

МОЖНО ЛИ ХРАНИТЬ СЕМЕНА В ЛЕДНИКАХ В ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЕ?

© 2020 г. Г. Е. Левицкая¹, *, С. В. Губин²

¹Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино, Россия

²Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, г. Пущино, Россия

*e-mail: levitskaya_g@mail.ru

Поступила в редакцию 08.06.2020 г.

После доработки 13.07.2020 г.

Принята к публикации 10.09.2020 г.

Изучено влияние хранения при различных температурных условиях (в бытовом леднике в слое вечной мерзлоты при температуре сезонно меняющейся от -35 до -8 , в морозильной камере при температуре -20 ± 2 и в холодильнике при 5 ± 1 °C) на ортодоксальные семена 16 дикорастущих видов (*Alyssum gmelinii* Jord., *Anemone sylvestris* L., *Arabis pendula* L., *Campanula rapunculoides* L., *Dianthus barbatus* Vandas, *D. fisheri* Spreng., *Hypericum hirsutum* L., *Iris sibirica* L., *Melica picta* C. Koch, *Pulsatilla patens* (L.) Mill., *Saponaria officinalis* L., *Silene alba* (Mill.) E.L. Krause, *S. dioica* (L.) Clairv., *S. nutans* L., *S. tatarica* (L.) Pers., *Vincetoxicum hirsutum* Medic.). Установлено, что сезонные изменения температуры в отрицательном диапазоне ($-35 \dots -8$ °C) ведут к быстрому снижению всхожести семян. В таких условиях семена стареют быстрее, чем при относительно стабильной температуре -20 ± 2 и 5 ± 1 °C. Показано, что семена разных видов растений обладают разной устойчивостью к хранению в условиях сезонно изменяющейся отрицательной температуры. Наименее устойчивы к хранению в леднике семена микробиотиков *Pulsatilla patens* и *Anemone sylvestris*, наиболее устойчивы – семена *Silene nutans*.

Ключевые слова: ортодоксальные семена, длительное хранение, всхожесть, дикорастущие виды, отрицательная температура, вечная мерзлота, колебания температуры

DOI: 10.31857/S0033994620040056

В настоящее время в мире насчитывается более 1700 банков семян, в которых хранится более 7 млн образцов [1]. Проблема длительного хранения жизнеспособных семян стала актуальной еще столетие назад и актуальность ее только растет в связи со снижением биологического разнообразия на нашей планете. В XX в. эта проблема решалась различными методами: уменьшением влажности семян, снижением температуры хранения, герметизацией и использованием инертных газов в качестве среды хранения для снижения интенсивности окислительных процессов. Во второй половине XX в., после изобретения рефрижераторов, для длительного хранения семян стали использоваться отрицательные температуры, в последней четверти XX в. начали изучать и применять ультранизкие температуры. Хранение в жидком азоте (-196 °C) или его парах ($-140 \dots -180$ °C) не только исключает метаболизм, но и более надежно обеспечивает стабильную температуру хранения по сравнению с рефрижераторами. Это направление сейчас активно развивается, несмотря на то, что информации о результатах длительного хранения семян при ультранизких температурах пока мало и она неоднозначна. Получены данные

о быстром старении семян некоторых видов при ультранизких температурах [2, 3].

Наиболее надежным и экономичным в настоящее время считается хранение семян с использованием естественных условий вечной мерзлоты. Возможность длительного, около 30 тыс. лет, сохранения живой ткани в условиях вечной мерзлоты доказано восстановлением растения методом культуры клеток из ткани фуникулуса плода *Silene* sp., извлеченного из погребенной норы суслика в Якутии [4, 5].

С 2008 г. на архипелаге Шпицберген на параллели около 76° с.ш. действует международное хранилище семян культурных видов растений, расположенное под скалой на глубине 40–60 м в многолетнемерзлых горных породах. Хранилище оборудовано рефрижераторами, обеспечивающими температуру хранения -18 °C. Расположение хранилища в условиях вечной мерзлоты даже при отказе в работе рефрижераторов обеспечит сохранение температуры ниже -3 °C. Хранилище рассчитано на 4.5 млн образцов семян, в 2018 г. количество хранящихся в нем образцов превысило 1 млн [6].

Таблица 1. Характеристики семян, хранившихся с 2003 по 2011 г.**Table 1.** Characteristics of the seeds stored from 2003 to 2011

Вид Species	Дата сбора Collection date	Длительность пребывания в комнатных условиях* до эксперимента, мес. Storage time in room conditions* before experiment, months	Масса 100 шт., мг 100-seed weight, mg	Влажность, % Moisture, %
<i>Alyssum gmelinii</i>	8.07.03	1	123	12.7
<i>Anemone sylvestris</i>	2.07.03	1	59	11.5
<i>Dianthus fisheri</i>	19.09.00	35	44	13.5
<i>Pulsatilla patens</i>	17.06.03	2	258	11.3
<i>Silene alba</i>	31.07.01	12	54	13.0
<i>Silene nutans</i>	7.08.01	12	24	12.6

Примечание. * – температура 18–24 °С (летом краткосрочно до 30 °С) и относительная влажность воздуха 15–50%.
Note. * – temperature 18–24 °С (short rise in summer up to 30 °С) and relative humidity 15–50%.

В 2013 г. в России на базе Института мерзлотоведения СО РАН в Якутии начало действовать федеральное криохранилище семян в толще многолетнемерзлых пород на глубине 9 м с воздушными охлаждающими устройствами конвективного действия. Поддержание в хранилище низкой температуры за счет охлаждения естественным потоком низкотемпературного воздуха в зимний период дает большой экономический эффект и не зависит от подачи электроэнергии [7].

