

Вплив кріоконсервації насіння на біохімічні показники проростків на початкових етапах розвитку

Е.Р. АРАПЕТЯН, М.Б. ГАЛАН, М. Р. ПАНАСЮК, Ю.М. УСАТЕНКО, А.П. ВАСЬКІВ
Львівський національний університет ім. Івана Франка

Насіння різних сортів гречки, яке знаходилося в рідкому азоті протягом двох тижнів, зберегло свою життєздатність. Ріст та розвиток проростків проходив без відхилень. Проаналізовано спектральні характеристики фотосинтезуючих пігментів. Антоціан, який міститься в проростках гречки, може бути маркером росту та розвитку рослин.

В ході розвитку суспільства виникає потреба у збереженні навколишнього середовища. Актуальним є збереження як біологічних систем в цілому, так біологічних індивідів зокрема. Одним з самих простих шляхів збереження генетичних ресурсів рослинного походження є банки насіння. Загальноприйнято для довготривалого збереження насіння використовувати температуру 4°C або -20°C. Такі умови збереження не завжди дають можливість зберегти життєздатність та енергію проростання досліджуваних видів. На даний час збереження в умовах рідкого азоту є альтернативним до традиційних методів збереження. Дослідження збереження рослинного матеріалу різних рівнів організації в умовах рідкого азоту є доволі молоді, хоча перша спроба збереження насіння в умовах рідкого водню була зроблена Тізелтон-Дайером в 1899 році. Для низьких видів рослин показана можливість кріоконсервації зі збереженням їх життєздатності та генетичної цілісності [14, 20]. На даний час в багатьох країнах світу створюються кріобанки для довготривалого збереження насіння сільськогосподарських культур, рідкісних (червонокнижних) видів рослин і тварин. Ми досліджували насіння гречки нових зеленоквіткових та антоціанмістких форм, які отримані шляхом індукованого мутагенезу насіння гречки (хімічних мутагенів і гамма-променів) в науководослідному інституті круп'яних культур Подільської державної аграрно-технічної академії (м. Кам'янець-Подільський). Ці нові сорти представляють велику цінність для селекції гречки [3]. Номери антоціанової групи характеризуються високим вмістом антоціанів у рослинах [1], що може бути використано для отримання екологічно чистого харчового барвника, попит на який є дуже високий на світовому ринку [19]. Сорт Рубра запропоновано для вирощування гречки за безвідходною технологією для отримання харчового барвника (вміст

барвника 3,87-4,41 мг/100г сухої речовини). Нові сорти гречки, які містять антоціани, в складних погодних умовах краще за інших адаптуються до навколишнього середовища. Рослини гречки містять пігмент антоціан [7]. Антоціани в гіпокотилі *Fagopyrum esculentum* локалізовані в епідермісі, субепідермальному шарі і декількох клітинах кори [17].

Антоціани – група речовин, які за хімічною природою відносяться до флавоноїдів [6]. Ще Ч. Дарвін зауважив, що мутанти диких видів, у яких відсутні антоціани, не є стійкими до різних захворювань. Антоціани характеризуються поліфункціональністю. Ці пігменти використовуються в харчовій, медичній, виноробній промисловостях. Локалізація антоціанів в органах рослин фундаментально представлена в оглядах [11, 24]. Генетичний аналіз забарвлення рослин, яке обумовлено наявністю антоціанів, проведено для багатьох рослин різних родин [23]. Утворення антоціанів та їх локалізація в органах рослин генетично детермінована [16, 25]. Тому антоціани використовуються як зовнішні маркери розвитку рослин ще з часів Г. Менделя. Колір рослин використовується в дослідженнях із фізіології рослин [9, 15], хемотаксономії вищих рослин [4]. Показано, що вони можуть бути маркерами зони диференціації коренів проростків кукурудзи при дії низьких позитивних температур [2]. Представляє інтерес використати утворення антоціану як маркеру розвитку насіння, яке перебувало в умовах рідкого азоту.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження було насіння нових сортів гречки. Зразки люб'язно надані Інститутом круп'яних культур, де зібрана світова колекція насіння гречки. Досліджувані сорти: Рубра, Зеленоквітова-90, Гілея, Олена, Арата, Алая зареєстровані Національним центром генетичних ресурсів рослин України. Життєздатність насіння гречки досліджувалось в різних умовах збереження [10,12]. Життєздатність насіння цих сортів після зберігання в рідкому азоті досліджується вперше. Насіння у контейнерах (епіндорфи) тримали у сосуді Дюара з рідким азотом протягом двох тижнів. Реконсервацію проводили при кімнатній температурі в лабораторних умовах протягом двох-трьох днів. Для визначення лабораторної схожості насіння замочували у дистильованій воді та пророщували

