

УДК 582.736:581.142:57.042

Подходы к сохранению генофонда лекарственного растения *Oxytropis lanata* (Pall.) DC. (Fabaceae)

Approaches to gene pool conservation of medicinal plant *Oxytropis lanata* (Pall.) DC. (Fabaceae)

А.Б. Холина, Н.М. Воронкова, О.В. Наконечная, О.Г. Корень

A.B. Kholina, N.M. Voronkova, O.V. Nakonechaya, O.G. Koren'

Биолого-почвенный институт ДВО РАН, проспект 100 лет Владивостоку, 159, Владивосток, 690022, Россия
Institute of Biology and Soil Science FEB RAS, Prospect 100 let Vladivostoku, 159, Vladivostok, 690022, Russia
E-mail: kholina@biosoil.ru

Ключевые слова: *Oxytropis lanata*; Fabaceae; аллозимы; криоконсервация семян.
Key words: *Oxytropis lanata*; Fabaceae; allozymes; seed cryopreservation.

Аннотация. С целью сохранения генофонда лекарственного растения *Oxytropis lanata* (Pall.) DC. проведен анализ аллозимного полиморфизма и выявлены надежные и информативные маркерные ферментные системы для данного вида; также мы изучили реакцию семян на глубокое замораживание в жидком азоте (–196 °C). Популяция обладает средним уровнем полиморфизма ($P_{95} = 41,2\%$, $P_{99} = 52,9\%$, $A = 1,58$, $H_0 = 0,158$, $H_e = 0,171$), в целом характерным для травянистых бобовых, и может служить источником материала для сохранения генофонда вида. Глубокое замораживание не привело к гибели семян; отмечено стимулирующее действие ультранизких температур, выраженное как ускорение прорастания и резкое повышение всхожести ($98,6 \pm 2,3\%$) по сравнению с контролем ($12,0 \pm 3,5\%$), связанное с преодолением физического покоя. Не отмечено отклонений в развитии проростков из семян, прошедших криоконсервацию.

Summary. In order to preserve the gene pool of medicinal plant *Oxytropis lanata* (Pall.) DC. we analyzed allozyme polymorphism and identified reliable and informative marker enzyme systems of this species; also we studied the response of seeds to deep freezing in liquid nitrogen (–196 °C). Population has an average level of polymorphism ($P_{95} = 41,2\%$, $P_{99} = 52,9\%$, $A = 1,58$, $H_0 = 0,158$, $H_e = 0,171$) in general typical for herbaceous legumes, and can serve as a source of material for gene pool conservation of the species. Deep freezing has not

led to the death of the seeds; it was marked stimulatory effect of ultralow temperatures, expressed as an acceleration of germination and sharp increase of germinability ($98,6 \pm 2,3\%$) compared to the control ($12,0 \pm 3,5\%$) that is associated with overcoming physical dormancy. There were no abnormalities in the development of seedlings from seeds passed cryopreservation.

Введение

Травянистый многолетник остролодочник шерстистый *Oxytropis lanata* (Pall.) DC. относится к секции *Baicalia* подрода *Oxytropis* рода *Oxytropis* семейства Fabaceae (Polozhij, 1994), $2n = 16$ (Probatova et al., 2011). Область распространения *O. lanata* довольно ограничена – это степной южновосточно-сибирский вид с дизъюнктивным ареалом, который охватывает в основном Байкальскую Сибирь и Северную Монголию (Polozhij, 1994; Yurtsev, 1964). *O. lanata* характеризуется узкой экологической приуроченностью к открытым пескам – псаммофит, гелиофит; обитает на берегах рек и озер (Polozhij, 1994; Yurtsev, 1964). Благодаря строению корневой системы, растения остролодочника способствуют укреплению песчаных берегов. Симбиоз растений остролодочника с клубеньковыми азотфиксирующими бактериями приводит к обо-

гащению почвы азотом, что также делает возможным поселение других растений. *O. lanata* является пионером подвижных дюнных песков, ценозообразователем (Kasyanova et al., 2007), и имеет большое значение для сохранения биоразнообразия. Псаммофитные остролодочниковые фитоценозы служат местом обитания многих реликтовых и эндемичных видов, существование которых напрямую зависит от состояния доминантного вида (Boikov, Sutkin, 2012; Kasyanova, Azovskiy, 2011). Очевидна привлекательность *O. lanata* как декоративного растения с длительным периодом цветения.

Однако наиболее важными и значимыми являются лекарственные свойства *O. lanata*. В тибетской медицине используют все части растения *O. lanata* в качестве кровоостанавливающего, жаропонижающего, диуретического, сердечно-сосудистого средства (Blinova, Sakanyan, 1986). В эксперименте настоек, отвар, экстракт корней проявляют депримирующую, антигипоксическую и обезболивающую активность (Kopoleva, 1989). Для *O. lanata* установлено наличие флавоноидов, алкалоидов, кумаринов, фенолкарбоновых кислот, сапонина и галактоманна (Blinova, Iriste, 1972; Li et al., 2012; Olennikov, Rokhin, 2010; Povydysh et al., 2010), что указывает на перспективность вида как ресурса биологически активных веществ.

Изменение ландшафтов, как природное, так и антропогенное, а также возросшее использование лекарственных растений в медицине наносят значительный ущерб природным популяциям этих видов. Поэтому все большее значение приобретают исследования по сохранению генофонда ценных видов растений. Наиболее надежным методом сохранения генетических растительных ресурсов в генных банках является замораживание семян в жидком азоте при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (криоконсервация) (Engelmann, 2004; Stanwood, 1985; Tikhonova, 1999). Однако перед применением этого метода требуется экспериментальная проверка реакции семян на сверхглубокое замораживание. Прорастание семян дикорастущих растений, в отличие от культурных, часто затруднено из-за наличия глубокого покоя, поэтому при оценке жизнеспособности семян требуется применение определенных способов его преодоления (Pence, 1991; Salomão, 2002; Stanwood, 1985). Кроме того, при мобилизации геноресурсов вида рекомендуется оценка внутривидового разнообразия с использованием молекулярных маркеров (Rao, 2004).

Цель настоящей работы – разработать подходы к сохранению генофонда ценного лекарственного растения *O. lanata*: выявить молекулярные маркеры для определения уровня генетического разнообразия, исследовать жизнеспособность и криоустойчивость семян *O. lanata* и оценить влияние глубокого замораживания семян на развитие растений на ранних этапах онтогенеза. Наша работа является продолжением собственных исследований по криоконсервации семян дикорастущих растений (Voronkova et al., 2008; Kholina, Voronkova, 2008, 2012; Voronkova, Kholina, 2010).

