

КРІОЗБЕРЕЖЕННЯ НАСІННЯ СПОРАДИЧНО ПОШИРЕНИХ ТРАВ'ЯНИХ РОСЛИН ФЛОРИ УКРАЇНИ

Е. Арапет'ян, Ю. Усатенко

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Черемшини, 44, Львів 79014, Україна
e-mail: emarapetyan@gmail.com

Насіння дослідних видів *Agrostemma githago*, *Berteroa incana*, *Doronicum carpaticum*, *Heliosperma carpaticum*, *Melandrium album*, *Silene dubia* зберегло життєздатність після перебування у рідкому азоті протягом шести місяців. Встановлено, що лабораторна схожість насіння, яке зберігалось за температури -196°C , не змінювалась або збільшилась порівняно з контрольним варіантом. Ріст і розвиток проростків, отриманих у дослідному варіанті, не відрізнялися від контрольних. Аномальних проростків не відзначено.

Ключові слова: насіння, рідкий азот, кріоконсервація, схожість, фітозбереження.

Першочерговість охорони рослин, занесених до Червоної книги, є зрозумілою. Але поняття “рідкісна рослина”, або рослина, яка занесена до Червоної книги, дуже хитке. Прикладом цього є *Arnica montana* L. Вид було занесено до першого видання Червоної книги України та вилучено з його другого видання [8, 9], хоча у документах Європейської стратегії збереження рослин він характеризується як такий, що перебуває під загрозою. Вид є у списку лікарських рослин ботанічних садів [4], але літературні дані щодо розмноження з подальшим зав'язуванням насіння у культурних умовах відсутні. У міжнародних документах, які визначають шляхи збереження різноманіття флори, акцентується на першочерговості охорони рослин місцевої флори з природних локалітетів, незважаючи на їх статус [3]. Збереження у культурних умовах потребують не тільки рослини, які на даний час занесені до Червоної Книги, але й інші групи рослин, наприклад, ендеми або види, які трапляються спорадично, тобто поодинокі, від випадку до випадку (*Agrostemma githago*, *Doronicum carpaticum*, *Heliosperma carpaticum*, *Melandrium album* та низка інших видів). Так, для *Doronicum carpaticum*, який спорадично трапляється тільки у Карпатах [7, 12], ботанічні дослідження відзначають його поширення на нижній межі ліміту [11]. Прикладом зміни точки зору щодо списку рослин, які підлягають охороні, є міжнародна конференція “Сорные растения в изменяющемся мире: актуальные вопросы изучения разнообразия, происхождения, эволюции” [5]. На конференції обговорювали шляхи збереження рослин, які визначаються як бур'яни і для яких відзначено їх зникнення [14], та прийняли постанову щодо збереження окремих видів бур'янів, наприклад, *Agrostemma* (кукілю).

Метод консервації насіння у рідкому азоті при температурі -196°C використовується у світовій практиці понад тридцять років і є пріоритетним напрямом довгострокового зберігання насіння зі збереженням його властивостей. Виходячи з того, що насіння є основним носієм спадкової інформації, збір насіння рослин у природних локалітетах і його кріоконсервація є одним із варіантів збереження фіторізноманіття *ex situ* [13].

На теренах України першим науковим внеском у цьому напрямі були дослідження зі зберігання насіння *A. montana*, зібраного у природних місцях зростання [2]. Метою наших досліджень було дослідити вплив умов зберігання насіння у рідкому азоті на його життєз-

датність, лабораторну схожість і початкові етапи росту й розвитку для низки представників флори України, які характеризуються як спорадично поширені.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження було насіння малопоширених рослин природної флори *Agrostemma githago* L., *Heliosperma carpaticum* (Zapal.) Klok, *Melandrium album* (Mill.) Garcke, *Silene dubia* Herbich, *Doronicum carpaticum* (Griseb. et Schenk) Nym., *Berteroa incana* (L.) DC. Більшість дослідних рослин, згідно з Визначником [7], у минулому столітті траплялись у місцях зростання спорадично (табл. 1).

