; з родини Taxodiaceae – *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng. – зберегло життєздатність після знаходження у рідкому азоті протягом одного місяця. Встановлено, що ґрунтова схожість насіння, обробленого температурою -196°C , є однаковою або збільшилась/зменшилась у порівнянні з контрольним варіантом. Ріст та розвиток проростків, отриманих у дослідному варіанті, не відрізнявся від контрольних. Аномальних проростків не відзначено.

СОХРАНЕНИЕ СЕМЯН МАЛОРАСПОСТРАНЕННЫХ ХВОЙНЫХ РАСТЕНИЙ ПРИ УЛЬТРАНИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ. Э.Р. Арапет'ян, М.А. Щербина, Ю.Н. Усатенко. – Представлены исследования влияния условий хранения семян семи видов древесных растений. Семена исследуемых видов из семейства Pinaceae – *Abies balsamea* (L.) Mill., *Larix americana* Michx., *Pinus cembra* L., *P. peuce* Griseb., *Tsuga canadensis* (L.) Carriere; из семейства Taxaceae – *Taxus baccata* L.; из семейства Taxodiaceae – *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng. – сохранили свою жизнеспособность после нахождения в жидком азоте в течение одного месяца. Установлено, что почвенная всхожесть семян, обработанных температурой -196°C , одинакова или увеличилась/уменьшилась по сравнению с контрольным вариантом. Рост и развитие проростков семян опытного варианта не отличались от контрольных. Аномальных проростков не отмечено.

SEED STORAGE OF NOT WIDELY SPREAD CONIFEROUS PLANTS UNDER ULTRALOW TEMPERATURE. E.P. Arapetyan, M.A. Scherbyna, Yu.N. Usatenko. – This paper presents the results of investigations of the influence of storage conditions for seven arboreal species. The seeds of the studied species from family Pinaceae: *Abies balsamea* (L.) Mill., *Larix americana* Michx., *Pinus cembra* L., *P. peuce* Griseb., *Tsuga canadensis* (L.) Carriere; *Taxus baccata* L. from family Taxaceae; *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng. from family Taxodiaceae have retained their viability after being in liquid nitrogen for one month. It has been determined that soil germinability of treatment by temperature -196°C was the same or increased/decreased as compared with control variant. The growth and development of seedlings of the experimental variant did not differ from control one. Abnormal seedlings were not registered.

Збереження рослин *ex situ* є актуальним напрямком природоохоронних заходів. У програмі "Європейської стратегії збереження рослин" наголошується про активне залучення ботанічних садів до охорони місцевої флори (http://www.bgci.org/botanic_gardens). Виходячи з того, що насіння є основним носієм спадкової інформації, збір насіння рослин та його утримання є одним із варіантів збереження фіторізноманіття *ex situ*. Програми досліджень в ботанічних садах, як і інших природоохоронних осередків, включають завдання зі створення та розвитку колекцій насіння природної та культурної флори з метою збереження в умовах *ex situ* (Jackson, 2002). Постає питання збереження життєздатності

зібраного насіння до часу його посіву (Рубцов, 2010). Колекції насіння зберігають у насінневих лабораторіях, як правило, при кімнатній температурі. Відомо, що збереження за таких умов негативно впливає на його якість. Воно старіє, порушуються процеси метаболізму, втрачається схожість (Лазаренко, Безруков, 2008). Підходи, способи і методи збереження генетичної інформації рослинного походження весь час удосконалюються. Нові напрямки досліджень почали розроблятися у векторі створення банків рослин різної інтеграції, що відобразилось в міжнародних документах, зокрема, в документі "Європейська стратегія охорони біорізноманіття".

Оптимальнішим з усіх методів збереження насіння вважається його зберігання в умовах рідкого азоту (кріоконсервація). Метод консервації насіння в рідкому азоті використовується у світовій практиці і є пріоритетним напрямком довгострокового зберігання насіння зі збереженням його властивостей. На даний час для насіння багатьох трав'янистих та деревних об'єктів визначена можливість збереження рослинного матеріалу без пошкодження його генетичної інформації при ультранизких температурах впродовж необмеженого часу (Stanwood, 1981). Дослідження щодо зберігання насіння в рідкому азоті дозволили створити банки довготривалого збереження насіння (www.LBGjgora.pl).

Кріоконсервація насіння, як сучасний метод, започаткована у Львівському національному університеті імені І. Франка (ЛНУ). Дослідження впливу температури рідкого азоту (-196°C) на життєздатність насіння розпочаті у Ботанічному саду та Науково-технічному і навчальному центрі низькотемпературних досліджень. У першу чергу досліді проводили з насінням рослин природної та культурної флори України. Для насіння низки видів трав'янистих рослин відпрацьована методика їх зберігання при температурі рідкого азоту (Arapetyan, Usatenko, 2006; Арапет'ян, Борсукевич, 2010).