Материалы и методы

Материалом для анализа изоферментов служили 4-недельные проростки из семян *O. lanata*, собранные на берегу оз. Байкал в окрестности с. Горячинск (Республика Бурятия, Прибайкальский район). Экстракцию и электрофорез проводили, как описано ранее (Kholina et al., 2013), гистохимическое окрашивание зон ферментной активности выполняли по стандартным методикам (Goncharenko et al., 1989). Исследованные ферментные системы представлены в табл. 1. Локусы были пронумерованы в порядке уменьшения электрофоретической подвижности контролируемых ими зон. Аллели обозначали в соответствии с электрофоретической подвижностью по отношению к наиболее распространенному варианту, подвижность которого принимается за 1,00. Показатели полиморфности (P), среднего числа аллелей на локус (A), средней наблюдаемой (H_o) и ожидаемой (H_e) гетерозиготности рассчитывали общепринятыми методами (Goncharenko et al., 1989; Zhivotovskiy, 1991).

Остролодочники являются облигатными насекомопыляемыми перекрестниками, размножаются семенами. Массу семян определяли взвешиванием 3 проб по 100 шт., размеры – измерением 25 шт. в каждом образце. Влажность воздушно-сухих семян определяли высушиванием пробы из 50 семян при $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ до постоянного веса в трехкратной повторности. Проращивание семян во всех вариантах опыта проводили в чашках Петри при температуре $23\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в условиях естественного освещения (днем на свету, ночью в темноте) по 50 шт. в трехкратной повторности. Жизнеспособность семян оценивали по лабораторной всхожести, которую определяли ежедневно. Ее рассчитывали как отношение числа проросших семян к числу первоначально заложенных на проращивание и выражали в

Таблица 1

Исследованные ферментные системы и количество полиморфных локусов и аллелей, выявленных для *Oxytropis lanata*

Фермент	Сокращение	К.Ф.*	Интерпретируемые локусы	Полиморфные локусы	Алели
Аконитаза	ACO	4.2.1.3	1	0	1
Флюоресцентная эстераза	FE	3.1.1.2	3	2	6
Глутаматдегидрогеназа	GDH	1.4.1.2	1	0	1
Глюкозофосфатизомераза	GPI	5.3.1.9	2	1	3
Глутаматпируваттрансаминаза	GPT	2.6.1.2	1	1	2
Изоцитратдегидрогеназа	IDH	1.1.1.42	1	1	2
Лейцинаминопептидаза	LAP	3.4.11.1	1	1	3
Малатдегидрогеназа	MDH	1.1.1.37	3	1	4
Малик-энзим	ME	1.1.1.40	1	0	1
6-фосфоглюконатдегидрогеназа	6-PGD	1.1.1.44	1	0	1
Фосфоглюкомутаза	PGM	2.7.5.1	2	2	4
Всего	11		17	9	28

Примеч.: * – кодовый номер фермента (шифр) согласно изданию «Enzyme Nomenclature [Номенклатура ферментов]» (1979).

процентах. Для анализа динамики прорастания учитывали начало прорастания и определяли показатели T_0 – число суток до начала прорастания и T_{50} – число суток, в течение которых всхожесть достигала 50 % от итоговой всхожести. Глубокое замораживание проводили путем прямого погружения семян, завернутых в алюминиевую фольгу, в жидкий азот ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), где они хранились в течение 100 сут.; затем деконсервированные семена отогревали 2 ч. при комнатной температуре и ставили на проращивание одновременно с контрольными семенами, которые хранились в лаборатории. Семена *O. lanata* обладают физическим типом покоя, поэтому для изучения способов его преодоления проводили опыт по обработке семян концентрированной серной кислотой в течение 20 мин. с последующим промыванием в проточной воде.

Проросшие семена после криохранения и в контроле высаживали в контейнеры с почвой. В данном опыте в контроле использовали проростки из семян после скарификации, так как для них характерно дружное и одновременное прорастание. Сравнительный анализ морфологических признаков проростков проводили на 4 этапах развития: на стадии семядольных листьев (I), стадии 2–3 настоящих листьев (II), стадии 2–3 пар листьев (III) и для двухмесячных проростков (IV). На каждом этапе на 20 проростках измеряли длину корня и высоту проростка. Достоверность разницы между вариантами опыта и контролем определяли по критерию Стьюдента

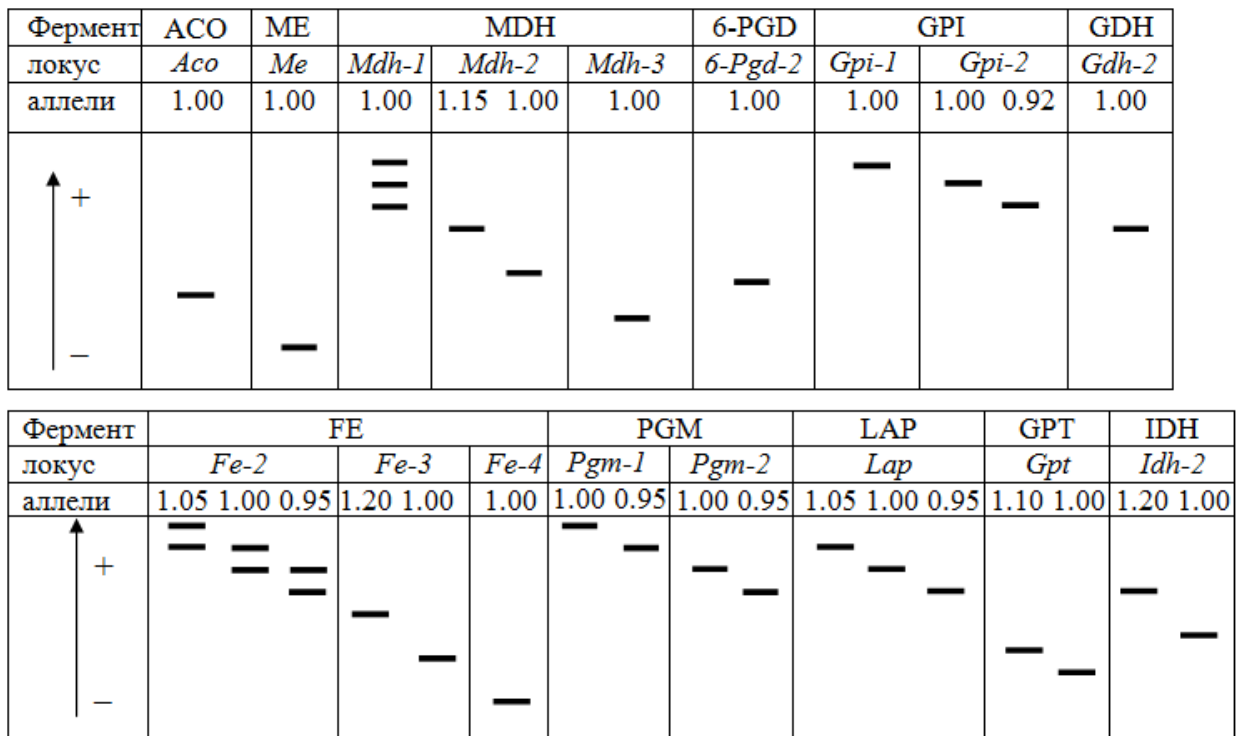
(t): на 95%-ном доверительном уровне при $n = 3$ (в опытах по прорастанию) разница достоверна при $t \geq 2,78$, при $n = 20$ (сравнение проростков) разница достоверна при $t \geq 2,01$. На I, III и IV этапе определяли сырой и сухой вес объединенной пробы из 20 проростков (табл. 5).

