



УДК 630\*232.315.2

## Влияние режимов замораживания и оттаивания на всхожесть семян сосны и ели

© О. Ю. Бутенко, А. С. Бондаренко, Н. Н. Пелевина

---

### **Influence of freezing and thawing on the germination of pine and spruce seeds**

**O. U. Butenko, A. S. Bondarenko, N. N. Pelevina** (Saint-Petersburg Forestry Research Institute)

The purpose of work is to research influence of freezing and thawing on the germination of pine and spruce seeds. Test of different variants of freezing and thawing of coniferous seeds showed that good results of germination (excess over the control of 4–5 %) for spruce seeds was in the variant with freezing to  $-86^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $4^{\circ}\text{C}$  per minute with a detent for 30 min and thawing to  $+20^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $4^{\circ}\text{C}$  per minute, for pine seeds – in the variant with freezing to  $-2^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $4^{\circ}\text{C}$  per minute with a detent for 5 minutes and subsequently freeze to  $-98,3^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $4^{\circ}\text{C}$  per minute with detent 30,9 min and thawing to  $+20^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $4^{\circ}\text{C}$  per minute.

**Key words:** germination, seeds, spruce, pine, freezing, thawing

### **Влияние режимов замораживания и оттаивания на всхожесть семян сосны и ели**

**О. Ю. Бутенко, А. С. Бондаренко, Н. Н. Пелевина**

Целью работы являлось исследование влияния режимов замораживания и оттаивания на всхожесть семян сосны и ели. Испытание разных режимов замораживания-размораживания на семенах двух хвойных пород показало, что хорошие результаты по последующей всхожести (превышение над контролем 4–5 %) для семян ели получены в варианте 7: замораживание до  $-86^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $4^{\circ}\text{C}$  в минуту, с фиксацией на достигнутой температуре 30 мин и размораживании до  $20^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $4^{\circ}\text{C}$  в минуту, для семян сосны – в варианте 4: замораживание до  $-2^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $4^{\circ}\text{C}$  в минуту с фиксацией на 5 мин и дальнейшем замораживании до  $-98,3^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $4^{\circ}\text{C}$  в минуту с фиксацией на 30,9 мин и размораживании до  $20^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $4^{\circ}\text{C}$  в минуту.

**Ключевые слова:** всхожесть, семена, ель, сосна, замораживание, оттаивание

Бутенко Олеся Юрьевна, канд. с.-х. наук, ст. науч. сотр.

Бондаренко Александр Сергеевич, канд. с.-х. наук, начальник науч.-исслед. отдела лесной селекции и биотехнологии

Пелевина Наталия Николаевна, канд. с.-х. наук, ст. науч. сотр.

ФБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт лесного хозяйства»

194021, Санкт-Петербург, Институтский пр., д. 21

Тел.: (812) 552-80-26

E-mail: din\_don@bk.ru

На долю лесов России приходится около 21 % мировых запасов, что позволяет отнести её к ведущим лесным державам. Однако в условиях постоянного экологического стресса (пожары, несанкционированные рубки, техногенное загрязнение, массовые усыхания и т. п.) всё большее значение приобретает задача сбережения генетических ресурсов лесов. Расширение сети особо охраняемых природных территорий или выделение лесных генетических резерватов являются недостаточными мерами в этом направлении, необходимо активно использовать самые современные достижения мировой лесохозяйственной науки и практики.

Перспективным является сохранение растительного генофонда с помощью семян. С этой целью в начале 70-х годов в ряде стран (Италия, Германия, США, Япония) были организованы первые центры по долговременному сохранению зародышевой плазмы.

Так как продолжительность жизни семян очень разная: от нескольких часов (у некоторых тропических орхидных) до десятков и сотен лет, то одним из самых важных вопросов является режим их хранения [11, 15, 18], который зависит от видовой принадлежности, анатомических, физиологических, биохимических, морфобиологических особенностей семян и определяет условия их содержания (температуру, влажность, состав газовой среды и др.).

Большое значение имеет подготовка семян к хранению, в первую очередь это касается предварительной сушки с применением технологий, способствующих повышению посевных качеств. Положительные результаты получены при воздействии на семена хвойных пород высокочастотного электромагнитного поля [10].