Адреса для кореспонденції: Арапетян Е.Р., Ботанічний сад Львівського національного університету ім. Івана Франка, вул. Мартовича 8/3, Львів 79005; e-mail: emarapetyan@yahoo.com

у кюветах на склі, обгорненому фільтрувальним папером. Кожен варіант висаджували у трьох-п'яти повторностях по 50 штук насіння. Контроль висаджували в аналогічних кількостях при однакових умовах проростання та подальшого розвитку. Проміри лінійних довжин проростків проводили щоденно протягом тижня. Також вимірювали довжину антоціанової частини кореня проростків. Вміст пігментів пластид визначали за стандартним методом в ацетонових екстрактах з сім'ядольних листових пластинок [13]. Вимірювання спектрів поглинання пігментів проводили в науково-технічному і навчальному центрі низькотемпературних досліджень Львівського національного університету. Для роботи використовували графковий монохроматор типу МДР-12. Джерелом світла служила галогенова лампа. Спектри реєстрували за допомогою фотоелектронного помножувача типу ФЕП-51. Вихідний сигнал записували і обробляли у подальшому за допомогою комп'ютера. Обрахунки проводили за формулою Хольм-Веттштейна. Антоціани екстрагували підкисленим етанолом [21]. Графік поглинання спектрів антоціанів зроблено на спектрофотометрі "Specord" М-40, який з'єднаний із комп'ютером. Вміст вологи в насінні визначали за загальноприйнятою методикою [8]. Аналіз росту та розвитку проростків проводили за Велінгтоном [5]. Отримані результати були оброблені за допомогою комп'ютерних програм ISISDraw2.3, Excel.

Результати і обговорення

Експериментальні дані росту та розвитку проростків з насіння гречки сорту Рубра, яке зберігалось протягом місяця в рідкому азоті, нами опубліковано [18]. Показано, що ультранизька температура не впливала негативно на схожість насіння, ріст та розвиток проростків гречки у порівнянні з контролем.

Насіння гречки досліджуваних сортів, яке перебувало в рідкому азоті, зберегло свою житте-

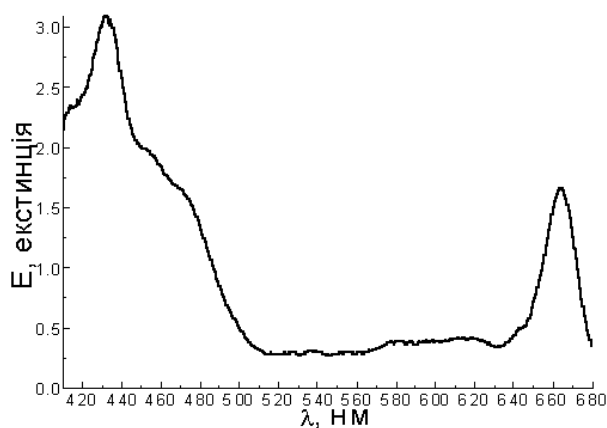


Рис.1. Графік спектру поглинання пігментів

здатність. Не відмічено пошкодження покривів. Всі органи рослин розвивалися нормально без пошкоджень, лінійні розміри коренів та надземних органів збільшувались. На коренях утворювались кореневі волоски для всіх сортів гречки, що свідчить про нормальний хід розвитку рослин. Деформованих та аномально розвинених проростків чи їх загнивання не відмічено. Сім'ядольні листки зеленого кольору повністю розгорталися на 3-4 день досліду і мали ширину 1 см. В наших дослідженнях насіння гречки мало 10% вологості. Відомо, що кількість вільної води в насінні є одним з головних факторів, який впливає на збереження життєздатності насіння, що знаходилось в рідкому азоті. Для досліджуваних сортів такий рівень вологості забезпечує збереження життєздатності насіння в умовах рідкого азоту. Для визначення концентрації пігментів використовували графіки екстинції (E) для кожного сорту відповідно, котрі, в свою чергу, були отримані із вихідних спектрів за допомогою пакету "Origin 7.5". Типовий вигляд графіку наводиться нижче (рис. 1), де величина E подана в одиницях натурального логарифма.

Дослідження вмісту фотосинтезуючих пігментів у сім'ядольних листках проростків різних сортів гречки виявило сортові особливості як по кількості кожного пігменту зокрема, так за їх сумарною кількістю (таблиця).

