

В.К. Мурсалиева¹, А.А. Иманбаева²¹Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан;²Мангышлакский экспериментальный ботанический сад, Актау, Казахстан
(E-mail: gen_mursal@mail.ru)

Повышение семенной всхожести аллохрузы качимовидной (*Allochrusa gypsophiloides*) методом криоконсервации

Представлены результаты оценки лабораторной всхожести семян аллохрузы качимовидной (*Allochrusa gypsophiloides*) в зависимости от условий их хранения в комбинации с обработкой гибберелловой кислотой. Выявлено, что контрольные семена характеризуются длительным периодом дозревания и скачкообразным характером прорастания в ходе хранения в обычных комнатных условиях. Установлено, что криоконсервация ускоряет дозревание семян, способствует синхронизации процесса прорастания и более дружному появлению всходов за более короткий период. При этом отмечается динамика всхожести депонированных семян без резких колебаний, и энергия прорастания сохраняется на одном уровне в течение всего срока хранения. Стимулирующий эффект гибберелловой кислоты на прорастание контрольных семян зависит от сроков хранения, и максимальный эффект (300 % к воде) отмечается на 7-й месяц, который к концу срока понижается до 215 %. Депонированные семена методом криоконсервации на протяжении всего срока хранения реагируют на индуцирующее действие ГК с максимальным показателем всхожести семян 246 % к концу срока хранения. На основании проведенных исследований авторами предложен способ, включающий этап криоконсервации и последующую предпосевную обработку семян ГК, который позволяет повысить семенную всхожесть ТМК и сохранить гермоплазму эндемичного вида без потери продуктивности семян.

Ключевые слова: аллохруза качимовидная (*Allochrusa gypsophiloides*), туркестанский мыльный корень, семенная всхожесть, гибберелловая кислота, криоконсервация.

Аллохруза качимовидная (*Allochrusa gypsophiloides* (Regel) Schischk.), туркестанский мыльный корень (ТМК) — эндемичный среднеазиатский вид из сем. *Caryophyllaceae* Juss., который с сокращающейся численностью занесен в «Красную книгу Казахстана» [1]. ТМК является одним из ценнейших технических и лекарственных растений, отличается повышенным содержанием в корнях тритерпеновых сапонинов олеанолового ряда с высокой поверхностной и гемолитической активностями [2]. Вид официально включен в отечественную фармакопею. Тритерпеновые сапонины ТМК входят в состав отхаркивающих, мочегонных, слабительных и тонизирующих средств, а также пероральных фитопрепаратов [3]. В недавних исследованиях выявлена высокая иммуностимулирующая, противовирусная [4], противоопухолевая [5] активность экстрактов ТМК, основанная на способности тритерпеновых сапонинов усиливать иммуногенность различных антигенов.

Последние экспедиционные исследования природных популяций ТМК выявили значительное сокращение площадей в пределах естественного ареала вида в результате хозяйственного освоения территории (под посевы сельскохозяйственных культур, выпас и сенокосение), что оказывает негативное влияние на семенное возобновление и жизненное состояние популяций редкого вида [6].

В естественных условиях ТМК размножается только семенами, которые формируются в основном у растений с пятилетнего возраста. Продуктивность семян низкая, и они характеризуются послеуборочным периодом дозревания, скачкообразным характером длительного прорастания и неравномерностью появления всходов, что является особенностью данной культуры и одним из способов сохранения семенного потомства от неблагоприятных условий произрастания [7].

В настоящее время в связи с истощением естественных зарослей ТМК особенно остро стоит вопрос о сохранении и введении эндемичного вида в культуру. В Казахстане первые опыты по интродукции показали возможность культивирования аллохрузы качимовидной в предгорной зоне Заилийского Алатау, а также целесообразность создания полупроизводственных и производственных посевов на юге Казахстана [7].

Одной из важных задач при введении дикорастущих видов в условия интродукции наряду с изучением биологических особенностей прорастания семян является оценка оптимальных условий хранения и приемов повышения их всхожести. Целью исследования являлись изучение влияния условий хранения и экзогенной обработки на лабораторную всхожесть *Allochrusa gypsophiloides* и разработка на этой основе способа повышения продуктивности семян.

