



УДК 582.736:581.143.6+577.13

Клональное микроразмножение редкого вида *Astragalus sericeocanus* Gontsch. и содержание фенольных соединений в условиях *in vitro*

Е. В. Амброс, О. В. Коцупий, Т. И. Новикова, Г. И. Высочина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Центральный сибирский ботанический сад» СО РАН,
ул. Золотодолинская, 101, г. Новосибирск, 630090, Россия. E-mail: ambros_ev@mail.ru

Ключевые слова: всхожесть семян, клональное микроразмножение, органогенез, состав и содержание фенольных соединений, эндемичный вид.

Аннотация. Впервые введен в культуру *in vitro* эндемичный для побережий озера Байкала вид *Astragalus sericeocanus* Gontsch. (астрагал шелковисто-седой) – источник ценных вторичных метаболитов, обладающих лекарственным действием. Оценена эффективность применения механической и химической скарификаций для преодоления физического покоя у семян растений этого вида: наибольший процент проросших семян ($80,7 \pm 0,88$ %) при минимальной продолжительности прорастания ($7,3 \pm 0,33$ суток) был получен при механической обработке. Изучено влияние тидиазурона (ТДЗ) в концентрациях 0,05–2,0 мг/л на регенерационный потенциал различных типов эксплантов в культуре *in vitro* на средах по прописи Гамборга и Эвелега. Установлены эффективные концентрации ТДЗ, индуцирующие прямой органогенез из первичных побегов проростков при частоте регенерации до 100 % и из пазушных почек микропобегов при частоте регенерации до 31,1 %. Оптимальная концентрация ТДЗ для стимуляции развития пазушных меристем первичных побегов составила 0,1 мг/л. Последующее культивирование развившихся микропобегов на среде для собственно размножения, дополненной 0,2 мг/л ТДЗ, позволило получить в среднем $11,4 \pm 0,64$ побегов на эксплант. При использовании гипокотилей и семядолей проростков в качестве эксплантов отмечено формирование каллусной ткани на средах с 0,05 и 1,0 мг/л ТДЗ. Анализ вторичных метаболитов с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) показал, что у регенерантов, полученных *in vitro* на средах с 0,05–0,1 мг/л ТДЗ, состав и содержание фенольных соединений сопоставимы с составом и содержанием веществ в растениях *in vivo*, что указывает на высокий биосинтетический потенциал микроклонов. В гидролизатах экстрактов листьев растений *in vivo* идентифицировали кверцетин, кемпферол, изорамнетин и апигенин; гидролизаты экстрактов микроклонов отличались отсутствием апигенина.

Clonal micropropagation of *Astragalus sericeocanus* Gontsch. and content of phenolic compounds *in vitro*

E. V. Ambros, O. V. Kotsupy, T. I. Novikova, G. I. Vysochina

Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of Russian Academy of Science, Zolotodolinskaya str., 101,
Novosibirsk, 630090, Russian Federation

Keywords: composition and content of phenolic compounds, endemic species, micropropagation, organogenesis, seed germination.

Summary. *In vitro* propagation system for *Astragalus sericeocanus* Gontsch., an endemic species of the coast of Lake Baikal, was developed for the first time. This species is a source of valuable secondary metabolites with medicinal properties. The efficiency of mechanical and chemical scarifications for overcoming physical dormancy of seeds

of this species was estimated. The highest percentage of seed germination (80.7 ± 0.88 %) at the minimum duration of germination (7.3 ± 0.33 days) was obtained by mechanical treatment. The effect of thidiazuron (TDZ; 0.05–2.0 mg/l) supplemented to B₅ medium on regenerative potential of different explant types was studied. Efficient TDZ concentrations induced direct organogenesis from primary shoots of seedlings (regeneration frequency up to 100 %) and axillary buds of microshoots (up 31.1 %) were revealed. The results showed that 0.1 mg/l TDZ was the optimal concentration for the development of axillary meristems of primary shoots. Following cultivation of microshoots on the medium for propagation supplemented with 0.2 mg/l TDZ resulted in formation of 11.4 ± 0.64 shoots per explant. Callus formation was observed on medium supplemented with 1.0 and 0.05 mg/l TDZ using hypocotyl and cotyledon explants. Analysis of secondary metabolites by high performance liquid chromatography (HPLC) showed that the composition and content of phenolic compounds in regenerants obtained on medium supplemented with 0.05–0.1 mg/l TDZ were comparable to *in vivo* plants, indicating high biosynthetic capacity of microplants. Quercetin, kaempferol, apigenin and izorhamnetin were identified in the hydrolysates of extracts of *in vivo* plant leaves. Hydrolysates of *in vitro* plants extracts were characterized by the absence of apigenin only.