Результаты и обсуждение

Описание ферментных систем и показатели полиморфизма

По результатам анализа 11 ферментных систем было обнаружено 28 аллельных вариантов 17 структурных локусов и выявлен полиморфизм по 9 локусам (*Fe-2*, *Fe-3*, *Gpi-2*, *Gpt*, *Idh-2*, *Lap*, *Mdh-2*, *Pgm-1*, *Pgm-2*) (табл. 1, рис. 1). Далее приведено описание фенотипов и генетическая интерпретация для исследованных ферментных систем, а также литературные данные относительно генетического контроля некоторых ферментов у изученных ранее видов *Oxytropis*, представителей секции *Baicalia* – *O. chankaensis* (Kholina et al., 2004), секции *Orobia* – *O. retusa* (Kholina et al., 2000), *O. erecta*, *O. evenorum* и *O. ochotensis* (Kholina et al., 2013), секции *Arctobia* – *O. kamtschatica*, *O. exserta* и *O. revoluta* (Kholina et al., 2013). Полные названия ферментных систем приведены в табл. 1.

ACO выявляется в виде одной инвариантной зоны, под контролем мономорфного гена *Aco*. У *O. kamtschatica* ACO также контролирует

Рис. 1. Схематическое изображение электрофоретических вариантов ферментов в листьях *Oxytropis lanata*.

ется мономорфным локусом, у *O. chankaensis* и *O. ochotensis* – слабополиморфным локусом с двумя аллелями, у *O. erecta*, *O. evenorum*, *O. exserta* и *O. revoluta* – полиморфным локусом с 2 аллелями. FE выявляется 4 зонами активности, наиболее быстрая окрашивается нестабильно, в анализ не включена, менее подвижные зоны предположительно кодируются 3 локусами: полиморфным *Fe-2* с тремя аллелями, каждый из которых выявляется двойными фракциями (рис. 1), полиморфным *Fe-3* с двумя аллелями и мономорфным *Fe-4*. Полиморфный *Fe-2* с тремя аллелями известен для *O. revoluta* и *O. erecta*; у последнего вида, а также у *O. kamtschatica* и *O. exserta* обнаружен полиморфный локус *Fe-3*, у *O. chankaensis* выявлен полиморфный *Fe-2* с 4 аллелями и мономорфный локус *Fe-3*; мономорфный локус *Fe-4* обнаружен у *O. erecta*. GDH проявляется инвариантной зоной, контролируемой мономорфным локусом, который по подвижности совпадает с локусом *Gdh-2*, известным для изученных ранее остролодочников. GPI представлена 2 зонами активности, более подвижная – под контролем мономорфного локуса *Gpi-1*, менее подвижная – под контролем полиморфного локуса *Gpi-2* с 2 аллелями. У изученных ранее видов *Oxytropis* GPI также находится под контролем двух локусов, мономорфного *Gpi-1* и полиморфного *Gpi-2* с 2-4 аллелями; исключение составляет *O. revoluta*, у которого локус *Gpi-2*

мономорфный. GPT выявляется одной зоной активности, под контролем полиморфного локуса *Gpt* с 2 аллелями. Для *O. chankaensis* и *O. retusa* известно наличие полиморфного локуса *Gpt-2* с 2 аллелями. IDH представлена 2 зонами, быстрая зона окрашивается слабо и не включена в анализ, медленная контролируется полиморфным локусом с двумя аллелями *Idh-2*. Аллельные варианты локуса *Idh-2* соответствуют по подвижности известным ранее для *O. chankaensis*, *O. kamtschatica*, *O. revoluta* и *O. exserta*, при этом быстрый аллель у всех изученных видов встречается с низкой частотой. Для *O. exserta* отмечено присутствие третьего, медленного аллеля в этом локусе, у *O. erecta* отмечены основной и медленный аллель, а у *O. evenorum* и *O. ochotensis* локус *Idh-2* мономорфный. LAP выявляется в виде высокоактивной полиморфной зоны, контролируемой локусом *Lap* с 3 аллелями. У исследованных видов *Oxytropis* LAP также контролируется одним геном: у *O. chankaensis*, *O. erecta*, *O. kamtschatica*, *O. ochotensis*, *O. revoluta* – полиморфным локусом с 3 аллелями, у *O. evenorum* – полиморфным с 2 аллелями, у *O. exserta* и *O. retusa* локус *Lap* мономорфный. MDH представлен 3 зонами активности – мономорфным локусом *Mdh-1*, аллель которого выявляется тройными фракциями, полиморфным локусом *Mdh-2* с 2 аллелями и мономорфным локусом *Mdh-3* (рис. 1). Для 3 видов *Oxytropis* сек-

ции *Arctobia* характерен трехлокусный контроль MDH, а у видов секции *Orobia* и *O. chankaensis* присутствует малоактивная медленная зона под контролем мономорфного локуса *Mdh-4*. У большинства изученных видов аллели локуса *Mdh-1* имеют трехполосный фенотип. ME выявляется одной зоной активности, под контролем гена *Me*, как и других видов остролодочников. 6-PGD представлена 2 зонами активности, быстрая зона окрашивается нестабильно и не включена в анализ, медленная контролируется мономорфным локусом *6-Pgd-2*. Мономорфный локус *6-Pgd-2* обнаружен у *O. chankaensis*, *O. evenorum* и *O. exserta*; у *O. erecta*, *O. kamtschatica*, *O. ochotensis*, *O. revoluta* *6-Pgd-2* – полиморфный локус с 2 аллелями.