Таблиця 1

Характеристика досліджуваних видів

Назва виду	Назва виду	Родина	Характеристика виду
<i>Agrostemma githago</i> L.	Кукіль звичайний	Caryophyllaceae	Трапляється спорадично
<i>Berteroa incana</i> (L.) DC., син. <i>Alyssum incanum</i> L.	Гикавка сіра	Brassicaceae	
<i>Doronicum carpaticum</i> (Griseb. et Schenk) Nym.	Сугайник карпатський	Asteraceae	Трапляється спорадично
<i>Heliosperma carpaticum</i> (Zapal.) Klok, син. <i>Silene pusilla</i>	Геліосперма карпатська	Caryophyllaceae	Трапляється спорадично
<i>Melandrium album</i> (Mill.) Garcke, син. <i>Silene alba</i> (Mill.)	Куколиця біла	Caryophyllaceae	Трапляється спорадично
<i>Silene dubia</i> Herbich	Смліка сумнівна	Caryophyllaceae	Високогір'я Карпат

Насіння вищезгаданих видів було зібране у природних місцях зростання і протягом двох років містилось у паперових пакетах при кімнатній температурі. Насіння даних видів не характеризується глибоким спокоєм.

Досліджуване насіння по 50 штук у дво- або трикратній повторності засипали в пластмасові пробірки й опускали у заповнену рідким азотом посудину Дьюара, де воно містилось протягом шести місяців. Насіння контрольного варіанта перебувало при кімнатній температурі. Реконсервацію насіння після зберігання у рідкому азоті проводили у лабораторних умовах. Насіння пророщували на зволоженому водою фільтровальному папері у чашках Петрі на розсіяному світлі при кімнатній температурі. Визначали лабораторну схожість насіння, аналізували початкові етапи росту й розвитку проростків. Оцінку розвитку проростків проводили згідно зі стандартами Міжнародних правил визначення якості проростків за Веллінгтоном [1].

Результати і їхнє обговорення

Насіння всіх дослідних видів зберегло свою життєздатність у разі безпосереднього його занурення у рідкий азот, тобто режим швидкого заморожування рослинного матеріалу в рідкому азоті можливо використовувати для насіння даних рослин. Головним критерієм визначення впливу екзогенних чинників на насіння є такий параметр як схожість. Аналіз отриманого експериментального матеріалу показав, що зберігання насіння дослідних об'єктів у рідкому азоті вплинуло на проростання. Схожість насіння залежала від виду та могла бути як такою самою, так і більшою ніж у контрольного насіння, яке не піддавалося заморожуванню. За відсотком схожості насіння рослини можна поділити на дві групи.

Рослини першої групи – *A. githago*, *B. incana*, *S. dubia* – характеризуються значним збільшенням відсотка схожості насіння після зберігання його у рідкому азоті порівняно з насінням контрольного варіанта (табл. 2). Перебування насіння *A. githago* у рідкому азоті позитивно вплинуло на схожість, яка становила 56%, у той час як необроблене температурою насіння контрольного варіанта – 28%. Зберігання насіння *B. incana* та *S. dubia* у

рідкому азоті збільшило його схожість до 100% та 36%, тоді як у контрольному варіанті схожість насіння становила 20% та 11% відповідно. До другої групи належать *H. carpaticum* та *D. carpaticum*, зберігання насіння яких протягом шести місяців у рідкому азоті стимулювало його схожість, на відміну від насіння контрольного варіанта, яке після перебування у лабораторних умовах упродовж тривалого часу втратило свою схожість.

Таблиця 2

Схожість насіння після перебування у рідкому азоті (-196°C), %

Назва виду	Контроль	Дослід
<i>Agrostemma githago</i> L.*	28	56
<i>Berteroa incana</i> (L.) DC.*	20	100
<i>Silene dubia</i> Herbich*	11	36
<i>Heliosperma carpaticum</i> (Zapal.) Klok*	0	39
<i>Doronicum carpaticum</i> (Griseb.et Schenk) Nym. **	0	13
<i>Melandrium album</i> (Mill.) Garcke*	27	29

Примітка. * – середні дані трьох повторностей; ** – середні дані двох повторностей.

Умови зберігання не вплинули на схожість насіння *M. album*. Вона була однаковою у контрольному та дослідному варіантах (табл. 2). Насіння схожість *M. album* контрольного варіанта, яке перебувало в лабораторних умовах більше року, становила 27%. Кінцевий відсоток схожості дослідного варіанта був трохи більшим контрольного і становив 29%.