Введение

Сохранение исчезающих видов в коллекциях *ex situ* является важнейшей составляющей поддержания генетического разнообразия растений (Benson et al., 2000; Global strategy ..., 2012; Novikova, 2013). Особый интерес представляет изучение возможностей сохранения видов, естественное возобновление которых в природе затруднено. *Astragalus sericeocanus* Gontsch. – астрагал шелковисто-седой (сем. Fabaceae Lindl.) – эндемичное псаммофитное растение побережья оз. Байкала (Zhמוד et al., 2012). Встречается только на территории Республики Бурятия, в Северо-Байкальском (на островах Ярки и Миллионный, на побережье Дагарской губы и бухты Ая) и Прибайкальском (урочище Пески в окр. с. Турки) р-ах (Vyidrina, 1994; Sandanov, Krivenko, 2013). Вид включен в Красную книгу Республики Бурятия (Sandanov, Krivenko, 2013) с категорией редкости 3 (NT), то есть находится в состоянии, близком к угрожаемому. Благодаря длинностержнекорневой системе, способствующей стабилизации песчаных дюн, *A. sericeocanus* играет важную экологическую роль в защите от эрозии вокруг оз. Байкала (Konichenko et al., 2014). Лимитирующие факторы, препятствующие естественному воспроизводству вида в окр. с. Турки, связаны с высокой антропогенной нагрузкой и особенностями мест обитания на перевиваемых песках (Selyutina et al., 2014; Krivenko, 2015). Местообитания *A. sericeocanus* на севере Байкала (острова Ярки и Миллионный) подвержены риску исчезновения из-за возможного повышения уровня воды в озере (Krivenko, 2015). При антропогенных воздействиях в природных популяциях нарушается эволюционно сложившееся соотношение компонент, характеризующих внутривидовую и межвидовую изменчивость, что приво-

дит к их деградации (Zhuravlev et al., 1999; Altuhov, 2004; Zhמוד et al., 2012).

Многие представители рода *Astragalus* L. (астрагал) – ценные лекарственные растения, обладающие иммуностимулирующими, гепатопротекторными, противовирусными и противоопухолевыми свойствами, которые обусловлены накоплением вторичных метаболитов, в том числе фенольных соединений (Tang, Eisenbrand, 1992; Ionkova, 1995). Среди последних наибольший интерес вызывает класс флавоноидов, представленный у астрагалов преимущественно флавонолами, флавонами и их производными (Maksimov et al., 2002). Кроме этих флавоноидов, в корнях видов *A. membranaceus* (Fisch. ex Link) Bunge и *A. mongholicus* Bunge, близких к *A. sericeocanus*, обнаружены изофлавоны и изофлавоны (Song et al., 1997; Lin et al., 2000). Эндемичный вид *A. sericeocanus*, общее содержание флавоноидов у которого превышает 2 %, является перспективным ресурсом биологически активных веществ (Sidneva, 2006), однако его выращивание *ex situ* ввиду природной приуроченности к песчаным участкам побережий затруднено (Semenova, 2007).

В условиях культуры фертильность растений *A. sericeocanus* невысока, для семян характерен физический тип покоя, при этом их продолжительное хранение значительно снижает всхожесть (Semenova, 2007). Альтернативное решение проблемы дефицита сырья для получения ценных вторичных метаболитов связано с использованием биотехнологических подходов, которые позволяют ввести лекарственные растения в культуру *in vitro* при минимальном количестве исходного материала, взятого из природы, что особенно актуально для редких и эндемичных видов (Rao, Ravishankar, 2002; Pathak, Abido, 2014). Полученные микроклоны нередко накапливают вторичные соединения на уровне,

близком к содержанию этих веществ в растениях *in vivo* (Hussain et al., 2012). Данные о культивировании в условиях *in vitro* астрагала шелковисто-седого в литературе отсутствуют.

Цель данной работы – введение в культуру *in vitro* и микрклональное размножение *A. sericeocanus* с последующей оценкой уровня содержания фенольных соединений в полученных регенерантах по сравнению с интактными растениями. В связи с этим были поставлены следующие задачи: (а) разработать режимы проращивания семян с использованием скарификации; (б) выявить морфогенный потенциал *in vitro* различных типов эксплантов *A. sericeocanus*; (в) провести сравнительный анализ содержания и качественного состава фенольных соединений *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