Материалы и методы

Исходным материалом служили семена, собранные из естественных зарослей ТМК на территории Южно-Казахстанской области. Семена ТМК предварительно очищали от мусора и других примесей, отбирали только выполненные, неповрежденные семена. Отобранные семена хранили в пергаментных пакетах в обычных комнатных условиях в течение месяца до достижения ими равновесной влажности 5–10 %. После проверяли исходную семенную всхожесть путем проращивания в чашках Петри при 22 °С в условиях естественного освещения по 50 семян в трех повторностях на влажной фильтровальной бумаге. Лабораторная всхожесть не превышала 15 %, которую принимали за исходную всхожесть семян ТМК перед хранением в контрольных и опытных условиях. Контрольные условия хранения — семена выдерживали при комнатной температуре. Опытные условия — семена погружали в жидкий азот со сверхнизкой температурой (–196 °С). Контрольные семена — семена без предварительной обработки раскладывали в чашки Петри, на влажную фильтровальную бумагу. Опытные семена — семена перед проращиванием обрабатывали 0,01 % раствором гибберелловой кислоты (ГК) в течение суток, затем раскладывали в чашки Петри с фильтровальной бумагой.

Для хранения семян в условиях сверхнизких температур жидкого азота ортодоксальные семена по 60 шт. закладывали в криопробирки с соответствующими этикетками с указанием количества семян и датой закладки на хранение и помещали в криоконтейнеры, которые погружали в сосуды Дьюара с жидким азотом (–196 °С). Общая длительность криохранения составила год с поэтапным контролем всхожести семян через 3, 5, 7, 9, 12 месяцев депонирования. Перед проращиванием семена предварительно постепенно размораживали после жидкого азота в условиях холодильной камеры в течение 6 ч.

Всхожесть контрольных и опытных семян оценивали по отношению количества проросших на 9-й день семян к количеству заложенных на проращивание, выраженному в процентах. Проращивание семян проводили при температуре 22–24 °С при средней освещенности в чашках Петри на фильтровальной бумаге. Повторность опытов 3-кратная по 60 семян в каждой. Полученные данные обрабатывали стандартными биометрическими методами с вычислением средней арифметической, ошибки средней и достоверности по критерию Стьюдента при уровне значимости $p = 0,05$ [8].

Результаты и их обсуждение

Данные по всхожести у контрольных и опытных семян ТМК в зависимости от условий хранения представлены в таблице.

Т а б л и ц а

Лабораторная всхожесть семян ТМК различных сроков хранения в зависимости от температурного режима хранения и обработок регулятором роста ГК

Срок хранения, месяц	Контрольные семена		Опытные семена	
	Вода	ГК	ГК	ГК, % к контролю
Контрольные условия				
3	23,3 ± 5,8 ^a	17,5 ± 3,5 ^a		75
5	11,7 ± 5,8 ^{ab}	15,0 ± 7,1 ^a		128
7	12,5 ± 3,5 ^{ab}	37,5 ± 3,5 ^b		300
9	5,7 ± 1,2 ^b	12,5 ± 3,5 ^a		219
12	23,3 ± 12,6 ^{ab}	50,0 ± 0,7 ^b		215
Опытные условия (–196 °С)				
3	26,7 ± 7,6 ^a	20,0 ± 7,1 ^a		75
5	16,7 ± 2,9 ^a	37,5 ± 3,5 ^b		225
7	18,3 ± 7,6 ^a	27,5 ± 3,5 ^a		150
9	18,3 ± 2,9 ^a	22,5 ± 3,5 ^a		123
12	18,3 ± 10,4 ^a	45,0 ± 0,7 ^b		246

Примечание. а, б, в — достоверные отличия между вариантами в столбце при $p = 0,05$; ГК — гибберелловая кислота.

Выявлено, что семена ТМК, собранные из природных популяций, обладают 30 % чистой, относительно легкой массой 1000 шт. (1,9 г) и отрицательной всхожестью сразу после сбора. Прокле-

вывание на 6–9-й день после замачивания отмечалось у семян через два месяца после сбора, при этом всхожесть не превышала 15 %.