PGM выявляется в виде 2 зон активности, под контролем двух полиморфных двухаллельных локусов *Pgm-1* и *Pgm-2*, как и у *O. chankaensis*; у представителей секции *Arctobia* – полиморфным является только *Pgm-1*, *Pgm-2* – мономорфный, при этом отмечено наличие еще одного мономорфного локуса *Pgm-3* (Kholina et al., 2013). Исследованные локусы могут быть использованы в качестве генных маркеров для определения уровня аллозимного полиморфизма *O. lanata*.

Большинство полиморфных локусов имеют по 2 аллеля (табл. 2), у *Fe-2* и *Lap* выявлено по 3 аллеля. Обнаружено 2 редких аллеля (с

частотой менее 0,05) – *Idh-2*^{1,20} и *Pgm-2*^{0,95}. Четыре локуса (*Fe-2*, *Fe-3*, *Gpt* и *Pgm-1*) являются высокополиморфными (наблюдаемая гетерозиготность выше 35 %); локусы *Gpi-2*, *Lap* и *Mdh-2* характеризуются средним уровнем изменчивости (наблюдаемая гетерозиготность не превышает 35 %, но не менее 5 %); к слабополиморфным локусам, с минимальными значениями наблюдаемой гетерозиготности, относятся *Idh-2* и *Pgm-2* (табл. 2). На основе аллельных частот 17 локусов были рассчитаны основные показатели генетического разнообразия. Для исследованной популяции *O. lanata* выявлен средний уровень полиморфизма ($P_{95} = 41,2\%$, $P_{99} = 52,9\%$, $A = 1,58$, $H_o = 0,158$, $H_e = 0,171$), сопоставимый с установленным ранее для растений с половым типом репродукции и небольшим размером ареала ($P = 55,8$, $H_e = 0,155$) и травянистых бобовых ($P = 53,0$, $H_e = 0,160$) (Hamrick, Godt, 1996). Показатель полиморфности *O. lanata* близок к таковому для представителя секции *Baicalia* псаммофита *O. chankaensis* ($P_{95} = 42,9\%$, $A = 2,00$, $H_o = 0,266$, $H_e = 0,301$), однако уровень гетерозиготности последнего значительно выше (Kholina et al., 2009). Уровень генетического разнообразия *O. chankaensis* обусловлен в значительной мере особенностями его биологии (вид является многолетником, что приводит к наличию перекрывающихся поколений и увеличивает эффективную

Таблица 2

Частоты аллелей и наблюдаемая гетерозиготность (H_o) полиморфных локусов *Oxytropis lanata* (n = 15 растений)

Локус	Аллель	Частоты	H_o
<i>Fe-2</i>	1,05	0,100	0,467
	1,00	0,500	
	0,95	0,400	
<i>Fe-3</i>	1,20	0,500	0,467
	1,00	0,500	
<i>Gpi-2</i>	1,00	0,900	0,200
	0,92	0,100	
<i>Gpt</i>	1,10	0,389	0,556
	1,00	0,611	
<i>Idh-2</i>	1,20	0,033	0,067
	1,00	0,967	
<i>Lap-1</i>	1,05	0,167	0,267
	1,00	0,733	
	0,95	0,100	
<i>Mdh-2</i>	1,15	0,067	0,133
	1,00	0,933	
<i>Pgm-1</i>	1,00	0,567	0,467
	0,95	0,433	
<i>Pgm-2</i>	1,00	0,967	0,067
	0,95	0,033	

Таблица 3

Влияние скарификации и криоконсервации на прорастание семян *Oxytropis lanata*

Вариант опыта	T ₀ , сут	T ₅₀ , сут	Период прорастания, сут	Всхожесть, %
Контроль	2,3 ± 0,6	4,3 ± 2,3	43	12,0 ± 3,5
Скарификация серной кислотой, 20 мин	1	2	37	68,8 ± 8,8
Жидкий азот, 100 сут	1	2	55	98,6 ± 2,3

Примеч.: $t_{KC} = 8,17$ (сравнение всхожести семян в контроле и после скарификации); $t_{КА} = 29,82$ (сравнение всхожести семян в контроле и после криоконсервации); $t_{СА} = 5,79$ (сравнение всхожести семян после скарификации и после криоконсервации); $n_K, n_C, n_A = 3$, при $t \geq 2,78$ разница достоверна.

численность популяции) и системы размножения (половой тип репродукции и перекрестное опыление с помощью насекомых); эти особенности характерны и для *O. lanata* (многолетник; для остролодочников установлена облигатная аллогамность), и они в совокупности способствуют поддержанию генетического разнообразия. Более высокие показатели гетерозиготности *O. chankaensis* объясняются его полиплоидной природой (Kholina et al., 2009). Показатели полиморфности и числа аллелей на локус *O. lanata* близки к известным данным для 6 видов остролодочников Камчатки (Kholina et al., 2013), однако уровень гетерозиготности у полиплоидных видов секции *Orobia* выше. Выявленный уровень полиморфизма *O. lanata* позволяет считать, что исследованная популяция может служить источником материала для сохранения генофонда вида.