Наши эксперименты по изучению влияния на жизнеспособность семян хранения в условиях отрицательных температур, обеспечиваемых природными факторами: вечной мерзлотой и климатом, были начаты в 2003 г., до организации названных криохранилищ. Местное население в Якутии для хранения продуктов использует так называемые “ледники” – глубокие, заходящие в слой многолетнемерзлых пород погреба-туннели, которые зимой открывают для большего охлаждения морозным воздухом. Эти ледники можно рассматривать как упрощенную модель Якутского криохранилища семян. Задачей работы было выяснить – можно ли использовать для длительного хранения семян такие ледники в условиях их традиционной эксплуатации с дополнительным зимним охлаждением.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для экспериментального хранения семян мы использовали ледник, находящийся в п. Черский на севере Якутии (65.5° с.ш.), имеющий глубину около 9 м. Температуру в леднике измеряли в 1999 и 2002 гг. ежемесячно. Она изменяется сезонно в зависимости от летнего прогрева и зимнего охлаждения грунта, а также зимнего охлаждения воздухом. В октябре, когда до глубины расположения ледника доходит волна летнего прогрева, температура может подниматься до –8 °С (макси-

мальное зафиксированное значение). Когда зимой ледник открывают для большего охлаждения воздухом, температура в нем может опускаться до –35 °С (минимальное зафиксированное значение). Среднегодовое значение температуры в леднике около –23 °С.

Семена 16 дикорастущих видов, относящихся к 12 родам из 8 семейств: перловник пестрый *Melica picta* С. Koch – сем. Poaceae, ирис сибирский *Iris sibirica* L. – сем. Iridaceae, гвоздика Борбаша *Dianthus borbasii* Vandas, гвоздика Фишера *D. fisheri* Spreng., мыльнянка обыкновенная *Saponaria officinalis* L., смолевка белая *Silene alba* (Mill.) E.L. Krause, смолевка двудомная *S. dioica* (L.) Clairv., смолевка поникшая *S. nutans* L., смолевка татарская *S. tatarica* (L.) Pers. – сем. Caryophyllaceae, ветреница лесная *Anemone sylvestris* L., прострел раскрытый *Pulsatilla patens* (L.) Mill. – сем. Ranunculaceae, бурачок Гмелина *Alyssum gmelinii* Jord., резуха повислая *Arabis pendula* L. – сем. Brassicaceae, зверобой жестковолосистый *Hypericum hirsutum* L. – сем. Hypericaceae, ластовень ласточкин *Vincetoxicum hirundinaria* Medic. – сем. Asclepiadaceae, колокольчик рапунцеливидный *Campanula rapunculoides* L. – сем. Campanulaceae – были собраны в природных сообществах в Серпуховском р-не Московской обл. Для эксперимента использовали как свежесобранные семена, так и семена, хранившиеся несколько лет в комнатных условиях при температуре 18–24 °С (летом краткосрочно до 30 °С) и относительной влажностью воздуха 15–50%. Искусственное подсушивание семян не применялось. Длительность пребывания семян в комнатных условиях приведена в табл. 1, 2.

Перед закладкой семян на хранение была определена их масса (среднее 3-х взвешиваний 100 штук), влажность (высушиванием при 105 °С, среднее 3-х проб).

Таблица 2. Характеристики семян, хранившихся с 2012 по 2015 г.
Table 2. Characteristics of seeds stored from 2012 to 2015

Вид Species	Дата сбора Collection date	Длительность пребывания в комнатных условиях* до эксперимента, мес. Storage time in room conditions* before experiment, months	Масса 100 шт., мг 100-seed weight, mg	Влажность, % Moisture, %
<i>Anemone sylvestris</i>	22.07.12	1	42	7.6
<i>Arabis pendula</i>	29.08.11	12	18	6.2
<i>Campanula rapunculoides</i>	16.09.11	11	13	7.5
<i>Dianthus borbasii</i>	12.07.12	1	20	10.2
<i>Hypericum hirsutum</i>	5.09.08	47	8	7.5
<i>Iris sibirica</i>	15.09.04	95	1206	6.9
<i>Melica picta</i>	25.06.10	26	241	7.6
<i>Pulsatilla patens</i>	23.05.12	3	232	7.7
<i>Saponaria officinalis</i>	15.09.11	11	163	8.2
<i>Silene dioica</i>	7.07.12	1	57	10.3
<i>Silene tatarica</i>	26.07.12	1	21	10.3
<i>Vincetoxicum hirundinaria</i>	4.08.11	12	668	6.2

Примечание. * – температура 18–24 °С (летом краткосрочно до 30 °С) и относительная влажность воздуха 15–50%.
 Note. * – temperature 18–24 °С (short rise in summer up to 30 °С) and relative humidity 15–50%.

Исходное качество семян оценивали по их лабораторной всхожести и динамике прорастания. Динамика прорастания является более чувствительным параметром старения семян по сравнению с их всхожестью. Проращивание семян осуществляли в чашках Петри на ватно-бумажных матрасиках. Увлажняли водопроводной водой с жесткостью около 8 мгэкв/л. Проращивали семена в соответствии с ранее разработанными и опубликованными рекомендациями по проращиванию семян изучавшихся видов [8]. Прорастание семян проверяли от 2 до 6 раз в неделю (в зависимости от вида), что дало возможность оценить динамику прорастания – скорость прорастания и ее изменения за время проращивания. Лабораторную всхожесть семян определяли на выборке 200 шт. – по 50 шт. в одной чашке Петри в 4-кратной повторности.