Анализ динамики лабораторной всхожести в обычных условиях комнатной температуры выявил скачкообразное прорастание семян в ходе годового хранения. Исходная всхожесть семян перед закладкой на хранение не превышала 15 %, через три месяца повышалась до 23 %. Далее в течение шести месяцев хранения всхожесть существенно не менялась и колебалась без достоверных отличий в пределах 11–12,5 %. При удлинении хранения до 9 месяцев всхожесть снижалась до 5,7 %, однако к концу срока всхожесть опять повышалась до исходного значения (рис. 1).

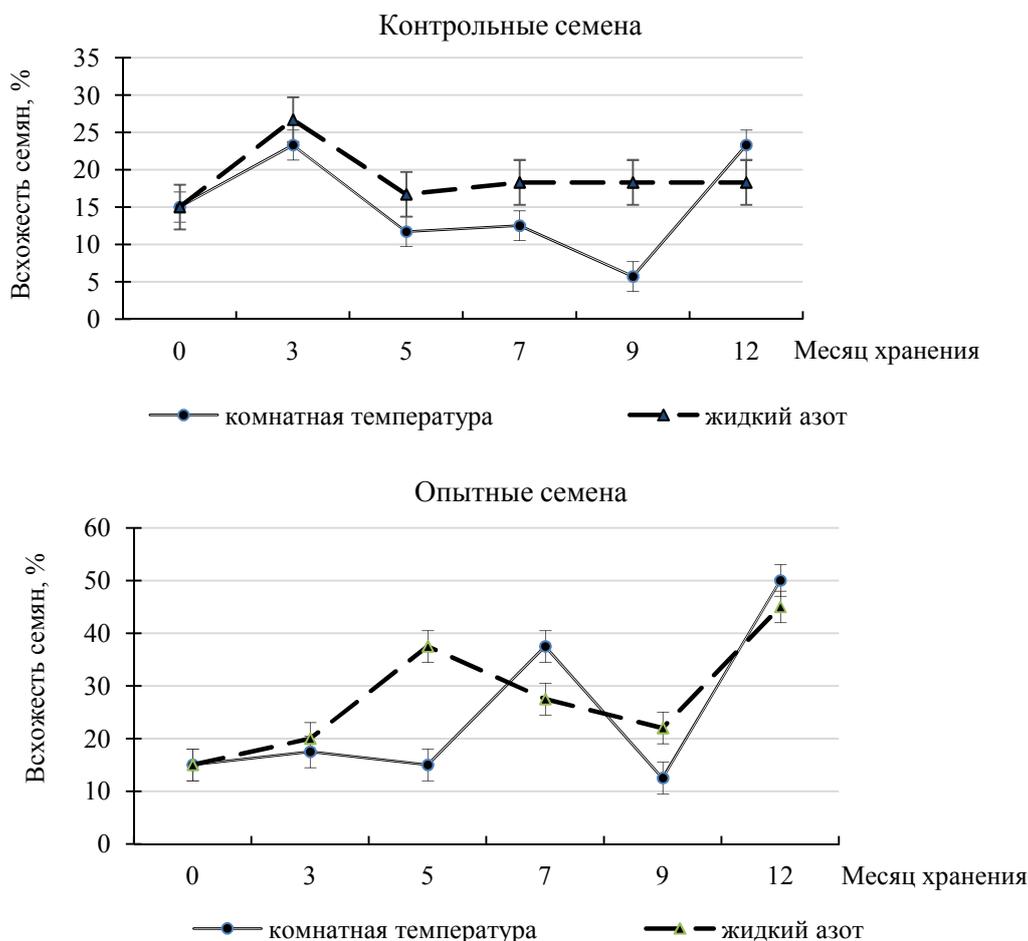


Рисунок 1. Динамика лабораторной всхожести контрольных и опытных семян в обычных условиях хранения (контроль) и сверхнизких температур жидкого азота

Аналогичная закономерность была выявлена в других исследованиях, в которых отмечалось постепенное повышение семенной всхожести ТМК с момента сбора до февраля, затем снижение показателя до минимального значения к июлю месяцу и последующий подъем [7].