Прорастание семян *O. lanata* и их реакция на криоконсервацию

Размеры и масса семян *O. lanata* составляют в среднем: длина – 2,12 ± 0,05 мм, ширина – 1,71 ± 0,04 мм, масса 100 семян – 0,29 ± 0,017 г. Влажность воздушно-сухих семян *O. lanata* – 5,6 ± 0,4 %, такие семена называют ортодок-

сальными, вода в них находится в связанном состоянии, и они сохраняют высокую жизнеспособность при подсушивании и замораживании (Tikhonova, 1999). Исследование реакции семян на криохранение включает изучение прорастания семян. Для дикорастущих представителей сем. Fabaceae характерно наличие твердосемянности, которое обеспечивает физический тип покоя и способствует длительному сохранению всхожести (Nikolaeva et al., 1985). Семена таких растений обладают высокой стойкостью к неблагоприятным факторам среды. Растения *O. lanata* сформировали семена с довольно высокой степенью твердосемянности (табл. 3, контроль), близкой к таковой *O. chankaensis*, у которого всхожесть семян в контроле не превышала 6,0 % (Kholina, Voronkova, 2012; Voronkova, Kholina, 2010). Нарушение непроницаемости кожуры при обработке серной кислотой привело к активному прорастанию семян (табл. 3, рис. 2), что указывает на присутствие только физического типа покоя. С учетом увеличения всхожести после скарификации установлено, что семена *O. lanata* имеют высокую всхожесть (свыше 60 %), как и семена других видов рода после скарификации – *O. kamtschatica* (93,6 ± 4,2 %), *O. ochotensis* (87,3 ± 5,2 %), *O. revoluta* (79,3 ± 1,9 %) (Voronkova et

Таблица 4

Сравнение морфометрических показателей проростков *Oxytropis lanata* из семян, прошедших криоконсервацию, и в контроле (t-критерий Стьюдента, $n_K, n_A = 20$, при $t \geq 2,02$ разница достоверна)

Показатель	Этапы развития проростков			
	I	II	III	IV
Длина корня	0,19	0,72	1,21	3,03*
Высота проростка	2,39*	0,60	0,40	1,27
Длина листа**	0,30	0,52	–	–
Ширина листа**	0,59	0,52	–	–

Примеч.: * – разница достоверна. ** – на I этапе сравнивали размеры семядольного листа, на II этапе – настоящего листа.

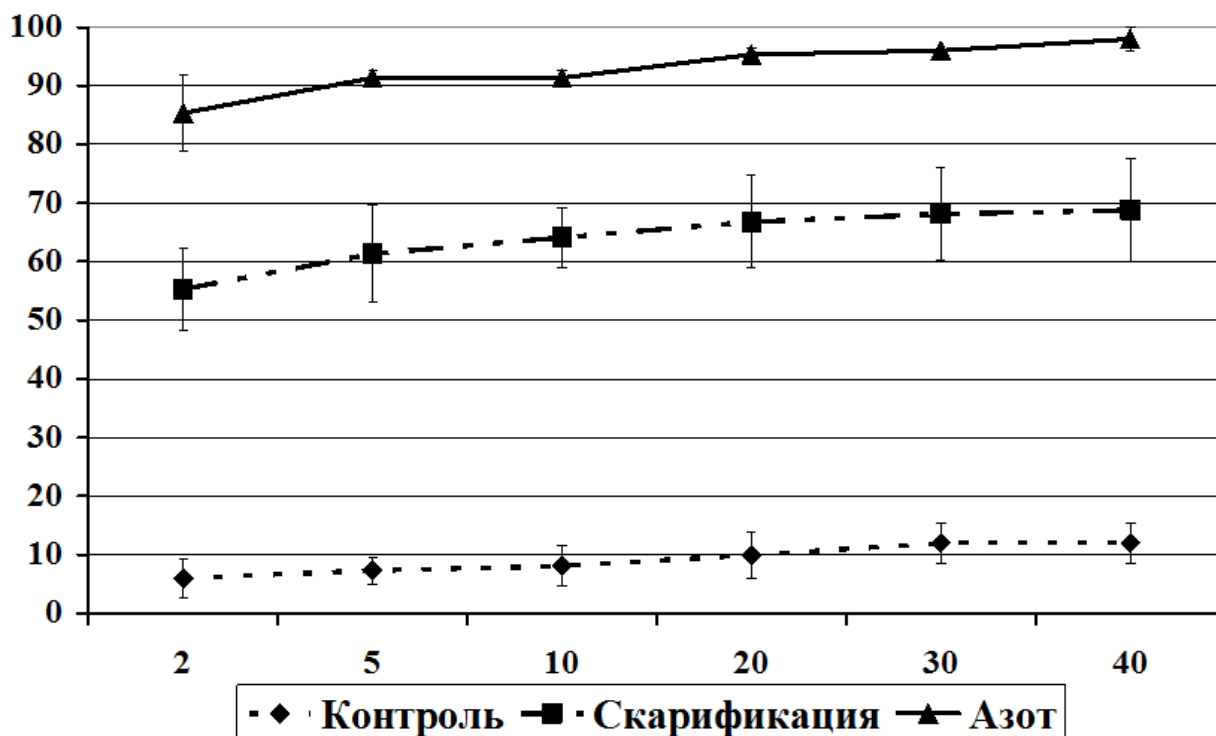


Рис. 2. Динамика прорастания семян *Oxytropis lanata* после скарификации и криоконсервации ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Контроль – без предпосевной обработки; Скарификация – обработка семян концентрированной серной кислотой 20 мин.; Азот – предпосевное замораживание семян в жидком азоте, 100 сут. По оси абсцисс – период прорастания, сут.; по оси ординат – всхожесть, %.

al., 2008), *O. chankaensis* ($65,0 \pm 2,0\%$), *O. retusa* ($67,0 \pm 2,0\%$) (Voronkova, Kholina, 2010).

После криоконсервации семена сохранили способность к прорастанию. Реакция на криообработку проявилась резким повышением всхожести по сравнению с контролем и увеличением скорости прорастания – проросло свыше 90 % семян в течение пяти дней, через 1,5 мес. всхожесть составила около 100 % (табл. 3, рис. 2). Воздействие ультранизкой температуры с последующим размораживанием было аналогично воздействию серной кислоты и, по-видимому, также связано с повреждением семенной кожуры. Преодоление экзогенного типа покоя под действием сверхнизких температур отмечено ранее для видов *Oxytropis* (Kholina, Voronkova, 2012; Voronkova et al., 2008; Voronkova, Kholina,

2010) и других дикорастущих бобовых (Kholina, Voronkova, 2012; Pence, 1991; Perez-Garsia, 2008; Salomão, 2002).