Отримані експериментальні дані підтверджують літературні дані [6] щодо видоспецифічності реакції насіння різних видів на дію ультранизької температури. Види *A. githago*, *H. carpaticum*, *M. album* належать до однієї родини *Caryophyllaceae*. Для *M. album* схожість дослідного насіння є однаковою порівняно з контрольним, необробленим температурою, насінням, а для *A. githago* – вдвічі більшим. Для насіння *H. carpaticum* відзначено стимуляцію схожості насіння, тоді як насіння контрольного варіанта втратило схожість. Якщо рослини характеризувати як одно- та багаторічники, то досліджувані види можна поділити на дві групи. Насіння однорічних рослин *A. githago*, *B. incana* характеризується збільшенням схожості після зберігання у рідкому азоті. Для багаторічних рослин *D. carpaticum* та *H. carpaticum* перебування насіння при температурі -196°C стимулює його схожість, яка була втрачена для контрольного варіанта.

Зберігання насіння всіх досліджуваних видів у рідкому азоті не пришвидшило проростання насіння, як це спостерігалось у попередніх дослідях, наприклад для *Rhododendron luteum* [10]. Насіння *A. githago*, розкладене у чашках Петрі, почало прокльовуватись одночасно у контрольному та дослідному варіантах через п'ять днів від часу замочування насіння у воді. Проростання насіння спостерігалось протягом десяти днів. Однотижневі проростки дослідного варіанта, як і контрольні, мали корені завдовжки 3–4 см та були заввишки 3 см. Проростки дослідного варіанта випереджували за розвитком контрольні та мали зелені сім'ядолі, які у проростків контрольного варіанта відзначені трохи пізніше. Початок прокльовування насіння *B. incana* відзначено одночасно у контрольному й обробленому низькою температурою варіантах через тиждень від початку дослідження. Проростання насіння у контрольному варіанті спостерігалось протягом десяти днів. Зберігання насіння *B. incana* у рідкому азоті скоротило період проростання до трьох днів. Насіння *H. carpaticum*, яке містилось у рідкому азоті, почало прокльовування через тиждень від початку дослідження. Цей процес спостерігався протягом десяти днів. Насіння контрольного варіанта не проросло навіть упродовж місяця. Для насіння *D. carpaticum* відзначена та сама характеристика проростання, та і для вищеприписаного виду. Прокльовування насіння *M. album* розпочалось одночасно у контрольному та дослідному варіантах. Період проростання даного насіння розтягнутий і тривав упродовж вісімнадцяти днів. У контрольному та дослідних варіантах

десятиденні проростки *M. album* заввишки до 7 см мали коріння завдовжки до 4 см та розгорнуті зелені сім'ядольні листки. Аналіз початкових етапів росту і розвитку показав, що проростки, отримані з насіння, яке перебувало при температурі -196°C , за морфологічними ознаками не відрізнялися від контрольних для всіх досліджуваних видів.