Методика та об'єкти досліджень

Об'єктом дослідження було насіння деревних рослин трьох родин: Pinaceae – *Abies balsamea* (L.) Mill., *Larix americana* Michx., *Pinus cembra* L., *P. peuce* Griseb., *Tsuga canadensis* (L.) Carriere; з родини Taxaceae – *Taxus baccata* L., з родини Taxodiaceae – *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng. Латинські назви рослин подані за "Flora Europaea" (<http://www.ars-grin.gov>). Характеристика рослин представлена за довідником "Дендрофлора України. Дикорослі та культивовані дерева і кущі. Голонасінні" (2001). Для флори України *T. baccata* та *P. cembra* є аборигенними деревними рослинами, інші досліджувані види – інтродукованими екзотами, з яких *T. canadensis*, *M. glyptostroboides* та *A. balsamea* культивуються в колекції дендрофлори ботанічного саду ЛНУ. Всі види є високодекоративними рослинами. Насіння для дослідів було зібране як у ботсаду ЛНУ, так і в інших ботанічних закладах Заходу України. Протягом двох років насіння зберігалось у неконтрольованих лабораторних умовах. Дослідне насіння представляло інтерес не стільки з огляду відсотку схожості, скільки, і в першу чергу, характеристикою життєздатності насіння після його зберігання при -196°C .

В місцях природного зростання в Північній Америці (від Атлантичного до Тихого океану) *Abies balsamea* – ялиця бальзамічна – досягає 15–20 м заввишки і доживає до 150–200 років. Характеризується як дуже морозостійке дерево, що не переносить сухості ґрунтів і повітря. Насіння *A. balsamea*, за М. Николаєвою з співавторами (Николаєва и др., 1985), має лабораторну схожість 8–10% та зберігає схожість протягом одного–двох років. За іншими авторами (Плоды..., 1991), частина насіння проростає без стратифікації, а для іншої частини рекомендується стратифікація протягом місяця.

Pinus cembra (кедр європейський) – реліктовий середньоевропейський вид в ізольованих та локальних популяціях з диз'юнктивним ареалом. У природних умовах зростання дерева досягають 25 м заввишки. Рослини зимостійкі, відносно тіншовитривалі, краще ростуть на зволжених глинистих ґрунтах. В умовах ботсаду вид культивується з 20-х років 20 ст. В колекції дендрофлори ботсаду нараховується 11 екземплярів, найвищий з яких досягає 18 м. Насіння *Pinus cembra* їстівне, маса 1000 насінин – 250 г., рекомендується стратифікувати. Ґрунтова схожість насіння 70% (Плоды..., 1991).

Pinus peuce (сосна румелійська, або балканська) росте в горах Балканського півострова, досить посухостійка. Насіння потребує стратифікації протягом 2–6 місяців, якщо

воно не свіжозібране (Николаева и др., 1985; Плоды..., 1991).

Природним ареалом *Tsuga canadensis* (тсуга канадська) є східна частина Північної Америки, де вид досягає 25–30 м заввишки. На рівнині росте в мішаних лісах, а в гірських долинах утворює чисті насадження. Вибаглива до зволоження, тіншовитривала, зимостійка. В ботанічному саду у віці близько 40 років знаходиться у пригніченому стані.

Природний ареал *Larix americana* (модрина американська) охоплює Атлантичний регіон Північної Америки. Рослина дуже світлолюбна, зимостійка, середньовибаглива до родючості і вологості ґрунту.

Taxus baccata (тис ягідний, негній-дерево) – дерево або кущ, поширений у Карпатах і Передкарпатті, гірських районах Європи, на Близькому Сході і Кавказі. Третинний релікт. Народну назву "негній-дерево" тис отримав за високу якість деревини та дивовижну стійкість її до гниття. Тиси тіншовитривалі, стійкі у міських умовах, добре переносять обрізку. Природні ареали тису скорочуються, тому вид занесений до "Червоної книги України" (1996, 2009). У дендропарку ботанічного саду понад 70 тисів ростуть поодинокі або групами. Найстаріший екземпляр, віком біля 300 років, досягнув 15 м заввишки при діаметрі двох зрослих стовбурів 74 см. Жіночі особини щороку плодоносять і дають чимало самосіву. В умовах ботанічного саду ЛНУ середня маса 1000 шт. свіжозібраних плодів становить 453,7 г, 1000 насінин – 62,6 г. Середній вихід насіння складає 13,7%. Насіння краще проростає після стратифікації (Николаева и др., 1985).