Постепенное повышение прорастания свидетельствует о характерном для ТМК послеуборочном дозревании семян. Последующее понижение семенной всхожести, вероятно, обусловлено наступлением вторичного покоя семян, которое, возможно, связано с интоксикацией зародыша продуктами анаэробного дыхания.

Из графиков, приведенных на рисунке 1, видно, что кривая семенной всхожести при хранении в сверхнизкой температуре жидкого азота имеет такой же вид, что и в контроле, но без характерного для последнего резкого снижения всхожести на 9-й месяц хранения.

Динамика семенной всхожести при криоконсервации имела более плавный характер. Энергия прорастания этих семян сохранялась на одном уровне до конца срока хранения и по значениям прорастания не отличалась от контроля.

Анализ приведенных данных свидетельствует о том, что использование сверхнизкотемпературного режима хранения контрольных семян создает благоприятные условия для размягчения семенных оболочек, набухания семян и запуска физиологических процессов, приводящих к прорастанию, что способствует синхронизации прорастания семян, более дружному появлению всходов за более короткий период.

Выявлено влияние температурного режима хранения на эффективность действия регулятора роста ГК на семенную всхожесть. Достоверный стимулирующий эффект ГК выявлен в контрольных условиях хранения и при криохраниении к концу срока хранения (215 % и 246 % к контролю без обработки, соответственно).

Обработка ГК повышает всхожесть контрольных семян до 37,5 % на 7-й месяц хранения, тогда как у опытных семян стимулирующее действие регулятора роста проявляется на 5-й месяц криохраниения. При этом в контрольных условиях скачкообразный характер прорастания семян сохраняется, спускаясь до 15 % и 12,5 % на 5- и 9-й месяцы с последующим повышением до 50 % к концу срока хранения. В условиях хранения семян в жидком азоте кривая динамики всхожести после обработки ГК имеет более плавный характер. Всхожесть семян в течение всего срока хранения варьирует в пределах 20–45 %, в среднем составляя около 31 % (рис. 1).

Комбинирование оптимального режима хранения семян с предпосевной обработкой стимулятором роста ГК позволяет повысить всхожесть семян и сохранить показатели всхожести на одном уровне в течение всего периода хранения. Так, всхожесть контрольных семян в ходе хранения в условиях сверхнизких температур азота достоверно не отличалась и в среднем составляла 19,7 %. Семена с предпосевной обработкой ГК имели показатель всхожести выше контрольных в ходе всего срока хранения (рис. 2).

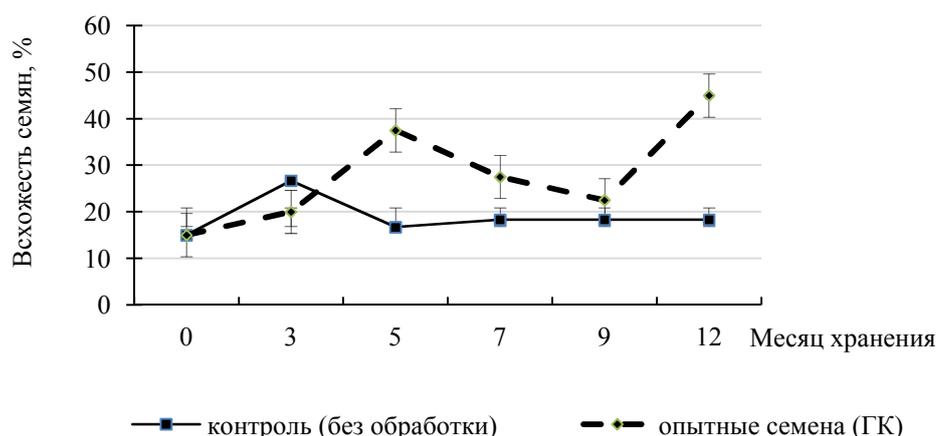


Рисунок 2. Влияние сверхнизкой температуры хранения жидкого азота на всхожесть контрольных и опытных семян ТМК

Таким образом, криоконсервация семян ТМК оказывает устойчивый положительный эффект на всхожесть семян от начала до конца срока хранения и позволяет сохранить гермоплазму эндемичного вида без потери всхожести.