На хранение семена закладывались дважды в 2003 и 2012 гг., оба раза в августе. Параллельно первой партии семян, помещенной в лёдник, образцы семян хранились в лабораторных условиях в холодильнике при температуре 5 ± 1 °С, второй партии – в холодильнике при 5 ± 1 °С и в морозильнике при -20 ± 2 °С. Первая партия семян (6 видов) хранилась 8 лет, вторая (12 видов) – 3 года. Изначально эксперимент планировался на более длительный срок, но был прерван по техническим причинам. Семена двух видов (*Anemone sylvestris* и *Pulsatilla patens*) были в обеих партиях.

Для хранения семена были упакованы герметично в многослойную пластиковую упаковку.

После извлечения из лёдника они доставлялись для исследования в лабораторию в замороженном состоянии.

После указанных сроков хранения была определена лабораторная всхожесть и динамика прорастания семян по тем же, что и до хранения, методикам. Температура проращивания семян до и после хранения могла незначительно отличаться, условия освещенности могли отличаться существенно, так как семена проращивали при естественном освещении. Пробы семян конкретного образца, хранившихся в разных условиях определенного срока, проращивали одновременно в одинаковых условиях. Во всех случаях, до и после хранения, контролировал прорастание один специалист.

Достоверность различий значений всхожести по вариантам хранения попарно оценивали по критерию Стьюдента с уровнем достоверности 0.95. В таблицах представлены средние значения и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Семена, используемые в эксперименте, существенно – на 3 порядка значений различались по массе (табл. 1, 2). Влажность разных образцов семян была от 6.2 до 13.5% (табл. 1, 2), то есть все семена были ортодоксальными. Ортодоксальными называются семена, хорошо переносящие подсушивание, их влажность в воздушно сухом состоянии не более 15%.

Таблица 3. Изменение всхожести семян, хранившихся 8 лет (2003–2011 гг.) в лёднике* и в холодильнике при температуре $5 \pm 1^\circ\text{C}$ **Table 3.** Change in germination capacity of seeds stored for 8 years (2003–2011) in permafrost cellar* and refrigerator at $5 \pm 1^\circ\text{C}$

Вид Species	Всхожесть, % Germination capacity, %		
	исходная initial	после хранения 8 лет after storage for 8 years	
		в лёднике* in permafrost cellar*	при $5 \pm 1^\circ\text{C}$ at $5 \pm 1^\circ\text{C}$
<i>Alyssum gmelinii</i>	97.0 ± 1.7	36.5 ± 2.6	86.5 ± 3.0
<i>Anemone sylvestris</i>	64.0 ± 5.9	0	77.5 ± 2.5
<i>Dianthus fisheri</i>	86.5 ± 2.2	56.5 ± 2.1	81.5 ± 2.5
<i>Pulsatilla patens</i>	92.0 ± 3.3	0	61.5 ± 3.3
<i>Silene alba</i>	81.0 ± 2.9	59.0 ± 1.9	79.5 ± 1.6
<i>Silene nutans</i>	96.5 ± 2.4	83.0 ± 3.9	97.0 ± 0.6

Примечание. * – температура от -35°C зимой до -8°C в октябре.

Note. * – temperature from -35°C in winter to -8°C in October.

В результате 8-летнего хранения в лёднике снизилась всхожесть семян всех 6 видов (табл. 3). Семена *Anemone sylvestris* и *Pulsatilla patens* полностью утратили всхожесть. Всхожесть семян *Silene alba*, *Dianthus fisheri*, *Alyssum gmelinii* снизилась в 1.3–2.5 раза. При таком существенном изменении всхожести семян сравнивать динамику их прорастания не имеет смысла. Набухшие семена *A. gmelinii* не имели слизистой капсулы, которая есть у них в норме для обеспечения стабильной влажности набухших семян при нестабильной влажности окружающей среды. Проростки *A. gmelinii* хуже развивались по сравнению с проростками из семян, хранившихся при $5 \pm 1^\circ\text{C}$, были мелкими и желтыми. Лучше других сохранились в лёднике семена *Silene nutans*, но и у них выявлено статистически достоверное снижение всхожести на 14%. Ухудшилась динамика их прорастания: время прорастания 50% семян (T^{50}) – 8 дней было вдвое больше исходного значения T^{50} – 4 дня.

Хранившиеся в холодильнике при температуре $5 \pm 1^\circ\text{C}$ 8 лет образцы семян 4-х видов (*Anemone sylvestris*, *Dianthus fisheri*, *Silene alba*, *S. nutans*) сохранили динамику прорастания и всхожесть на уровне исходной. Всхожесть семян *Alyssum gmelinii* снизилась на 10%, T^{50} – 4 дня, против исходного T^{50} – 1 день. Всхожесть семян *Pulsatilla patens* снизилась в 1.5 раза.

Следует добавить, что по нашим данным, полученным в другом эксперименте, но с этими же образцами, семена данных 6 видов полностью сохранили всхожесть, динамику прорастания и качество проростков после 9-летнего хранения в морозильнике при $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ [3, 9].

В результате 3-летнего хранения в лёднике семена 12 видов на исходном уровне сохранили всхожесть и динамику прорастания семена 10 видов (табл. 4). Полностью утратили всхожесть семена *Pulsatilla patens*, почти полностью – *Hypericum hirsutum*.

Образцы семян всех видов, хранившиеся 3 года в морозильнике при температуре $-20 \pm 2^\circ\text{C}$, сохранили динамику прорастания и всхожесть на уровне исходной.

Образцы семян 11 из 12 видов, хранившиеся в холодильнике при температуре $5 \pm 1^\circ\text{C}$ сохранили динамику прорастания и всхожесть на уровне исходной, а всхожесть семян *Campanula rapunculoides*, имеющих физиологический покой, даже немного повысилась за счет уменьшения глубины покоя в процессе хранения.