В настоящее время для сохранения жизнеспособности семян (и культурных видов, и дикорастущих) широко применяются пониженные температуры: низкие положительные ( $4 \pm 1$  °C), неглубокие отрицательные ( $-10 \dots -20$  °C), а также глубокие отрицательные с применением жидкого азота ( $-196$  °C) или паров от него (около  $-160$  °C). В главном ботаническом саду РАН с 1982 г. проводится сравнение этих трех режимов долговременного хранения для семян дикорастущих видов (охраняемых, ле-

карственных, декоративных и др.). Они значительно отличаются от семян культурных растений: они большей частью мелкие, часто с затрудненным прорастанием (из-за наличия покоя, обусловленного плотной кожурой, недоразвитием зародыша и др.), весьма неоднородны по морфологическим и физиологическим показателям на внутри- и межпопуляционном уровнях. На модельных видах ведется мониторинг за падением всхожести семян при  $+ 5$  °C; изучена лабораторная всхожесть семян одних и тех же образцов после пробного замораживания (1 мес.) при разных температурах у 180 видов растений [15]. Экспериментальные данные показывают, что неглубокое замораживание у ряда видов дает худшие результаты, чем глубокое, и в не меньшей степени нуждается в изучении последствий.

В 1989 г. исследованиями Национальной лаборатории по хранению семян США установлено, что низкие положительные температуры могут гарантировать сохранение жизнеспособности у семян большинства культурных видов на исходном уровне только в течение 5–10 лет хранения, а неглубокое замораживание ( $-18$  °C и ниже) – до 10–20 лет. В Португалии подведение итогов хранения семян редких растений в течение 2 и 4 лет показало, что у половины изученных видов (14 из 28) неглубокое замораживание ( $-17$  °C) привело к резкому падению жизнеспособности даже по сравнению с хранением в комнатных условиях. Поэтому для наиболее ценных генетических фиторесурсов был рекомендован режим глубокого замораживания (криоконсервация) [15].

Криоконсервация (от греч. κρύος – холод и лат. *conservō* – сохраняю) – сохранение при экстремально низких температурах (с помощью жидкого азота) живых биологических объектов с возможностью восстановления их физиологических функций после размораживания [2]. В техническом отношении данный метод проще, дешевле, надежнее, а также экологически чище, чем рефрижераторный [15].

Глубокое замораживание может длиться от нескольких минут до целого ряда месяцев и лет. Оценка успешности криоконсервации обычно определяется по лабораторной всхо-

жести семян. Накопившиеся результаты показывают, что для семян большинства культурных видов такой вид хранения не приводит к ее снижению, но последствия изучены недостаточно [15].

Имеются сведения о положительном влиянии глубокого замораживания на всхожесть семян – в частности, характеризующихся твердосемянностью [16, 12], а также имеющих физический тип покоя [9]. Изучение динамики роста сеянцев, выращенных из семян *Sophora flavescens* Soland, хранившихся в жидком азоте в течение 1 месяца, показало, что криоконсервация не приводит к появлению уродливых экzemпляров [4].

Этот приём уже рекомендуется для некоторых бобовых, поскольку обеспечивает повышение их всхожести [15]; для семян вишни и черешни глубокое замораживание запатентовано как способ долговременного хранения [1]. Всероссийским институтом растениеводства им. Н. И. Вавилова (ВИР) накоплен значительный опыт по длительному хранению семян сельскохозяйственных культур с применением низкотемпературных режимов [11]. Опыт ВИР демонстрирует потенциальную возможность решения проблемы сохранения генетических ресурсов лесных растений с помощью жидкого азота.

Таким образом, криоконсервация семян культурных видов, которая еще совсем недавно считалась технологией на перспективу XXI века, становится весьма актуальной уже сейчас.

Изучение метаболизма в замороженных культурах тканей, клеток растений и микроорганизмов позволило установить, что в результате неглубокого замораживания (0 °С) процессы обмена продолжают, происходит активация перекисного окисления липидов, и по мере снижения температуры до –25 °С эти процессы еще более интенсифицируются. В мембранах растительных клеток даже при –60 °С протекают динамические изменения, причем при –130 °С вероятны явления кристаллизации и перекристаллизации, исключающие возможность длительного хранения замороженного материала [15]. Для некоторых сельскохозяйственных культур выявлен порог влажности

семян, выше которого успешное криосохранение требует применения криопротекторов [8]. Весь метаболизм в клетках прекращается только в среде жидкого азота при температуре –196 °С.

Выявлена глубокая видоспецифичность реакции на замораживание семян растений разных видов, даже систематически близких или одного и того же вида [19, 17, 14, 8] из различных природных популяций или разных лет сбора [3].