Metasequoia glyptostroboides (метасеквоя китайська) інтродукована з насіння, отриманого з Китаю в 1952 р. Опис культивування виду в умовах ботанічного саду ЛНУ представлено в попередній роботі (Арапетян, Щербина, 2008). В експозиціях ботсаду росте понад 40 екземплярів, найбільший з яких 28 м заввишки при діаметрі стовбура 86 см. Лабораторна схожість насіння досягає 30–40%, ґрунтова – 22–27% (Плоды..., 1991). Більш нові літературні дані показують, що лабораторна схожість насіння залежить від місць зростання виду. Так, схожість насіння, зібраного в умовах Лісостепу у 2000 р., не перевищує 14%, з Ялти – 7,8%, з Сочі – 8,5% (Слюсар, 2005). Відзначено, що лабораторна і ґрунтова схожість насіння однакові.

Досліджуване насіння по 50–100 штук у дво- або трикратній повторності засипали в пластмасові епандорфи та опускали у заповнену рідким азотом посудину Дьюара, де воно знаходилось протягом одного місяця. Насіння контрольного варіанту зберігалось в кімнатних умовах. Реконсервацію насіння після зберігання в рідкому азоті проводили в лабораторних умовах. Визначали ґрунтову схожість насіння, яке висівали у вкопані в ґрунт посівні ящики і стратифікували впродовж зимового періоду. Аналізували ріст та розвиток проростків у порівнянні з контролем (Веллінгтон, 1972).

Результати та їх обговорення

Насіння досліджуваних об'єктів мало різну реакцію на екзогенну обробку низькою температурою. Вплив ультранизької температури на насіння дослідних видів виявився видоспецифічним. Для п'яти видів дослідних насінин відмічена стимуляція схожості (табл.). Кількість пророслого насіння дослідного варіанту є нижчою, ніж у контролі, для двох видів *P. peuce* та *P. cembra*.

Таблиця Вплив температури рідкого азоту на ґрунтову схожість насіння хвойних, %

Назва виду	Контроль	Дослід
<i>Metasequoia glyptostroboides</i>	1,7±0,3	1,7±0,7
<i>Tsuga canadensis</i>	3,0±1,5	4,7±0,3
<i>Abies balsamea</i>	1,7±0,9	2,3±0,9
<i>Larix americana</i>	1,0±0,6	2,3±0,3
<i>Taxus baccata</i>	0	0,7±0,3
<i>Pinus peuce</i>	1,3±0,9	0,7±0,3
<i>Pinus cembra</i>	2,0±0,2	1,0±0,1

Примітка: * – середнє з трьох повторностей.

Дослідні види рослин за реакцією насіння на температуру –196°C можна поділити на чотири групи. До першої відноситься *M. glyptostroboides*, зберігання насіння якої в

рідкому азоті не вплинуло на відсоток схожості насіння та було однаковим в контрольному та дослідному варіантах. В другу групу входять *T. canadensis*, *A. balsamea*, *L. americana*. Знаходження насіння цих видів у рідкому азоті характеризується збільшенням відсотку схожості у порівнянні з контрольним насінням. Для рослин третьої групи – *T. baccata* – зберігання насіння у рідкому азоті стимулювало його схожість, на відміну від насіння контрольного варіанту, яке після знаходження в лабораторних умовах впродовж тривалого часу втратило свою схожість. До четвертої групи належать *P. peuce* та *P. cembra*. Зберігання насіння цих видів при температурі рідкого азоту призвело до пониження схожості у порівнянні з насінням контрольного варіанту.

Прокльовування насіння всіх дослідних видів розпочалось одночасно у контрольному та дослідному варіантах. Період його проростання розтягнутий та спостерігався впродовж трьох місяців. Ріст та розвиток проростків, отриманих з насіння дослідного варіанту, є однаковим з контрольним варіантом. Проростки, отримані з насіння, обробленого температурою, за морфологічними ознаками не відрізнялись від контрольних.

Отримані експериментальні дані підтверджують літературні джерела для хвойних. Експозиція насіння в рідкому азоті мала негативний вплив для *Pinus banksiana*, *P. clausa* та позитивний ефект для *P. nigra*, *P. rigida* (Parresol et al, 2011). Так, наприклад, для насіння *P. nigra* відсоток схожості насіння після зберігання у рідкому азоті становив 25%, в той час як у контролі –11%.