Основное отличие условий хранения в морозильнике и лёднике заключалось в относительно стабильной температуре $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ в морозильнике и ее изменении в лёднике в течение года в диапазоне от -35 до -8°C . Очевидно, что такие колебания температуры в лёднике негативно повлияли на семена, ускорив их старение.

Мы намеренно использовали в эксперименте семена дикорастущих видов как более разнообразные по своим биологическим свойствам по сравнению с семенами культурных видов. Немногочисленные эксперименты по хранению семян ряда культурных видов в условиях вечной мерзлоты показали сохранение всхожести семян длительное время [10–16]. Однако, необходимо учитывать, что свойства семян большинства культурных видов растений – это результат длительного искусственного отбора в культуре, в том

Таблица 4. Изменение всхожести семян, хранившихся 3 года (2012–2015 гг.) в лёднике*, в морозильнике при температуре $-20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ и в холодильнике при температуре $5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ **Table 4.** Changes in germination capacity of seeds stored for 3 years (2012–2015) in permafrost cellar*, freezer at $-20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ and refrigerator at $5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

Вид Species	Всхожесть, % Germination capacity, %			
	исходная initial	после хранения 3 года after storage for 3 years		
		в лёднике* in permafrost cellar*	при $-20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ at $-20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	при $5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ at $5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$
<i>Anemone sylvestris</i>	49.0 ± 2.7	44.5 ± 7.0	44.5 ± 6.6	45.5 ± 2.6
<i>Arabis pendula</i>	43.0 ± 4.5	52.5 ± 13.7	50.0 ± 11.8	55.0 ± 10.0
<i>Campanula rapunculoides</i>	51.5 ± 4.0	46.0 ± 3.7	58.0 ± 5.9	68.5 ± 1.0
<i>Dianthus borbasii</i>	84.5 ± 1.0	85.5 ± 3.0	89.0 ± 1.3	87.5 ± 2.4
<i>Hypericum hirsutum</i>	97.5 ± 1.0	4.0 ± 1.4	95.0 ± 1.3	91.5 ± 2.9
<i>Iris sibirica</i>	89.5 ± 2.6	87.0 ± 2.6	88.5 ± 1.0	89.0 ± 1.9
<i>Melica picta</i>	81.0 ± 6.6	95.0 ± 1.2	90.5 ± 2.8	89.0 ± 2.4
<i>Pulsatilla patens</i>	85.0 ± 5.8	0	81.5 ± 3.3	84.0 ± 3.8
<i>Saponaria officinalis</i>	98.0 ± 0.8	90.5 ± 2.6	94.0 ± 0.8	86.5 ± 4.6
<i>Silene dioica</i>	76.0 ± 1.4	70.5 ± 3.6	74.0 ± 3.6	80.0 ± 2.5
<i>Silene tatarica</i>	98.5 ± 1.0	98.0 ± 0.8	100	100
<i>Vincetoxicum hirundinaria</i>	58.5 ± 2.0	63.0 ± 3.9	64.0 ± 4.1	58.5 ± 1.0

Примечание. * – температура от $-35 \text{ }^\circ\text{C}$ зимой до $-8 \text{ }^\circ\text{C}$ в октябре.Note. * – Temperature from $-35 \text{ }^\circ\text{C}$ in winter to $-8 \text{ }^\circ\text{C}$ in October.

числе по признаку скорости старения при хранении в условиях сезонно изменяющейся температуры. Результаты многолетнего хранения семян как при низкой положительной, так и при отрицательной температуре в условиях вечной мерзлоты показали, что семена основных зерновых злаков и бобовых, введенных в культуру сотни лет назад хранятся лучше, чем семена кормовых злаков и бобовых, введенных в культуру в прошлом веке [10, 12, 17]. Имеются данные, что семена малораспространенных видов культурных растений хранятся значительно хуже семян их более часто используемых сородичей [17]. Это может быть объяснено тем, что более частое использование каких-либо видов дает больше возможностей для спонтанного мутагенеза и, соответственно, отбора по хозяйственно полезным признакам, в том числе, скорости старения.

Биологические свойства семян дикорастущих видов, в том числе скорость их старения в разных условиях, очень слабо изучены. Поэтому созданию банков семян дикорастущих, особенно редких видов, должно предшествовать изучение возможности сохранения ими жизнеспособности в различных условиях семенных хранилищ.

Наименее устойчивыми к длительному хранению в условиях колеблющейся отрицательной температуры в лёднике оказались семена *Pulsatilla patens*. В тоже время семена этого вида сохраняют всхожесть при температуре хранения $5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ до

3-х лет хранения (табл. 4), всхожесть начинает снижаться позже. Следует отметить, что для обоих экспериментов использовали свежесобранное семя *P. patens* (табл. 1, 2), то есть не было значительного срока предварительного хранения в неконтролируемых (теплых, комнатных) условиях. Хранение семян в таких условиях, как известно [3, 17–19], ускоряет старение при их последующем длительном хранении в условиях низких температур.

Так же очень неустойчивы к хранению в условиях колеблющейся отрицательной температуры семена *Hypericum hirsutum*, которые почти полностью утратили всхожесть в результате 3-летнего хранения в лёднике, но полностью сохранили всхожесть после хранения при температуре $5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ и $-20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Ранее нами было выявлено изменение динамики прорастания и снижение всхожести семян этого вида после 6-летнего хранения при температуре $-20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$; после хранения при температуре $5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ тот же срок эти показатели сохранились на исходном уровне [20]. Следовательно, на семена этого вида негативно влияет как стабильная отрицательная температура, так, в еще большей степени, изменяющаяся в течение года отрицательная температура хранения. Следует отметить, что для эксперимента использовали семя *H. hirsutum*, до того долго находившееся в комнатных условиях (табл. 2), что также могло сказаться на скорости старения в эксперименте.