Организация банков долговременного хранения природных фиторесурсов весьма актуальна, количество их растет быстро, а вопрос об оптимальном режиме хранения семян остается пока открытым. Криоконсервация как технологический приём весьма привлекательна практически полной остановкой метаболизма, но её широкому внедрению должны предшествовать массовые эксперименты по всесторонней физиологической оценке последствий [15].

Целью нашей работы являлось исследование влияния технологических режимов замораживания и оттаивания на всхожесть семян сосны и ели.

Для достижения поставленной цели были выполнены следующие задачи:

- проведен лабораторный анализ исходного качества семян хвойных пород, подлежащих экспериментальному замораживанию;
- определены посевные качества семян после замораживания их при различных температурных режимах;
- определены признаки повреждения семян при замораживании-оттаивании и их влияние на посевные качества.

В эксперименте были использованы семена ели европейской и сосны обыкновенной II класса качества 2012 года сбора. Перед началом исследований у семян определяли влажность по ГОСТ 13056.3-86 [5] и массу семян – весовым методом. Средний вес 1000 шт. семян ели составлял 7,00 г, сосны – 6,95 г, влажность – 7,5 и 7,0 % соответственно.

Всего было испытано 7 режимов замораживания-оттаивания (варианты опыта 1-7) в трех повторностях по 100 шт. в каждой. В качестве контроля использовали такие же семена без воздействия на них низкотемпературных режимов.

*Варианты 1-2.* В этих опытах замораживание проводилось без контроля скорости изменения температуры, путем погружения семян в хлопчатобумажных мешочках в жидкий азот ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) на 1 час, с последующим размораживанием при температуре  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  – в первом варианте – в воздушной среде, во втором – в водной.

В *вариантах 3-7* (табл. 1) проводилось контролируемое замораживание семян с использованием специального оборудования – CryoLogic FREEZE CONTROL CL8800. Морозильная система состоит из контроллера температуры, криогенной камеры и криогенной ванны с жидким азотом. Камера представляет собой программи-

руемое морозильное устройство, разработанное для замораживания и оттаивания биологических образцов с контролируемой скоростью изменения температуры ( $+40\text{...}-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). CL8800 может управляться с помощью компьютера или в режиме предварительного программирования. Образцы семян помещали в капилляры и устанавливали в криогенную камеру. Начальная температура опыта составляла  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , затем она в зависимости от варианта снижалась в течение определённого времени (продолжительность этапа) до заданного в программе значения и сохранялась (фиксировалась) на этом уровне какое-то время (если это было предусмотрено условиями опыта).

Таблица 1

Варианты контролируемых режимов замораживания и размораживания

Вариант опыта	Скорость процесса, $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$	Заданная температура, $^{\circ}\text{C}$	Продолжительность, мин	
			этапа	фиксации
3	4	-2	5,5	5
		-122	30,0	10
		-38,7	20,8	22
		+20	14,7	–
4	4	-2	5,5	5
		-98,3	24,0	31
		+20	29,6	–
5	–	-196	88,0	–
		-122	3,0	–
	2	+20	68,0	–
6	4	-40	15,0	30
		+20	15,0	–
7	4	-86	26,5	30
		+20	26,5	–

Энергию прорастания и всхожесть семян определяли в соответствии с ГОСТ 13056.6-97 [6], в качестве лабораторного оборудования использовали стол Якобсена [13].

Оценку и учёт проросших семян проводили на 5, 7, 10 и 15-е сутки после раскладки их на проращивание. Нормально проросшими считались семена, у которых развились

здоровые корешки длиной не менее самого семени.

По результатам учётов были рассчитаны энергия прорастания и лабораторная всхожесть. Статистический анализ производили с применением MS Excel 2007 [7]. Вычисляли следующие показатели: среднее значение ( $\bar{X}$ ) и его ошибка ( $m$ ). Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2

Показатели всхожести семян в зависимости от режимов замораживания-размораживания

Вариант	Энергия прорастания, %		Лабораторная всхожесть, %	
	$\bar{X} \pm m$	Разница с контролем	$\bar{X} \pm m$	Разница с контролем
<i>Ель европейская</i>				
1	48±11,6	-30	64±11,7	-15
2	57±2,4	-17	67±3,8	-11
3	68±3,3	-1	72±2,9	-4
4	67±1,7	-3	74±1,3	-1
5	63±1,6	-9	75±3,7	0
6	65±3,5	-6	73±2,5	-3
7	72±1,1	+4	79±1,1	+5
Контроль	69±2,1		75±1,1	
<i>Сосна обыкновенная</i>				
1	62±5,0	-16	86±0,5	-1
2	68±2,9	-8	76±3,4	-13
3	73±2,6	-1	88±2,2	+1
4	79±3,5	+6	91±2,7	+4
5	77±1,2	+4	88±0,6	+1
6	75±2,5	+1	85±0,0	-2
7	76±1,7	+3	89±2,1	+2
Контроль	74±4,3		87±2,4	