Висновки

Таким чином, насіння деревних видів *Abies balsamea*, *Larix americana*, *Metasequoia glyptostroboides*, *Pinus cembra*, *P. Taxus baccata*, *Tsuga canadensis* не втратило своєї життєздатності після зберігання протягом одного місяця у рідкому азоті. Насіння досліджуваних видів не потребує спеціальної підготовки та кріопротекторів для збереження їх життєздатності під час утримання у рідкому азоті. Режим зберігання (заморожування/розморожування) насіння не вимагає поступового охолодження/розморожування. В даних дослідженнях використовували швидке заморожування. Пластмасові епендорфи застосовували в якості ємкостей для зберігання насіння у рідкому азоті. Такі контейнери широко застосовуються у лабораторіях і є простими у використанні. Відмічена видоспецифічність реакції насіння різних видів хвойних на дію ультранизької температури. Знаходження при температурі -196°C збільшило/не збільшило відсоток схожості дослідного насіння. Ріст та розвиток проростків, отриманих з насіння, яке знаходилося в азоті, не відрізнявся від розвитку проростків контрольного варіанту. Деформованих проростків у дослідному варіанті не відмічено

Арапетян Е. Р. Дослідження впливу розчинів мікроелементів міді та бору на схожість насіння представників *Pinopsida* / Е. Р. Арапетян, М. О. Щербина // Старовинні парки і ботанічні сади : матер. III Міжнар. наук. конф., присв. 215-річчю дендропарку "Олександрія" (29 вересня–3 жовтня 2008 р., Біла Церква). – Біла Церква, 2008. – С. 178–180.

Арапетян Е. Р. Вплив кріозберігання на життєздатність насіння *Alyssum gmelinii* Jord. (*Brassicaceae*) / Е. Р. Арапетян, Л. М. Борсукевич // Наук. вісн. НЛТУУ. – 2010. – Вип. 20.16. – С. 115–117.

Веллінгтон П. Методика оценки проростков семян / П. Веллінгтон. – М. : Колос, 1972. – 174 с.

Дендрофлора України. Дикорослі та культивовані дерева і кущі. Голонасінні : Довідник / М. А. Кохно, В. І. Гордієнко, Г. С. Захаренко та ін. ; за ред М. А. Кохно, С. І. Кузнецова. – К. : Вища школа, 2001. – 207 с.

Лазаренко Л. М. Динамика хромосомной нестабильности батуна (*Allium fistulosum* L.) : влияние температуры хранения семян / Л. М. Лазаренко, В. Ф. Безруков // Цитология и генетика. – 2008. – Т. 42, № 5. – С. 54–60.

Николаева М. Г. Справочник по проращиванию покоящихся семян / М. Г. Николаева, М. В. Разумова, В. Н. Гладкова. – Л. : Наука, 1985. – 347 с.

Плоды и семена деревьев и кустарников, культивируемых в Украинской ССР. – К. : Наук. думка, 1991. – 315 с.

Рубцов А. Ф. Прискорене розмноження нових малопоширених деревних інтродуцентів і високодекоративних культиварів в аспекті впровадження в озеленення південно-степового регіону України / А. Ф. Рубцов // Вісті Біосферного заповідника "Асканія-Нова". – 2010. – Т. 12. –

С. 146–154.

Слюсар С. І. Біологічні особливості видів родини Taxodiaceae F. W. Neger у зв'язку з інтродукцією в лісостепу України : автореф. дис. на здобуття наук. ступ. канд. біол. наук : спец. – 030005. "Ботаніка." / С. І. Слюсар. – К., 2005. – 18 с.

Arapetyan E. Seed cryoconservation as up to date tool for diversity preservation of wild ukrainian flora / E. Arapetyan., Yu. Usatenko // Біологічний вісник. – 2006. – Т. 10. – № 1. – С. 26–27.

Botanic gardens conservation international [Електронний ресурс] / Режим доступу: http://www.bgci.org/botanic_gardens

Flora Europe [Електронний ресурс] / – Режим доступу <http://www/FE/fe.html>

Флора світу [Електронний ресурс] / – Режим доступу <http://www.ars-grin.gov>.

Jackson P. S. W. The Global Strategy for Plant Conservation / P. S. W. Jackson // An International Conference for Botanic Gardens "Science for Plant Conservation". – Dublin, Ireland, 8–10 July 2002. – Dublin, 2002. – P. 2.

Parresol Bernard. Effect of Liquid Nitrogen Storage on Seed Germination of 51 Tree Species / Bernard Parresol, Barbour Jill, Victor Vankus, Gary Johnson // Southern Research Station National Center for Genetic Resources Preservation, USDA Forest Service, National Tree Seed Laboratory.: www.Effectofliquidnitrogenstorageonseedgermination.

Stanwood P. C. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen / P. C. Stanwood, L. N. Bass // Seed Sci. Technol. – 1981. – Vol. 9, N. 2. – P. 423–437.

Червона книга України. Рослинний світ / [під заг. ред. Ю. Р. Шеляг-Сосонка]. – К. : Укр. енциклопедія, 1996. – 603 с.

Червона книга України. Рослинний світ / [під ред. Я. П. Дідуха]. – К. : Глобалконсалтинг, 2009. – 912 с.

Надійшла 12.03.2012 р.