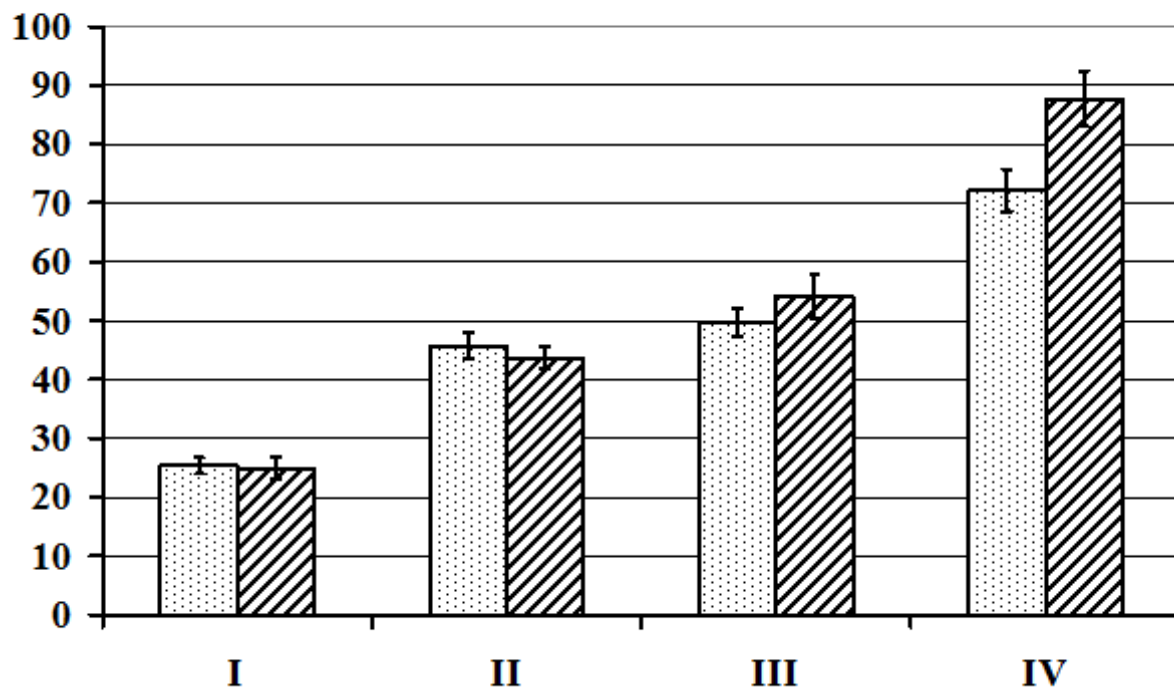
Одним из важных показателей успеха криоконсервации является нормальный рост и развитие растений из деконсервированных семян. Глубокое замораживание семян *O. lanata* не привело к появлению аномальных проростков. Сравнительный анализ не выявил существенных отклонений результатов опытного варианта от контрольного (рис. 3, табл. 4, 5). По сравнению с контролем отмечено незначительное снижение средней высоты сеянцев из семян после замораживания на первом этапе и увеличение длины корня в варианте с глубоким замораживанием на четвертом этапе (рис. 3, табл. 4). Фитомасса проростков из семян после криохранения была

Таблица 5

Изменение фитомассы проростков *Oxytropis lanata* из семян, прошедших криоконсервацию, и в контроле (общая масса 20 шт.)

Показатель	Вариант опыта	Этапы развития проростков		
		I	III	IV
Сырая фитомасса, г	Контроль	0,590	1,135	2,285
	Азот	0,625	1,200	2,320
Сухая фитомасса, г (в % от сырой фитомассы)	Контроль	0,040 (6,8)	0,170 (15,0)	0,385 (16,9)
	Азот	0,055 (8,8)	0,190 (15,8)	0,424 (18,3)

А)



Б)

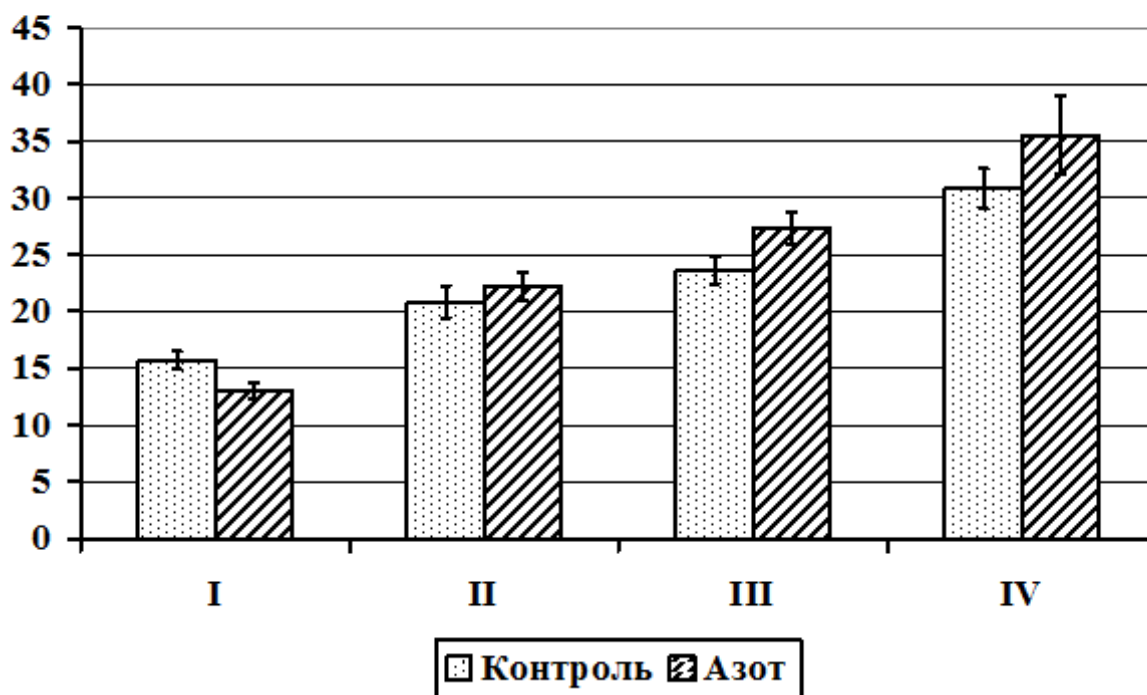


Рис. 3. Влияние криоконсервации на длину корня (А) и побега (Б) проростков *Oxytropis lanata*. Азот – предпосевное замораживание семян в жидком азоте (-196°C). По оси абсцисс – этапы развития проростков (см. Материалы и методы), по оси ординат – длина, мм.