Для всіх сортів характерно зменшення кількості пігментів в дослідних варіантах у порівнянні з контролем. Для сорту Рубра, який характеризується найбільшим вмістом антоціанів, цієї закономірності не виявлено. Співвідношення пігментів носить інший характер. Для одних сортів (Зеленоквіткова і Арата) ця характеристика однакова в контролі та досліді. Для сорту Рубра відмічено достовірну різницю збільшення цього показника в досліді у порівнянні з контролем. Дослідження спектрів поглинання антоціанових пігментів в проростках гречки сорту Рубра показало, що максимуми поглинання контрольного та дослідного зразків однакові (рис.2) і відповідають максимуму поглинання ціанідину. Саме цей антоціан ідентифікований Jonesco у гречки [7].

Висновок

Це дозволяє нам зробити висновок, що насіння після збереження у рідкому азоті не змінило своєї характеристики. Натомість, кількість антоціанового пігменту у проростках з насіння, що зберігалось у рідкому азоті, зростає у порівнянні з контролем. В результаті проведених досліджень встановлена можливість збереження насіння нових сортів гречки в умовах рідкого азоту. Аномальних проростків не відмічено. Треба підкреслити, що лабораторна схожість досліджуваних сортів в

контролі відрізнялась. Насіння сортів Алая та Гілея мало дуже низьку схожість, зокрема насіння сорту Алая почало руйнуватись на другий-третій день проростання. Вага надземної маси проростків сорту Гілея невелика (7 гр.) у порівнянні з іншими сортами (Арата – 21,500, Олена – 14,750; Рубра – 12,800 гр.). Апікальна частина коренів сорту Гілея почала чорніти на третій день пророщування. Такі ж явища спостерігались і у проростків з насіння цих сортів після його консервації. Порівняльна характеристика вмісту фотосинтезуючих пігментів у проростках контрольних та дослідних варіантів різних сортів гречки свідчить про зменшення їх кількості у досліді на початкових етапах онтогенезу. Найкраща кріорезистентність показана для насіння сорту Рубра, який селекціонерам характеризують як найбільш стабільний та пластичний. На прикладі цього сорту можна зробити висновок, що антоціан можна використовувати як показник ідентичності росту та розвитку проростків дослідного та контрольного варіантів.

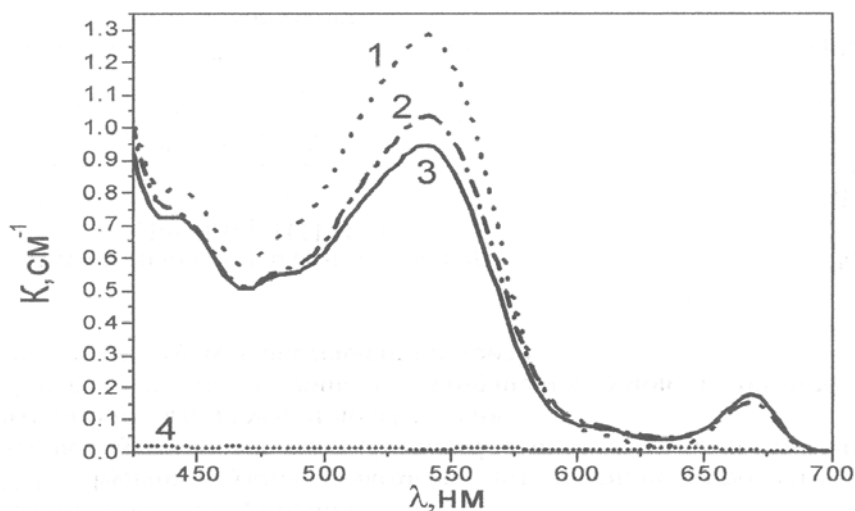


Рис. 2. Графік спектрів поглинання антоціанів гречки: 1 – рідкий азот; 2 – надвисокої частоти; 3 – контроль; 4 – етанол; $K_{cm^{-1}}$ – величина оптичного поглинання, λ – довжина хвилі.

Вміст фотосинтезуючих пігментів в проростках різних сортів гречки, насіння яких зберігалось у рідкому азоті, мг/г сирової маси

Назва сорту	Варіанти	Хлорофіл "а"	Хлорофіл "б"	Каротин	"а" + "б"	"а"/"б"
Зеленоквіткова	Контроль	10,867	4,271	3,283	15,138	2,544
	Дослід	7,802*	3,391*	2,528	11,19	2,301
Арата	Контроль	13,495	4,808	4,687	18,303	2,806
	Дослід	7,176*	2,542*	2,826	9,718	2,823
Олена	Контроль	12,275	2,781	5,462	15,056	4,414
	Дослід	9,921*	3,593*	3,409	13,514	2,823
Рубра	Контроль	6,376	1,347	3,035	7,723	4,733
	Дослід	6,992*	1,1096*	3,622	8,101	6,301
Гілея	Контроль	13,593	3,239	6,034	16,832	4,197
	Дослід	8,196*	2,348*	4,231	10,544	3,49