Несколько более устойчивы к хранению в лёднике семена *Anemone sylvestris*. Они сохранили всхожесть на уровне исходного значения после 3 лет, но полностью утратили ее после 8 лет хранения (табл. 3, 4). При других температурных условиях хранения ($5 \pm 1^\circ\text{C}$ и $-20 \pm 2^\circ\text{C}$) всхожесть семян сохранилась на исходном уровне после 3 и 8 лет хранения. Для обоих экспериментов использовались свежесобраннные семена этого вида (табл. 1, 2). *Anemone sylvestris* и *Pulsatilla patens* являются микробиотиками, то есть видами, семена которых быстро теряют всхожесть в теплых (комнатных) условиях. Результаты наших опытов подтвердили логичное предложение [12] тестировать хранилища на пригодность для длительного хранения семян не на культурных растениях — макро- и мезобиотиках, а на микробиотиках (классификация видов по долголетию семян по А.Д. Еwart [21]).

Для выявления видов семян, устойчивых к длительному хранению в условиях отрицательной температуры с сезонными колебаниями, 3 года хранения явно недостаточно. Ранее было выявлено, что ортодоксальные семена многих видов сохраняют жизнеспособность 3 года, хранясь в различных температурных условиях (-196 , -20 , 5°C). Снижение всхожести семян начинается после более длительных сроков хранения [3, 9, 20]. Эксперимент по 8-летнему хранению семян 6 видов в лёднике показал, что наиболее устойчивыми к таким условиям хранения являются семена *Silene nutans* (табл. 3). На основании работы по восстановлению растения *Silene* sp. из живой ткани семян, пребывавших в условиях вечной мерзлоты около 30 тыс. лет [4, 5] и представленных нами данных, можно предположить, что семена некоторых видов р. *Silene* обладают повышенной устойчивостью к хранению в условиях отрицательной температуры с сезонными колебаниями.

Следует отметить, что семена, использованные в эксперименте, имели довольно высокую для ортодоксальных семян влажность от 6.2 до 13.5% (табл. 1, 2). Наиболее устойчивые к хранению в лёднике семена *Silene nutans* имели влажность 12.6%. Наименее устойчивые семена *Pulsatilla patens* имели влажность в первом опыте 11.3%, во втором — 7.7%, то есть меньше, чем у семян *S. nutans*. В обоих опытах хранившиеся в лёднике семена *P. patens* полностью утратили всхожесть. Следовательно, оптимальная для хранения семян влажность собственная у каждого вида и эта влажность может быть относительно высокой, существенно выше 5–7%-ного значения влажности, рекомендуемого стандартами генных банков для длительного хранения семян культурных видов [22].

При созревании ортодоксальных семян их влажность снижается до 3–15%, что обеспечивает сильное замедление метаболизма и, соответ-

ственно, возможность длительное время сохраняться живыми. Устойчивость клеток семян к обезвоживанию обеспечивается содержащимися в них растворимыми сахарами, LEA-протеинами (Late Embryogenesis Abundant proteins), sHSPs-протеинами (small Heat Shock Proteins), наличием механизма нейтрализации активных форм кислорода и витрификацией клеточного матрикса — формированием внутриклеточного стекла [23]. Продолжительность жизни семян коррелирует со свойствами внутриклеточного стекла [18], которые определяются LEA- и sHSPs-протеинами. Основные функции LEA-протеинов, синтезирующихся на последних стадиях созревания семян — повышение температуры стеклования, связывание воды, стабилизация биологических мембран, поддержание структуры макромолекул, защита ферментов, поддержание окислительного баланса. sHSPs-протеины противостоят окислительному стрессу в условиях водного дефицита, участвуют в сборке и стабилизируют вторичную структуру протеинов [23, 24]. Можно предположить, что семена микробиотиков отличаются от семян мезо- и макробиотиков количеством и/или спектром LEA- и sHSPs-протеинов.

Благодаря низкому содержанию воды уже при наблюдающихся в комнатных условиях температуре и влажности, клеточный матрикс ортодоксальных семян находится в витрифицированном состоянии, но свойства внутриклеточного стекла зависят от температуры [18, 25]. В витрифицированном клеточном матриксе, в том числе при отрицательных по шкале Цельсия температурах, сохраняются колебательные и вращательные движения макромолекул или их частей. Молекулярная подвижность является важным фактором регуляции физиологической активности в семенах, такой как дозревание (выход из состояния физиологического покоя) и старения семян [25]. Колебания температуры изменяют молекулярную подвижность, делают ее неравномерной. Это, вероятно, ускоряет деградацию биополимеров, в первую очередь протеинов, что ведет к ускорению старения семян.

Таким образом, использование для хранения семян лёдников в вечной мерзлоте с большой амплитудой сезонных колебаний отрицательной температуры, вызывает серьезные сомнения. Полученные результаты свидетельствуют, что при организации долговременных хранилищ семян, в том числе в условиях вечной мерзлоты, необходимо особое внимание уделять стабилизации температуры хранения. В связи с этим возникает вопрос о возможности обеспечения стабильной температуры в хранилище в конвекционном типом охлаждения. В первый год эксплуатации Якутского криохранилища температура в нем изменялась от -20 до -2°C [26: 40; рис. 3.5]. Исследователи, изучавшие возможность управления

температурным режимом в Якутском криохранилище, подчеркивают “неизбежность годичных колебаний температуры в рабочих камерах при охлаждении криохранилища атмосферным воздухом” [26: 39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты экспериментов по хранению ортодоксальных семян 16 дикорастущих видов в леднике в вечной мерзлоте с дополнительным охлаждением зимним воздухом и меняющейся в течение года температурой от -35 до -8 °C, в морозильнике при температуре -20 ± 2 °C и в холодильнике при температуре 5 ± 1 °C показали, что

семена быстрее теряют всхожесть при изменяющейся отрицательной температуре хранения, чем при других условиях экспериментального хранения. Значительные колебания отрицательной температуры старят семена быстрее, чем даже хранение при низкой положительной, но стабильной температуре.