Разработанный способ повышения семенной продуктивности ТМК, включающий хранение семян при температуре жидкого азота и их обработку 0,01 % ГК перед высевом, рекомендован для долгосрочного сохранения эндемичного вида и при проведении мероприятий по интродукции и реинтродукции эндемичного вида для дальнейшего рационального использования его генетических ресурсов в научно-практических целях.

Работа выполнена в рамках НТП на 2018–2020 гг. (№ BR05236506).

Список литературы

- 1 Список растений, занесенных в Красную книгу Казахстана. [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.nur.kz/1733395-redkie-rastenia-kazahstana-zanesennye-v-krasnuu-knigu.html>
- 2 Battger S. Triterpenoid saponins of the Caryophyllaceae and Illecebraceae family / S. Battger, M. Melzig // *Phytochemistry Letters*. — 2001. — Vol. 4, No. 2. — P. 59–68.
- 3 Грудзинская Л.М. Аннотированный список лекарственных растений Казахстана / Л.М. Грудзинская, Н.Г. Гемеджиева, Н.В. Нелина, Ж.Ж. Каржаубекова. — Алматы, 2014. — С. 55.
- 4 Алексюк П.Г. Стандартизация сапонинсодержащих препаратов, обладающих противовирусной активностью / П.Г. Алексюк, Е.С. Молдаханов, К.С. Аканова, Э.И. Анаркулова, А.П. Богоявленский // *Международ. журн. прикл. и фундамент. исслед.* — 2014. — № 6. — С. 80, 81.
- 5 Man S. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents / S. Man, W. Gao, Y. Zhang, L. Huang, C. Liu // *Fitoterapia*. — 2010. — Vol. 81(7). — P. 703–714.
- 6 Гемеджиева Н.Г. Оценка современного состояния природных популяций *Allochrusa gypsophiloides* (Regel) Schischk. в Южно-Казахстанской области / Н.Г. Гемеджиева, В.К. Мурсалиева, Т.М. Муханов // *Изв. НАН РК. Сер. биол. и мед.* — 2016. — № 1 (313). — С. 22–29.
- 7 Беспаяев С.Б. Колочелистник качимовидный в Казахстане: морфология, систематика, фитоценология, испытания в культуре: автореф. дис. ... канд. биол. наук: спец. 03.00.05 «Ботаника» / С.Б. Беспаяев. — Алматы, 1966. — 20 с.
- 8 Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. — М.: Наука, 1990. — 352 с.

В.К. Мурсалиева, А.А. Иманбаева

Криоконсервация эдісімен аллохрузаның (*Allochrusa gypsophiloides*) тұқымдық өнуін арттыру

Аллохрузаның (*Allochrusa gypsophiloides*) тұқымдарын гибберел қышқылымен сақтау шарттары бойынша зертханалық өнгіштігін бағалау нәтижелері ұсынылған. Бақылауда тұқымдардың ұзақ уақыт пісу кезеңімен және кәдімгі бөлме жағдайында сақтау барысында өсудің секіру сипатымен сипатталатыны анықталды. Криоконсервация тұқымның пісуін тездетеді, өсіп-өну процесін синхрондауға және қысқа мерзімде өскіндердің неғұрлым тату пайда болуына ықпал етеді. Сол кезде депониндық тұқымдардың күрт ауытқусыз өсуі байқалады және тұқымдардың өсу энергиясы сақтаудың бүкіл мерзімі ішінде бір деңгейде сақталады. Бақылау тұқымдарының өсуіне гибберелл қышқылының ынталандырушы әсері сақтау мерзіміне байланысты және максималды әсері (суға 300 %) 7 айға белгіленеді, ол мерзімнің соңына қарай 215 % — ға дейін төмендейді. Сақтау мерзімі бойы криоконсервациялау эдісімен сақтауға берілген тұқымдар сақтау мерзімінің соңында 246 % тұқымның өнгіштігінің ең жоғары көрсеткіші бар ГК индукциялық әсеріне ден қояды. Жүргізілген зерттеулер негізінде авторлармен криоконсервациялау кезеңі мен ТМК тұқымдық өнгіштігін арттыруға және тұқым өнімділігін жоғалтпай эндемиялық түрдегі гермоплазманы сақтауға мүмкіндік беретін ГК тұқымдарын кейіннен себу алдында өңдеу эдісі ұсынылды.