выше, чем у контрольных, на всех этапах (табл. 5). Нормальное развитие растений из семян после хранения в жидком азоте было показано в наших ранних работах для 3 видов бобовых – *Sophora flavescens* (Voronkova, Kholina, 2003) и 2 видов *Hedysarum* (Voronkova, Kholina, 2010). Известны случаи появления поврежденных проростков – так, у *Astragalus mongolicus* после экспозиции семян в жидком азоте половина проростков были поврежденными или погибли, что отчасти может быть вызвано особенностями размораживания семян – нагреванием на водяной бане до 40 °C (Shibata et al., 1995). Мы проводили менее контрастное отогревание семян на воздухе, никаких повреждений проростков с начальных этапов прорастания отмечено не было.

Проведенное исследование показало, что семена *O. lanata* хорошо переносят замораживание. Один из существенных для сохранения генофонда при криоконсервации показатель – всхожесть семян – не уменьшилась. Отмечено стимулирующее влияние замораживания семян – преодоление физического покоя, ускорение прорастания и увеличение всхожести. Рост и развитие растений из семян после криохранения не

выявили отклонений. Устойчивость семян *O. lanata* к сверхнизким температурам обеспечивает возможность для хранения семянного материала с максимальной гарантией. Полученные результаты могут быть использованы при создании коллекции семян *O. lanata* для низкотемпературного банка семян.

Заключение

В работе выявлены молекулярные маркеры, с помощью которых исследовано состояние генофонда *O. lanata*. В популяции установлен средний уровень генетического разнообразия, в целом характерный для травянистых бобовых. Изученная популяция может служить источником материала для сохранения генофонда вида. Глубокое замораживание семян *O. lanata* в жидком азоте не оказало отрицательного действия на их жизнеспособность и на развитие растений из семян после криоконсервации и может быть использовано в качестве режима долговременного хранения.

Работа поддержана программой Президиума РАН «Биологическое разнообразие», проект № 12-И-П30-02.

ЛИТЕРАТУРА

- Blinova K.F., Iriste V.A.** The present state and the prospects of investigation of the representatives of the genus *Oxytropis* DC. // Rast. Resursy [Plant Resources], 1972. – Vol. 8, iss. 2. – P. 305–309 [in Russian]. (**Блинова К.Ф., Иристе В.А.** Современное состояние и перспективы изучения представителей рода *Oxytropis* DC. // Раст. ресурсы, 1972. – Т. 8, вып. 2. – С. 305–309).
- Blinova K.F., Sakanyan E.I.** Species of *Oxytropis* DC. used in Tibetan medicine and their flavonoid composition // Rast. Resursy [Plant Resources], 1986. – Vol. 22, iss. 2. – P. 266–272 [in Russian]. (**Блинова К.Ф., Саканян Е.И.** Виды *Oxytropis* DC., применяемые в тибетской медицине, и их флавоноидный состав // Раст. ресурсы, 1986. – Т. 22, вып. 2. – С. 266–272).
- Boikov T.G., Sutkin A.V.** Ecophytocenotic features of *Vicia tsydenii* Malysch. in Southern Transbaikalia // Rus. J. Ecol., 2012. – No. 5. – P. 340–346.
- Engelmann F.** Plant cryopreservation: progress and prospects // In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant, 2004. – Vol. 40, No. 5. – P. 427–433.
- Enzyme Nomenclature. Recommendations (1972) of the International Union of Biochemistry on the nomenclature and classification of enzymes. – Moscow: VINITI, 1979. – 321 p. [in Russian]. (Номенклатура ферментов. Рекомендации (1972 г.) Международного биохимического союза по номенклатуре и классификации ферментов. – М.: ВИНТИ, 1979. – 321 с.).
- Goncharenko G.G., Padutov V.E., Potenko V.V.** Rukovodstvo po issledovaniyu khvoynykh vidov metodom elektroforeticheskogo analiza izofermentov [Guide to conifer species research by isozyme electrophoretic methods]. – Gomel: Polespechat, 1989. – 164 p. [in Russian]. (**Гончаренко Г.Г., Падутов В.Е., Потенко В.В.** Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. – Гомель: Полеспечать, 1989. – 164 с.).
- Hamrick J.L., Godt M.J.W.** Effects of life history traits on genetic diversity in plant species // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B., 1996. – Vol. 351. – P. 1291–1298.
- Kasyanova L.N., Azovskiy M.G.** Vegetation of dune sands of Olkhon Island on Baikal and some questions concerning its protection // Geogr. Nat. Res., 2011. – Vol. 32, No. 3. – P. 248–253 [in Russian]. (**Касьянова Л.Н., Азовский М.Г.** Растительность дюнных песков острова Ольхон на Байкале и вопросы ее охраны // География и природные ресурсы, 2011. – Т. 32, № 3. – С. 57–63).