Семена разных видов растений обладают разной устойчивостью к хранению в условиях сезонно изменяющейся отрицательной температуры. Наименее устойчивы к хранению в леднике семена микробиотиков: *Pulsatilla patens* и *Anemone sylvestris*, наиболее устойчивы семена *Silene nutans*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дзюбенко Н.И. 2012. Вавиловская стратегия пополнения, сохранения и рационального использования генетических ресурсов культурных растений и их диких родичей. — Тр. по прикладн. ботанике, генетики и селекции. СПб.: ВИР. 169: 4–40. http://vir.nw.ru/books/trud_169.pdf
2. Walters C., Wheeler L.M., Stanwood P.C. 2004. Longevity of cryogenically-stored seeds. — *Cryobiol.* 48: 229–244. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.01.007>
3. Левицкая Г.Е. 2015. Влияние температуры хранения на семена дикорастущих видов. 2. Семена с физиологическим покоем на примере видов рода *Campanula* (Campanulaceae). — *Раст. ресурсы.* 51(1): 38–51. <http://elibrary.ru/item.asp?id=22740094>
4. Яшина С.Г., Губин С.В., Шабаева Э.В., Егорова Е.Ф., Максимович С.В. 2002. Жизнеспособность семян высших растений позднеплейстоценового возраста из вечномерзлотных отложений, обнаруживаемая в культуре *in vitro*. — Доклады Академии Наук. 383(5): 714–717. <https://doi.org/10.1023/A:1015350209946>
5. Yashina S., Gubin S., Maksimovich S., Yashina A., Gakhova E., Gilichinsky D. 2012. Regeneration of whole fertile plants from 30000-y-old fruit tissue buried in Siberian permafrost. — *PNAS.* 109 (10): 4008–4013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118386109>
6. Asdal Å., Guarino L. 2018. The Svalbard Global Seed Vault: 10 Years – 1 Million Samples. — *Biopreserv. Biobank.* 16(5): 391–392. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0025>
7. Соломонов Н.Г., Жимулев И.Ф. 2014. Как это было: к истории создания криобанка семян культурных растений в толще многолетнемерзлотных пород. — В кн.: Криохранение семян: итоги и перспективы. Новосибирск. С. 7–16. <https://e.nlrs.ru/open/11817>
8. Левицкая Г.Е. 2009. Биологические характеристики семян представителей флоры южного Подмосковья и их реакция на криоконсервацию. — *Раст. ресурсы.* 45(3): 9–30. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=17023559>
9. Левицкая Г.Е. 2017. Влияние температуры хранения на семена дикорастущих видов. 3. Семена с морфологическим и морфофизиологическим покоем. — *Раст. ресурсы.* 53(1): 39–50. <http://elibrary.ru/item.asp?id=28949836>
10. Сторожева Н.Н. 2006. Влияние длительного хранения семян сельскохозяйственных культур в условиях толщ многолетнемерзлых грунтов на жизнеспособность и фенотипическую изменчивость растений. — Автореф. дисс. ... канд. с.-х. наук. Якутск. 22 с.
11. Кершенгольц Б.М., Жимулев И.Ф., Гончаров Н.П., Чжан Р.В., Филиппова Г.В., Шейн А.А., Прокопьев И.А. 2012. Сохранение генофонда растений в условиях многолетней мерзлоты: состояние, преимущества, перспективы. — Вавиловский журн. генетики и селекции. 16 (3): 675–682. http://www.bionet.nsc.ru/vogis/pict_pdf/2012/16_3/015.pdf
12. Филиппенко Г.И., Силаева О.И., Сторожева Н.Н. 2012. Использование вечной мерзлоты с целью сохранения генетических ресурсов растений. — Тр. по прикладн. ботанике, генетики и селекции. 169: 240–244. http://vir.nw.ru/books/trud_169.pdf
13. Журавская А.Н., Филиппова Г.В., Кершенгольц Б.М., Чжан Р.В. 2014. Всхожесть, биохимические и цитогенетические характеристики проростков после долговременного хранения гороха в условиях вечной мерзлоты. — С.-х. биология, сер. “Биология раст.” 1: 72–78. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2014.1.72rus>
14. Сторожева Н.Н. 2018. Рост и развитие однолетних кормовых культур в первые годы длительного хранения в криохранилище. — Вестн. Марийского гос. ун-та, сер. “Сель-хоз. науки. Эконом. науки”. 4 (4): 57–64. <https://doi.org/10.30914/2411-9687-2018-4-4-57-64>