В качестве исходного материала использовали зрелые семена *A. sericeocanus*, собранные в 2012 г. в окр. оз. Байкала (Республика Бурятия, Прибайкальский р-н, окр. с. Турки, урочище Пески) сотрудниками лаборатории интродукции редких и исчезающих растений Центрального сибирского ботанического сада СО РАН (далее ЦСБС СО РАН) (г. Новосибирск). Семена стерилизовали ступенчато: 70%-м раствором этилового спирта (время стерилизации семян составило 2 мин.), затем 1%-м раствором гипохлорита натрия (время стерилизации – 15 мин.) с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде (по 10 мин.). Для снятия экзогенного физического покоя была проведена скарификация 50%-й серной кислотой (продолжительность обработки от 2 до 60 мин.) с последующим промыванием семян в воде и механическая скарификация с помощью наждачной бумаги. Семена проращивали в трехкратной повторности по 30 штук для каждой обработки на безгормональной питательной среде по прописи Гамборга и Эвелега (B_5 , содержащей 3 % сахарозы и 0,7 % агары), в течение 5 недель (Gamborg, 1968). Подсчет проросших семян проводили ежедневно. В ходе эксперимента отмечали сроки появления всходов с момента закладки опыта, подсчитывали процент проросших семян (GP), среднюю скорость (M_{days}) и среднюю продолжительность прорастания. Семена считали проросшими при появлении первичного корня семени длиной не менее 2 мм (ISTA, 1993). Процент прорастания семян определяли по следующей формуле:

$$GP = \frac{n_i}{N} \times 100,$$

где n_i – число проросших семян, N – общее число семян. Среднюю скорость прорастания (условное число суток, необходимое для прорастания одного семени) подсчитывали согласно методике Раналя и Сантаны (Ranal, De Santana, 2006):

$$M_{days} = \frac{\sum_{i=1}^n N_i \times G_i}{\sum_{i=1}^n G_i},$$

где N_i – число суток с начала культивирования до момента наблюдения, G_i – проросших семян на момент наблюдения. Средняя продолжительность прорастания была определена в конце экспериментального периода. Интактные семена были использованы в качестве контроля.

Для клонального микроразмножения в работе было использовано 4 типа эксплантов: 1) первичные побеги, 2) семядоли, 3) гипокотили 20-суточных проростков и 4) части вегетативных побегов с пазушной почкой (возраст микрорастений 12 недель, что соответствовало имматурному возрастному состоянию). На этапах введения в культуру *in vitro* и собственно микроразмножения для индукции побегообразования в состав питательной среды B_5 добавляли N-фенил-N'-1,2,3-тиадиазолил-5-мочевину – тиадиазурон (ТДЗ) в концентрациях 0,05–2,0 мг/л. Контролем служила среда без регуляторов роста. Продолжительность пассажей составила 4–8 недель. Опыты проводили в 3-кратной повторности. Условия культивирования: температура 23 ± 2 °C, 16-часовой фотопериод, освещение люминесцентными лампами Osram L 36 W (Germany) с интенсивностью 3 тыс. лк.

Состав и содержание фенольных соединений (ФС) определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), пользуясь принципами, изложенными в работе Е. П. Храмовой и Е. К. Комаревцевой (Khramova, Komarevtseva, 2008). У регенерантов *in vitro*, полученных из первичных побегов проростков, анализировали листья ортотропных побегов высотой 5–7 см в возрасте 8 недель (соответствуют ювенильному возрастному состоянию). Для сравнения исследовали проростки и листья взрослых генеративных растений в фазе цветения–плодоношения из природной ценопопуляции. Все изученные образцы представляют собой среднюю пробу.

Для извлечения суммы фенольных соединений проводили исчерпывающую экстракцию 70%-м этанолом при нагревании на водяной бане. Для проведения кислотного гидролиза к 0,5 мл водно-этанольного извлечения прибавляли 0,5 мл HCl (2 н) и нагревали на кипящей водяной бане в течение 2 часов. Анализ веществ проводили на жидкостном хроматографе «Agilent 1200» с диодноматричным детектором и системой для сбора и обработки хроматографических данных ChemStation.

Разделение проводили на колонке Zorbax SB-C18, размером 4,6 × 150 мм, с диаметром частиц 5 мкм, применив градиентный режим элюирования. В подвижной фазе содержание метанола в водном растворе ортофосфорной кислоты (0,1 %) изменялось для экстрактов с 32 до 33 % за 27 мин., далее до 46 % к 38 мин., до 56 % – к 50 мин.; для гидролизатов – с 50 до 52 % за 15 мин. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Температура колонки 26 °С. Объем вводимой пробы 10 мкл. Детектирование осуществляли при $\lambda = 255, 270, 290, 340, 350, 360, 370$ нм. Для приготовления подвижных фаз использовали метиловый спирт (ос. ч.), ортофосфорную кислоту (ос. ч.), бидистиллированную воду. В качестве метчиков использовали стандартные образцы производства фирмы «Fluka» и «Sigma». Анализ каждого образца проводили в 2-кратной повторности. Содержание индивидуальных компонентов (C_x) в процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляли по формуле:

$$C_x = \frac{C_{мс} \times S_1 \times V_1 \times V_2 \times 100}{S_2 \times M \times 10 \times (100 - B)},$$

где $C_{мс}$ – концентрация соответствующего стандартного раствора ФС, мкг/мл; S_1 – площадь пика ФС в анализируемой пробе, ед. о. п.; S_2 – площадь пика стандартного ФС, ед. о. п.; V_1 – объем элюата после вымывания ФС с концентрирующего патрона, мл; V_2 – общий объем экстракта, мл; M – масса навески, мг; B – влажность сырья, %. Расчет содержания фенольных соединений производили по стандартной площади пика кверцетина.