Рис. 1. Внешний вид семян сосны обыкновенной после выполнения вариантов 1 и 2.  
Фото Д. А. Шабунина

Кроме показателей всхожести были изучены признаки внешних повреждений в результате замораживания-оттаивания. У семян сосны в вариантах 1 и 2 в 80-90 % случаев произошло растрескивание оболочки (рис. 1).

Полученные повреждения не сказались на всхожести (рис. 2), однако из некоторых семян (около 1-2 %) развились аномальные проростки (рис. 3), которые впоследствии, при выращивании в грунте, погибли.



Рис. 2. Развитие проростков из семян сосны с растрескавшейся оболочкой (варианты 1 и 2).  
Фото Д. А. Шабунина



Рис. 3. Аномальное развитие проростка сосны обыкновенной из поврежденного семени (вариант 1). Фото Д. А. Шабунина

У семян ели повреждение оболочки наблюдалось лишь у единичных экземпляров, и в тех же вариантах опыта – № 1–2 (рис. 4).

При контролируемых режимах замораживания-оттаивания повреждение семенной

оболочки не происходило ни у сосны, ни у ели.

Такая разница воздействия на семена ели и сосны при одинаковых режимах замораживания-оттаивания требует дальнейшего изучения полученного эффекта.



Семя белого цвета – без семенной оболочки

Рис. 4. Семена ели европейской в варианте 1. Фото Д. А. Шабунина

По результатам исследования влияния на семена ели и сосны разных режимов замораживания-размораживания можно сделать следующие выводы:

– замораживание в жидком азоте без контроля скорости изменения температуры в течение опыта и размораживание при комнатной температуре как в воздушной, так и водной среде (варианты 1 и 2) у обеих пород приводит к заметному ухудшению показателей всхожести: у ели разница с контролем по энергии прорастания составляет 17-30 %, по лабораторной всхожести – 11-15 %, у сосны – 8-16 и 1-13 % соответственно. При этом у 80–90 % семян сосны происходит растрескивание оболочки (у ели доля таких семян незначительна и составляет 1-2 %);

– при программируемых режимах замораживания-размораживания у ели в большинстве вариантов (с 3 по 6), наблюдается незначительное ухудшение показателей всхожести относительно контроля – как по энергии прорастания

(на 1-9 %), так и по лабораторной всхожести (на 0-4 %); у сосны отклонение от контроля в разных вариантах опыта не всегда отрицательно: по энергии прорастания колебания составляют  $-1...+6$  %, по всхожести  $-2...+4$  %;

– у ели самое заметное превышение показателей всхожести над контролем (по энергии прорастания – 4, по лабораторной всхожести – 5 %) наблюдается в варианте 7 (замораживание до  $-86$  °C со скоростью  $4$  °C в минуту, с фиксацией на достигнутой температуре 30 мин и размораживание до  $20$  °C со скоростью  $4$  °C в минуту);

– у сосны самое заметное превышение показателей всхожести над контролем (по энергии прорастания – 6, по лабораторной всхожести – 4 %) наблюдается в варианте 4 (замораживание до  $-2$  °C со скоростью  $4$  °C в минуту с фиксацией на 5 мин и дальнейшее замораживание до  $-98,3$  °C со скоростью  $4$  °C в минуту с фиксацией на 30,9 мин и размораживание до  $20$  °C со скоростью  $4$  °C в минуту).

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. А. с. 1243645 Способ хранения семян косточковых растений / К.М. Сытник, Н.И. Даниляк, В.Д. Мануильский, Л.Е. Баршабова, С.А. Шевченко, В.И. Клименко. – № 3800968/30-15 ; заявл. 05.10.84 ; опубл. 15.07.84. – Бюл. № 26. – 4 С.