- Kasyanova L.N., Azovskiy M.G., Mazukabzov A.M.** The vegetation of drift sands on an island Olkhon (Baikal) // Bull. Mosc. Soc. Natur., 2007. – Vol. 211, iss. 2. – P. 41–49 [in Russian]. (**Касьянова Л.Н., Азовский М.Г., Мазукабзов А.М.** Структура растительности переувлажненных песков острова Ольхон (озеро Байкал) // Бюлл. МОИП, 2007. – Т. 211, вып. 2. – С. 41–49).
- Kholina A.B., Koren O.G., Zhuravlev Yu.N.** Allozyme variation in *Oxytropis retusa* Matsum. from the Kuril Archipelago // Natural History Research. Special Issue, 2000. – No. 7. – P. 15–20.
- Kholina A.B., Koren O.G., Zhuravlev Yu.N.** High polymorphism and autotetraploid origin of the rare endemic species *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae) inferred from allozyme data // Rus. J. Genet., 2004. – Vol. 40, No. 4. – P. 393–400.
- Kholina A.B., Koren O.G., Zhuravlev Yu.N.** Genetic structure and differentiation of populations of the tetraploid species *Oxytropis chankaensis* (Fabaceae) // Rus. J. Genet., 2009. – Vol. 45, No. 1. – P. 70–80.
- Kholina A.B., Nakonechnaya O.V., Yakubov V.V., Koren O.G.** Genetic variation in six species of the genus *Oxytropis* DC. (Fabaceae) from Kamchatka Peninsula // Rus. J. Genet., 2013. – Vol. 49, No. 10. – P. 1021–1029. doi: 10.1134/S1022795411120088.
- Kholina A.B., Voronkova N.M.** Conserving the gene pool of far eastern plants by means of seed cryopreservation // Biol. Bull., 2008. – Vol. 35, No. 3. – P. 262–269.
- Kholina A.B., Voronkova N.M.** Seed cryopreservation of some medicinal legumes // Journal of Botany, 2012. – Vol. 2012, Article ID 186891, 7 pages, doi:10.1155/2012/186891.
- Konopleva E.V.** Comparative characteristics of analgesic and antihypoxic effects of tinctures of some species *Oxytropis* DC. // Rast. resursy [Plant Resources], 1989. – Vol. 25, iss. 2. – P. 254–258 [in Russian]. (**Коноплева Е.В.** Сравнительная характеристика обезболивающего и противогипоксического действия настоев некоторых видов *Oxytropis* DC. // Раст. ресурсы, 1989. – Т. 25, вып. 2. – С. 254–258).
- Li M.X., Lan Z.H., Wei L.L. et al.** Phytochemical and biological studies of plants from the genus *Oxytropis* // Rec. Nat. Prod., 2012. – Vol. 6, No. 1. – P. 1–20.
- Nikolaeva M.G., Razumova M.V., Gladkova V.N.** Spravochnik po prorashchivaniyu pokoyashchikhsya semyan [Germination of Dormant Seeds: A Handbook]. – Leningrad: Nauka, 1985. – 348 p. [in Russian]. (**Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н.** Справочник по проращиванию покоящихся семян. – Л.: Наука, 1985. – 348 с.).
- Oleennikov D.N., Rokhin A.V.** Galactomannan of the locoweed (*Oxytropis lanata* (Pallas) DC) seeds // Appl. Bioch. Microbiol., 2010. – Vol. 46, No. 4. – P. 444–448.
- Pence V.C.** Cryopreservation of seeds of Ohio native plants and related species // Seed Sci. Technol., 1991. – Vol. 19. – P. 235–251.
- Perez-Garsia F.** Effect of cryopreservation, gibberellic acid and mechanical scarification on the seed germination of eight endemic species from the Canary Islands // Seed Sci. Technol., 2008. – Vol. 36. – P. 237–242.
- Polozhij A.V.** *Oxytropis* DC. // Flora Sibiri [Flora Sibiriae]. – Novosibirsk: Nauka, 1994. – Vol. 9. – P. 74–151 [in Russian]. (**Положий А.В.** *Oxytropis* DC. // Флора Сибири. Т. 9. Fabaceae (Leguminosae). – Новосибирск: Наука, 1994. – Т. 9. – С. 74–151).
- Povydysh M.N., Bobyleva N.S., Bityukova N.V.** *Oxytropis* DC. // Rastitelnye resursy Rossii: dikorastushchie tsvetkovye rasteniya, ikh komponentnyi sostav i biologicheskaya aktivnost. T. 3. Semeistva Fabaceae–Apiaceae [Plant resources of Russia: wild flowering plants, their component composition, and biological activity. Vol. 3. Families Fabaceae–Apiaceae] / Ed. Budantsev A.L. – St. Petersburg, Moscow: КМК, 2010. – P. 65–69 [in Russian]. (**Повыдыш М.Н., Бобылева Н.С., Битюкова Н.В.** *Oxytropis* DC. – Остролодочник // Растительные ресурсы России: дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 3. Семейства Fabaceae–Apiaceae / Ред. Буданцев А.Л. – СПб., М.: КМК, 2010. – С. 65–69).
- Probatova N.S., Kazanovsky S.G., Rudyka E.G. et al.** *Oxytropis lanata* // In: Marhold K. (ed.), IAPT/IOPB chromosome data 12. Taxon, 2011. – Vol. 60, No. 6. – P. 1792, E53.
- Rao N.K.** Plant genetic resources: Advances conservation and use through biotechnology // African J. Biotechnol., 2004. – Vol. 3. – P. 136–145.
- Salomão A.N.** Tropical seed species' responses to liquid nitrogen exposure // Braz. J. Plant Physiol., 2002. – Vol. 14, No. 2. – P. 133–138.
- Shibata T., Sakai E., Shimomura K.** Effect of rapid freezing and thawing on hard-seed breaking in *Astragalus mongolicus* Bunge (Leguminosae) // J. Plant Physiol., 1995. – Vol. 147. – P. 127–131.
- Stanwood P.C.** Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation // Cryopreservation of plant cells and organs. – Boca Raton; Florida: CRC Press, Inc, 1985. – P. 200–226.
- Tikhonova V.L.** Long-term storage of seeds // Rus. J. Plant Phys., 1999. – Vol. 46, No. 3. – P. 400–408.
- Voronkova N.M., Kholina A.B.** An influence of temperature factor and scarification on seed germination and growth of seedlings of *Sophora flavescens* Soland. // Rast. Resursy [Plant Resources], 2003. – Vol. 39, iss. 1. – P. 43–49 [in Russian]. (**Воронкова Н.М., Холина А.Б.** Влияние температурного фактора и скарификации на проращивание семян и рост сеянцев *Sophora flavescens* Soland. // Раст. ресурсы, 2003. – Т. 39, вып. 1. – С. 43–49).

Voronkova N.M., Kholina A.B. Conservation of endemic species from the Russian Far East using seed cryopreservation // Biol. Bull., 2010. – Vol. 37, No. 5. – P. 496–501. doi: 10.1134/S1062359010050092

Voronkova N.M., Kholina A.B., Verkholat V.P. Plant biomorphology and seed germination in pioneer species of Kamchatka volcanoes // Biol. Bull., 2008. – Vol. 35, No. 6. – P. 599–605.

Yurtsev B.A. Conspectus of the section *Baicalia* Bge. of the genus *Oxytropis* DC. // Novosti Sist. Vyssh. Rast. [Novit. Syst. Pl. Vasc.], 1964. – Vol. 1. – P. 191–218 [in Russian]. (**Юрцев Б.А.** Конспект системы секции *Baicalia* Bge. рода *Oxytropis* DC. // Новости сист. высш. раст., 1964. – Т. 1. – С. 191–218).

Zhivotovskiy L.A. Populyatsionnaya biometriya [Population Biometry]. – Moscow: Nauka, 1991. – 271 p. [in Russian]. (**Животовский Л.А.** Популяционная биометрия. – М.: Наука, 1991. – 271 с.).