Кілт сөздер: аққанбақ түсті аллохруза (*Allochrusa gypsophiloides*), түркістан сабын тамыры, тұқым өнгіштігі, гибберел қышқылы, криоконсервация.

V.K. Mursaliyeva, A.A. Imanbayeva

Increasing seed germination of *Allochrusa gypsophiloides* by cryopreservation

Allochrusa gypsophiloides seeds germination data depending on storage conditions in combination with gibberellic acid treatment have presented. A long maturation period and spasmodic character of control seed germination during storage in the room conditions have revealed. Cryoconservation accelerated seed ripening and synchronized the germination process that led to uniform seedling emergence in a shorter period than in control. The seeds conserved in liquid nitrogen had the germination dynamic without sharp fluctuations and the seed germination energy stayed at the same level during the entire storage period. The stimulating effect of gibberellic acid on the germination of control seeds depended on the storage duration was established. The maximum increase (300 % to control) noted in 7 months storage, by the end of the year it lowered to 215 %. The seeds stored by the cryopreservation method reacted to the inducing GA action during the whole storage period. The maximum seed germination 246 % by the end of the storage period has noted. The authors proposed a method to increase *Allochrusa gypsophiloides* seed germination that includes cryopreservation and pre-sowing GA seed treatment. This technique allows maintaining the endemic species germplasm without seed productivity loss.

Keywords: *Allochrusa gypsophiloides*, Turkestan soap root, seed germination, gibberellic acid, cryopreservation.

References

- 1 Spisok rastenii, zanesennykh v Krasnuiu knihu Kazakhstana [List of plants listed in the Red Book of Kazakhstan]. *nur.kz*. Retrieved from: <https://www.nur.kz/1733395-redkie-rastenia-kazahstana-zanesennye-v-krasnuu-knigu.html> [in Russian].
- 2 Battger, S., & Melzig, M. (2001). Triterpenoid saponins of the Caryophyllaceae and Illecebraceae family. *Phytochemistry Letters*, 4, 2, 59–68.
- 3 Grudzinskaya, L.M., Gemedzhieva, N.G., Nelina, N.V., & Karzhaubekova, Zh.Zh. (2014). *Annotirovannyi spisok lekarstvennykh rastenii Kazakhstana [Annotated list of medicinal plants of Kazakhstan]*. Almaty [in Russian].
- 4 Alekseyuk, P.G., Moldakhanov, E.S., Akanova, K.S., Anarkulova, Je.I., & Bogoyavlenskii, A.P. (2014). Standartizatsiia saponinsoderzhashchikh preparatov, obladayushchikh protivovirusnoi aktivnostu [Standardization of saponin containing drugs with antiviral activity]. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamentalnykh issledovaniy — International Journal of Applied and Basic Research*, 6, 80–81 [in Russian].
- 5 Man, S., Gao, W., Zhang, Y., Huang, L., & Liu, C. (2010). Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia*, 81 (7), 703–714.
- 6 Gemedzhieva, N.G., Mursalieva, V.K., & Mukhanov, T.M. (2016). Otsenka sovremennoho sostoiianiia prirodnykh populiatsii *Allochrusa gypsophiloides* (Regel) Schischk. v Yuzhno-Kazakhstanskoi oblasti [Assessment of the current state of *Allochrusa gypsophiloides* (Regel) Schischk. natural population in the South-Kazakhstan region]. *Izvestiia NAN RK. Seriya biologicheskaya i meditsinskaya — News of The National Academy Of Science of the Republic Kazakhstan. Ser. Biol. and Med.*, 1(313), 22–29 [in Russian].
- 7 Bespaev, S.B. (1966). Koliuchelistnik kachimovidnyi v Kazakhstane: morfolohiia, sistematika, fitotsenolohiia, ispytaniia v kulture [*Allochrusa gypsophiloides* in Kazakhstan: morphology, systematics, phytocenology, tests in culture]. *Extended abstract of candidate's thesis*. Almaty [In Russian].
- 8 Lakin, G.F. (1990). *Biometriia [Biometrics]*. Moscow: Nauka [in Russian].