2. Википедия – свободная энциклопедия. Криоконсервация // Википедия – свободная энциклопедия / Википедия. – Электрон. дан. – Режим доступа: <http://ru.wikipedia.org/wiki/> – Загл. с экрана. – Яз. рус. – (Дата обращения: 28.08.2013).
3. Воронкова, Н.М. Морфобиологическая характеристика и реакция на криоконсервацию семян некоторых видов флоры Курильских островов / Н.М. Воронкова, А.Б. Холина, Ю.Н. Журавлев // Растительные ресурсы. – 2000. – Т. 36. – Вып. 4. – С. 40-47.
4. Воронкова, Н.М. Влияние температурного фактора и скарификации на прорастание семян и рост сеянцев семян *Sophora flavescens* Soland / Н.М. Воронкова, А.Б. Холина // Растительные ресурсы. – 2003. – Т. 39. – Вып. 1. – С. 43-49.
5. ГОСТ 13056.3-86 Семена деревьев и кустарников. Методы определения влажности. – Утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 26 августа 1986 г. № 2483. – М.: Издательство стандартов, 1986. – 15 С.
6. ГОСТ 13056.6-97 Семена деревьев и кустарников. Метод определения всхожести. – Введен в действие Постановлением Государственного комитета РФ по стандартизации, метрологии и сертификации от 12 марта 1998 г. № 48. – М.: ИПК Издательство стандартов, 1998. – 27 С.
7. Жигунов, А.В. Статистическая обработка материалов лесокультурных исследований / А.В. Жигунов, И.А. Маркова, А.С. Бондаренко // Учебное пособие. – СПб.: ЛТА, 2002. – 86 с.
8. Молодкин, В.Ю. Значение влажности семян некоторых зерновых и зерновых бобовых культур при криоконсервации в жидком азоте / В.Ю. Молодкин // Бюл. ВИР. – 1986. – № 165. – С. 22-24.
9. Николаева, М.Г. Справочник по проращиванию покоящихся семян / М.Г. Николаева, М.В. Разумова, В.Н. Гладкова. – Л.: Наука, 1985. – 348 С.
10. Пелевина, Н.Н. Использование энергии сверхвысоких частот при обработке урожая хвойных пород / Н.Н. Пелевина, М.А. Николаева // Тр. Санкт-Петербургского НИИ лесного хозяйства. – СПб, 2004. – С. 132-146.
11. Сафина, Г.Ф. Влияние низких и сверхнизких температур на жизнеспособность семян плодовых и ягодных растений / Г.Ф. Сафина // Вестник ВОГиС. – 2008. – Т. 12. – № 4. – С. 541-547.
12. Смирнов, И.А. Сохранение генетических ресурсов представителей сем. Fabaceae в банках семян / И.А. Смирнов, В.Л. Тихонова // Проблемы ботаники на рубеже XX-XXI веков: Тез. докл., представленных II(X) съезду РБО. – СПб. – 1998. – Т. 2. – С. 324.
13. Стол для пробного проращивания (стол Якобсена) // [lessnab.karelia.ru](http://lessnab.karelia.ru) / ООО «Лесснаб». – Электрон. дан. – Режим доступа: <http://www.lessnab.karelia.ru/recwood/table.pdf>. – Загл. с экрана. – Яз. рус. – (Дата обращения: 23.09.2013).
14. Тихонова, В.Л. Влияние низких и сверхнизких температур хранения на лабораторную всхожесть семян дикорастущих травянистых растений. 1. Семена без периода покоя / В.Л. Тихонова [и др.] // Криобиология. – 1990. – № 4. – С. 23-28.
15. Тихонова, В.Л. Долговременное хранение семян / В.Л. Тихонова // Физиология растений. – 1999. – Т. 46. – № 3. – С. 467-476.
16. Холина, А.Б. Влияние замораживания на прорастание семян некоторых видов Fabaceae флоры Дальнего Востока России // А.Б. Холина, Н.М. Воронкова // Растительные ресурсы. – 2001. – Т. 37. – Вып. 2. – С. 39-42.
17. Gresshoff, P. Cryopreservation of *Arabidopsis thaliana* and other seeds by storage in liquid nitrogen / P. Gresshoff, E. Gartner // *Arabidopsis Inform. Serv.* – 1977. – V. 14. – P. 12.
18. Harrington, J.F. Seed Storage and Longevity / J.F. Harrington // *Seed Biology.* – V. 3 / Ed. Kozlowski T.T. – N. Y.: Acad. Press, 1972. – P. 145-246.
19. Sakai, A. Some factors contributing to the survival of crop seeds cooled to the temperature of liquid nitrogen / A. Sakai, M. Noshiro // *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow.* – 1975. – P. 317.