15. Brodal G., Asdal Å. 2018. The Svalbard Global Seed Vault and the ongoing 100 years seed storage experiment. — *Acta Hort.* 1204: 1–8.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1204.1>
16. Иванова И.В., Гурьева К.Б., Белецкий С.Л. 2019. Длительное хранение семян в условиях вечной мерзлоты. — *Товаровед продовольственных товаров*. 1: 61–64.
<https://panor.ru/articles/dlitelnoe-khranenie-semyan-v-usloviyakh-v-vechnoy-merzloty/4003.html>
17. Сулаева О.И. 2012. Хранение коллекции семян мировых растительных ресурсов в условиях низких положительных температур — оценка, состояние, перспективы. — *Тр. по прикладн. ботанике, генетики и селекции*. 169: 230–239. http://vir.nw.ru/books/trud_169.pdf
18. Walters C., Hill L.M., Wheeler L.J. 2005. Dying while dry: kinetics and mechanisms of deterioration in desiccated organisms. — *Integr. Comp. Biol.* 45(5): 751–758.
<https://doi.org/10.1093/icb/45.5.751>
19. Probert R., Adams J., Coneybeer J., Crawford A., Hay F. 2007. Seed quality for conservation is critically affected by pre-storage factors. — *Australian Journal of Botany*. 55(3): 326–335.
<https://doi.org/10.1071/BT06046>
20. Левицкая Г.Е. 2014. Влияние температуры хранения на семена дикорастущих видов. 1. Семена с вынужденным покоем и неглубоким физиологическим покоем. — *Раст. ресурсы*. 50(4): 534–584.
<https://www.elibrary.ru/item.asp?id=22260668>
21. Ewart A. J. 1908. On the longevity of seeds. — *Proc. R. Soc. Victoria*. 21: 1–210.
22. Genebank Standards. 1994. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 13 p.
<http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/meeting/015/aj680e.pdf>
23. Kalemba E., Pucacka S. 2007. Possible roles of LEA proteins and sHSPs in seed protection: a short review. — *Biological Lett.* 44(1): 3–16. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.607.2377&rep=rep1&type=pdf>
24. Tunnacliffe A., Michael T.W. 2007. The continuing conundrum of the LEA proteins. — *Naturwissenschaften*. 94(10): 791–812.
<https://doi.org/10.1007/s00114-007-0254-y>
25. Ballesteros D., Walters C. 2011. Detailed characterization of mechanical properties and molecular mobility within dry seed glasses: relevance to the physiology of dry biological systems. — *The Plant Journal*. 68(4): 607–619.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04711.x>
26. Кузьмин Г.П., Панин В.Л. 2014. Основные результаты управления температурным режимом федерального криохранилища I очереди в г. Якутск. — В кн.: *Криохранилище семян: итоги и перспективы*. Новосибирск. С. 34–41. <https://e.nlrs.ru/open/11817>

Can the Seeds Be Stored in Permafrost Cellars?

G. E. Levitskaya^{a,*}, S. V. Gubin^b

^a*Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Russia*

^b*Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science RAS, Pushchino, Russia*

*e-mail: levitskaya_g@mail.ru

Abstract—This study evaluates the effect of different storage conditions (in permafrost cellar with additional air cooling in winter at seasonally changing temperature from -35°C to -8°C , in a freezer at $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and in a refrigerator at $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$) on the quality of orthodox seeds of 16 wild species (*Alyssum gmelinii* Jord., *Anemone sylvestris* L., *Arabis pendula* L., *Campanula rapunculoides* L., *Dianthus borbasii* Vandas, *D. fisheri* Spreng., *Hypericum hirsutum* L., *Iris sibirica* L., *Melica picta* C. Koch, *Pulsatilla patens* (L.) Mill., *Saponaria officinalis* L., *Silene alba* (Mill.) E.L. Krause, *S. dioica* (L.) Clairv., *S. nutans* L., *S. tatarica* (L.) Pers., *Vincetoxicum hircynicum* Medic.). It was established that seasonal sub-zero temperature fluctuations ($-35\text{...}-8^{\circ}\text{C}$) led to fast seed aging and reduction of germination capacity. Under such conditions, the seeds aged faster than at relatively stable temperatures of $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$. It was shown that the seeds of different species have different storage stability under seasonally changing sub-zero temperatures. Seeds of microbotic *Pulsatilla patens* and *Anemone sylvestris* were the least resistant to storage in the permafrost cellar; seeds of *Silene nutans* were the most resistant. It has been suggested that temperature fluctuations change the molecular mobility in the vitrified cell matrix of seeds, making it irregular. This probably hastens the degradation of biopolymers leading to acceleration in seed aging. Microbotic seeds may differ from meso- and macrobotic seeds in the number and/or spectrum of LEA- and sHSPs-proteins that determine the properties of intracellular glass.

Keywords: orthodox seeds, long-term storage, germination, wild species, sub-zero temperature, permafrost, temperature fluctuations