Примітка: * – вірогідна різниця по відношенню до контролю, $P \leq 0,05$

Література

1. Алексеева Е.С., Бочкарева Л.П. Формы гречихи с высоким содержанием антоцианов как исходный материал для селекции // Научно-техн. бюл. ВИР им. Вавилова. Вып. 219: Исходный материал для изучения селекции кукурузы, сорго и крупяных культур.– Санкт-Петербург, 1992.– С. 65-68.
2. Арапетян Э.Р., Кефели В.И., Хохлова В.А. Действие низких положительных температур на рост корня и coleoptила кукурузы в связи с образованием антоциана // Физиология и биохимия культурных растений.– 1985.– Т. 17, №4.– С. 329-334.
3. Алексеева Е.С. Культура гречихи: Ч. 2.– Кам'янець-Подільський: Мошак, 2005.– 240 с.
4. Благовещенский А.В., Александрова Е.Г. Биохимические основы филогении высших растений.– М.: Наука, 1974.– 100 с.
5. Веллингтон П.В. Методика оценки проростков семян. – Москва: Колос, 1973.– 174 с.
6. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений: Т.2.– Москва: Мир, 1986.– 312с.
7. Ермаков А.И., Княгиничев М.И., Мурри И.К. Биохимия культурных растений: Том 1.– Москва: Сельхозгиз, 1953.– С. 642-698.
8. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений.– Л.: Колос, 1972.– 458 с.
9. Кефели В.И., Амрайн Н. Начальные этапы роста гипокотыля гречихи // Физиология растений.– 1977.– Т. 24, №1.– С.118-125.
10. Кротов А.С. Продолжительность жизни семян гречихи в разных условиях хранения // Тр. по прикл.

- ботанике, генетике и селекции.– 1960.– Т.32, Вып.2.– С. 307-314.
11. *Любименко В.Н., Бриллиант В.А.* Окраска растений.– Л.: Государственное изд., 1924.– 280 с.
 12. *Молодкин В.Ю.* Методы консервации семян культурных растений при низких и сверхнизких температур: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук.– Л., 1987.– 18 с.
 13. *Полевой В.В.* Методы биохимического анализа растений.– Л.: Высшая школа, 1978.– 250 с.
 14. *Тихонова В.Л.* Стратегия мобилизации и сохранения генофонда редких и исчезающих видов растений.– Пущино, 1985.– 34с.
 15. *Тохвер А.* Накопление антоцианов в проростках как индикаторная реакция при изучении влияния света на растений: Тезисы докладов семинара по физиологии и биохимии фенольных соединений растений.– Тарту, 1972.– С.42-44.
 16. *Фадеева Т.С., Соснихина С.П., Иркаева Н.М.* Сравнительная генетика растений.– Ленинград: Ленинградский университет, 1980.– 246с.
 17. *Blank F.* Anthocyanins, flavones, xanthonnes / In: Encyclopedia of plant physiology. Ed. by W. Ruhland.– Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1958.– 300-333с.
 18. *Bondar V., Arapetyan E., Galan M. et al.* Protection of Plant Biodiversity *ex situ* with the help of Cryoconservation in West Ukraine // Planta Europa Conference.– 2004.– P. 5.
 19. *Carruba A, Calabrese I.* Vegetable extracts as natural sources of dyes // Plant biotechnology as a tool for the exploitation of mountain lands.– Torino, Italy, 1996.– P. 45.
 20. *Day J.G., McLellan M.R.* Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology.– Totowa (New Jersey): Humana Press, 1995.– 254 p.
 21. *Harborne J.B.* Spectral methods chaaracterising anthocyanins // Biochem. J.– 1958.– Vol. 70, N1.– P. 22-28.
 22. *Harborne J.B.* Ultraviolet spectroscopy of polyphenols / In: Methods in polyphenol chemistry.– Oxford, 1963.– P. 13-36.
 23. *Harborne J.B.* Comparative Biochemistry of the Flavonoids.– London, 1967.– 300 p.
 24. *Harborne J.B., Mabry T.I., Mabry A.* The flavonoids.– London: Champman and Hall, 1975.– 1204 p.
 25. *Nozzolillo C.* Anthocyanin pigments in pea seedlings: genetically controlled and environmentally influenced // Can. J. Botan.– 1978.– Vol. 56, N22.– P. 2890-2897.