Таким чином, для дослідного насіння спорадично поширених рослин природної флори України, яке зберегло життєздатність після перебування у рідкому азоті протягом шести місяців, можливе використання сучасного методу консервації рослинного матеріалу в рідкому азоті (-196°C). Насіння дослідних видів рослин для збереження життєздатності не потребує спеціальної підготовки та криопротекторів під час зберігання у рідкому азоті. Пластмасові пробірки, які широко використовуються у лабораторіях, слугували як контейнери для зберігання насіння у рідкому азоті. Режим зберігання (заморожування/розморожування) насіння не потребує поступового охолодження/розморожування. Перебування при температурі -196°C збільшило або не збільшило схожість насіння. Експериментальний матеріал для насіння видів *A. githago*, *B. incana*, *D. carpathicum*, *H. carpathicum*, *M. album*, *S. dubia* флори України отримано вперше.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Веллінгтон П. Методика оценки проростков семян. М.: Колос, 1972. 174 с.
2. Грищенкова Е. А., Рязанцев В. В., Гулевский А. К., Чаплай Е. В. Создание криобанка семян редких и исчезающих видов лекарственных растений // Проблемы криобиологии. 1996. № 2. С. 32–34.
3. Європейська стратегія збереження рослин Botanic gardens conservation international [Електронний ресурс] / Режим доступу <http://www.bgci.org>.
4. Каталог лікарських рослин ботанічних садів і дендропарків України: довідковий посібник / за ред. А.П. Лебеди. К.: Академперіодика, 2008. 160 с.
5. Сорные растения в изменяющемся мире: актуальные вопросы изучения разнообразия, происхождения, эволюции: Междунар. конф. Санкт-Петербург: 6–8 декабря 2011. Ин-т растениеводства им. Н.И.Вавилова (ВИР). Изд-во ВИР СПб., 2011. Режим доступу <http://www.vir.nw.ru/news/27.12.2011.html>
6. Никишина Т. В., Попова Е. В., Вахрамеева М. Г. и др. Криосохранение семян и протокормов редких орхидей умеренного климата // Физиол. растений. 2007. Т. 54. № 1. С. 137–143.
7. Определитель высших растений Украины / ред. Ю. Н. Прокудин. / Доброчаева Д. Н., Котов М. И., Прокудин Ю. Н. и др. К.: Наук. думка, 1987. 545 с.
8. Червона книга України. Рослинний світ / під заг. ред. Ю.Р. Шеляг-Сосонка. К.: Укр. енциклопедія ім. М. П. Бажана, 1996. 603 с.
9. Червона книга України. Рослинний світ / під ред. Я.П. Дідуха. К.: Глобалконсалтинг, 2009. 912 с.
10. Arapetyan E., Tymchyshyn G., Panasyuk M. Use of cryoconservation for the flora diversity preservation by the seeds genetic information conservation // Інтродукція та збереження рослинного різноманіття // Вісн. Київ. ун-ту. 2005. № 9. С. 6–7.
11. Fragmenta floristica et geobotanica / Polskie Towarzystwo Botaniczne. Publishing Office of W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences. 1998. Vol. 43, Is. 1, 2.
12. Ine's A' lvarez Ferna' ndez. Systematics of eurasian and north african *Doronicum* (Asteraceae: Senecioneae) // Annals of the Missouri botanical garden. 2003. Vol. 90. N 3. P. 319–389.

13. *Keith J. Hatton, Eaton J.W. Rescue* Refuge and return: A model for the role of the Botanic Garden in conservation // *Science for Plant Conservation: An International Conf. for Botanic Gardens*. Dublin: 8–10 July 2002. P. 3.
14. *Tasenkevich L. Red List of Vascular Plants of the Carpathian Mountains*. Lviv: Carpathian Ecoregion Initiative, 2002. 28 p.

Стаття: надійшла до редакції 21.12.12

доопрацьована 06.03.13

прийнята до друку 13.03.13

SEED CRYOPRESERVATION OF SPORADICALLY DISTRIBUTED HERBACIAL PLANTS FLORA OF UKRAINE

E. Arapetyan, Yu. Usatenko

*Ivan Franko National University of Lviv
44, Tschermshyna St., Lviv 79014, Ukraine
e-mail: emarapetyan@gmail.com*

This study presents the results of seed conservation of wild herb species under liquid nitrogen condition during 6 months. The seed survival was observed for all species *Agrostemma githago*, *Berteroa incana*, *Doronicum carpaticum*, *Heliosperma carpaticum*, *Melandrium album*, *Silene dubia*. It has been concluded that laboratory germinating ability of treatment by temperature -196°C seeds was identical or increase in compare with control variant. There is no difference in growth and development of seedlings from uncryopreserved and cryopreserved seeds.

Keywords: seeds, liquid nitrogen, cryoconservation, germination, phytopreservation.

КРИОСОХРАНЕНИЕ СЕМЯН СПОРАДИЧЕСКИ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ТРАВЯНЫХ РАСТЕНИЙ ФЛОРЫ УКРАИНЫ

Э. Арапетян, Ю. Усатенко

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Черемшны, 44, Львов 79014, Украина
e-mail: emarapetyan@gmail.com*

Семена исследованных видов *Agrostemma githago*, *Berteroa incana*, *Doronicum carpaticum*, *Heliosperma carpaticum*, *Melandrium album*, *Silene dubia* сохранили свою жизнеспособность после нахождения в жидком азоте в течение шести месяцев. Установлено, что лабораторная всхожесть семян, хранившихся при температуре -196°C , одинаковая или увеличилась по сравнению с контрольным вариантом. Рост и развитие проростков семян опытного варианта не отличались от контрольных. Аномальные проростки не отмечены.

Ключевые слова: семена, жидкий азот, криоконсервация, всхожесть, фитосохранение.