REFERENCES

1. *Dzyubenko N.I.* 2012. Vavilov strategy of collecting, maintaining and rational utilization of plant genetic resources of cultivated plants and their wild relatives. – Proceedings on applied botany, genetics and breeding. St. Petersburg. 169: 4–40. http://vir.nw.ru/books/trud_169.pdf (In Russian)
2. *Walters C., Wheeler L.M., Stanwood P.C.* 2004. Longevity of cryogenically-stored seeds. – *Cryobiol.* 48: 229–244. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.01.007>
3. *Levitskaya G.E.* 2015. The influence of the storage temperature on the seeds of wild species. 2. Seeds with physiological dormancy in the case of *Campanula* (Campanulaceae) species. – *Rastitelnye Resursy.* 51(1): 38–51. <http://elibrary.ru/item.asp?id=22740094> (In Russian)
4. *Yashina S.G., Gubin S.V., Shabaeva E.V., Egorova E.F., Maksimovich S.V.* 2002. Viability of higher plant seeds of late pleistocene age from permafrost deposits as determined by *in vitro* culturing. – *Dokl. Biol. Sci.* 383: 151–154. <https://doi.org/10.1023/A:1015350209946> (In Russian)
5. *Yashina S., Gubin S., Maksimovich S., Yashina A., Gakhova E., Gilichinsky D.* 2012. Regeneration of whole fertile plants from 30000-y-old fruit tissue buried in Siberian permafrost. – *PNAS.* 109 (10): 4008–4013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118386109>
6. *Asdal Å., Guarino L.* 2018. The Svalbard Global Seed Vault: 10 Years – 1 Million Samples. – *Biopreserv. Biobank.* 16(5): 391–392. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0025>
7. *Solomonov N.G., Zhimulev I.F.* 2014. [How it was: to the history of the creation of cultivated plants seeds cryobank in the thickness of permafrost.] – In: *Cryostorage of seeds : results and prospects.* Novosibirsk. P. 7–16. <https://e.nlrs.ru/open/11817> (In Russian)
8. *Levitskaya G.E.* 2009. The biological characteristics of seeds of some species of the flora of the southern of Moscow region and their response to cryoconservation. – *Rastitelnye Resursy.* 45(3): 9–30. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=17023559> (In Russian)
9. *Levitskaya G.E.* 2017. The influence of the storage temperature on the seeds of wild species. 3. Seeds with morphological and morphophysiological dormancy. – *Rastitelnye Resursy.* 53 (1): 39–50. <http://elibrary.ru/item.asp?id=28949836> (In Russian)
10. *Storozheva N.N.* 2006. [The effect of long-term storage of agricultural crops seeds in the thickness of permafrost soils on the viability and phenotypic variability of plants.] – Abstract. diss. ... cand. agricultural science. Yakutsk. 22 p. (In Russian)
11. *Kershengolts B.M., Zhimulev I.F., Goncharov N.P., Chzhan R.V., Filippova G.V., Shein A.A., Prokopiev I.A.* 2013. Preservation of the gene pool of plants under permafrost conditions: state, advantages and prospects. – *Rus. J. Genet. Appl. Res.* 3 (1): 35–39. <https://doi.org/10.1134/S2079059713010073> (In Russian)
12. *Filipenko G.I., Silaeva O.I., Storozheva N.N.* The use of permafrost with the purpose of plant genetic resources conservation. – Proceeding on applied botany, genetics and breeding. 169: 240–244. http://vir.nw.ru/books/trud_169.pdf (In Russian)
13. *Zhuravskaja A.N., Filippova G.V., Kershengolts B.M., Chzhang R.V.* 2014. Viability of seeds, and biochemical and cytological characteristics of seedlings in peas after long-term seed storage under permafrost. – *Agricultural biology: "Plant biology"*. 1: 72–77. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2014.1.72eng> (In Russian)
14. *Storozheva N.N.* 2018. The growth and development of annual forage crops in the early years of long term storage in cryostorage. *Vestnik of the Mari State University. Chapter "Agriculture. Economics"*. 4(4): 57–64. <https://doi.org/10.30914/2411-9687-2018-4-4-57-64> (In Russian)
15. *Brodal G., Asdal Å.* 2018. The Svalbard Global Seed Vault and the ongoing 100 years seed storage experiment. – *Acta Hort.* 1204: 1–8. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1204.1>
16. *Ivanova E.V., Guryeva K.B., Beletskiy S.L.* 2019. Long-term storage of seeds in conditions of permafrost. – *Tovaroved prodovolstvennyh tovarov.* 1: 61–64. <https://panor.ru/articles/dlitelnoe-khranenie-semyan-v-usloviyakh-v-vechnoy-merzloty/4003.html> (In Russian)
17. *Silaeva O.I.* 2012. Storage of seeds collections of the world's plant resources in conditions low positive temperatures – assessment, status, prospects. – Proceeding on applied botany, genetics and breeding. 169: 230–239. http://vir.nw.ru/books/trud_169.pdf (In Russian)
18. *Walters C., Hill L.M., Wheeler L.J.* 2005. Dying while dry: kinetics and mechanisms of deterioration in desiccated organisms. – *Integr. Comp. Biol.* 45(5): 751–758. <https://doi.org/10.1093/icb/45.5.751>
19. *Probert R., Adams J., Coneybeer J., Crawford A., Hay F.* 2007. Seed quality for conservation is critically affected by pre-storage factors. – *Australian Journal of Botany.* 55(3): 326–335. <https://doi.org/10.1071/BT06046>

20. *Levitskaya G.E.* 2014. The influence of the storage temperature on the seeds of wild species. 1. The not-dormant seeds and seeds with non-deep physiological dormancy. – *Rastitelnye Resursy*. 50(4): 534–584. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=22260668> (In Russian)
21. *Ewart A.J.* 1908. On the longevity of seeds. – *Proc. R. Soc. Victoria*. 21: 1–210.
22. *Genebank Standards*. 1994. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 13 p. <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/meeting/015/aj680e.pdf>
23. *Kalemba E., Pucacka S.* 2007. Possible roles of LEA proteins and sHSPs in seed protection: a short review. – *Biological Lett.* 44(1): 3–16. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.607.2377&rep=rep1&type=pdf>
24. *Tunnacliffe A., Michael T.W.* 2007. The continuing conundrum of the LEA proteins. – *Naturwissenschaften*. 94(10): 791–812. <https://doi.org/10.1007/s00114-007-0254-y>
25. *Ballesteros D., Walters C.* 2011. Detailed characterization of mechanical properties and molecular mobility within dry seed glasses: relevance to the physiology of dry biological systems. – *The Plant Journal*. 68(4): 607–619. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04711.x>
26. *Kuzmin G.P., Panin V.L.* 2014. [The main results of temperature control of the federal cryostorage of the first stage in Yakutsk.] – In: [Cryostorage of seeds: results and prospects]. Novosibirsk. P. 34–41. <https://e.nlrs.ru/open/11817> (In Russian)