Статистическую обработку и анализ полученных данных проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel 10.0 и Statistica 6.1. Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок ($M \pm m$). Для сравнения средних значений независимых выборок использовали многокритериальный тест Дункана (однотакторный дисперсионный анализ). Много-

факторный дисперсионный анализ (ANOVA) проводили для изучения влияния концентраций тидиазурина в среде и используемых эксплантов на частоту регенерации и коэффициент размножения.

Результаты и их обсуждение

Прорастание семян *Astragalus sericeocanus* в зависимости от способов скарификации

Для сохранения ценных, редких и исчезающих видов *ex situ* предпочтительным исходным материалом являются семена. Использование семян обеспечивает максимальный охват генотипической изменчивости в популяциях (Benson et al., 2000; Gorbunov et al., 2008). Разработанная нами схема стерилизации семян *A. sericeocanus* с использованием этилового спирта и 1%-го раствора гипохлорита натрия оказалась эффективной и позволила получить 83,3 % стерильных эксплантов. В нашем эксперименте процент прорастания необработанных семян *A. sericeocanus* не превышал 15,7 % через 34 дня проращивания при скорости прорастания 18,1 сут. (табл. 1). Известно, что для семян представителей семейства Fabaceae характерно наличие твердосемянности, которое обеспечивает физический тип покоя (Аф) и объясняется водонепроницаемостью семенной кожуры (Nikolaeva, 2001; Baskin J. M., Baskin C. S., 2004). Проращивание таких семян представляет определенные трудности и приводит к появлению единичных проростков в течение длительного периода. Одним из эффективных способов преодоления экзогенного покоя является скарификация. В ряде экспериментов показано, что наряду с механической скарификацией для устранения физического покоя у семян представителей рода *Astragalus* часто используется обработка семян 50%-й серной кислотой (Basalma et al., 2008; Erisen et al., 2010). У семян, обработанных серной кислотой, а также подверженных механической обработке, происходит растяжение палисадных клеток и развитие рыхлой системы межклетников. Межклеточные пространства в спермодерме освобождаются от кутина и суберина, значительно увеличиваясь и образуя хорошо выраженные промежутки, что способствует свободному поступлению воды и кислорода к зародышу (Dewir et al., 2011). В наших экспериментах скарификация серной кислотой повышала количество проросших семян в зависимости от продолжительности обработки.

Достоверно значимые различия в сравнении с контролем были получены при экспозициях 20, 40 и 60 мин. Однако продолжительность прорастания составила от 29 до 40 сут., а скорость прорастания от 17,8 до 22,6 сут. Максимальное количество проросших семян при 40 мин. экс-

позиции увеличилось в 2,4 раза (рис. 1). Однако наиболее эффективной оказалась механическая скарификация, при которой количество проросших семян, вышедших из состояния покоя через 7 сут. культивирования, увеличилось в 5,1 раза при скорости прорастания 4,8 сут.

Таблица 1

Влияние типов скарификации на показатели прорастания *Astragalus sericeocanus*

Тип обработки		Процент прорастания, %	Продолжительность прорастания, сут.	Скорость прорастания, сут.
Контроль		15,7 ± 0,33 ^d	34,0 ± 0,58 ^c	18,1 ± 0,09 ^d
Химическая (продолжительность обработки H ₂ SO ₄ , мин)	2	12,3 ± 0,67 ^d	41,0 ± 0,58 ^a	23,1 ± 0,12 ^a
	10	15,0 ± 0,58 ^d	38,3 ± 0,33 ^b	22,8 ± 0,06 ^b
	20	21,3 ± 1,86 ^c	39,7 ± 0,33 ^{ab}	22,6 ± 0,09 ^b
	40	37,3 ± 1,45 ^b	29,0 ± 0,58 ^d	17,8 ± 0,06 ^c
	60	34,7 ± 1,20 ^b	30,0 ± 0,58 ^d	19,5 ± 0,06 ^c
Механическая		80,7 ± 0,88 ^a	7,3 ± 0,33 ^e	4,8 ± 0,06 ^f

Примеч.: Средние значения в столбцах, за которыми следуют одинаковые буквы, не имеют значимого отличия друг от друга в соответствии с тестом Дункана при $p = 0,05$.

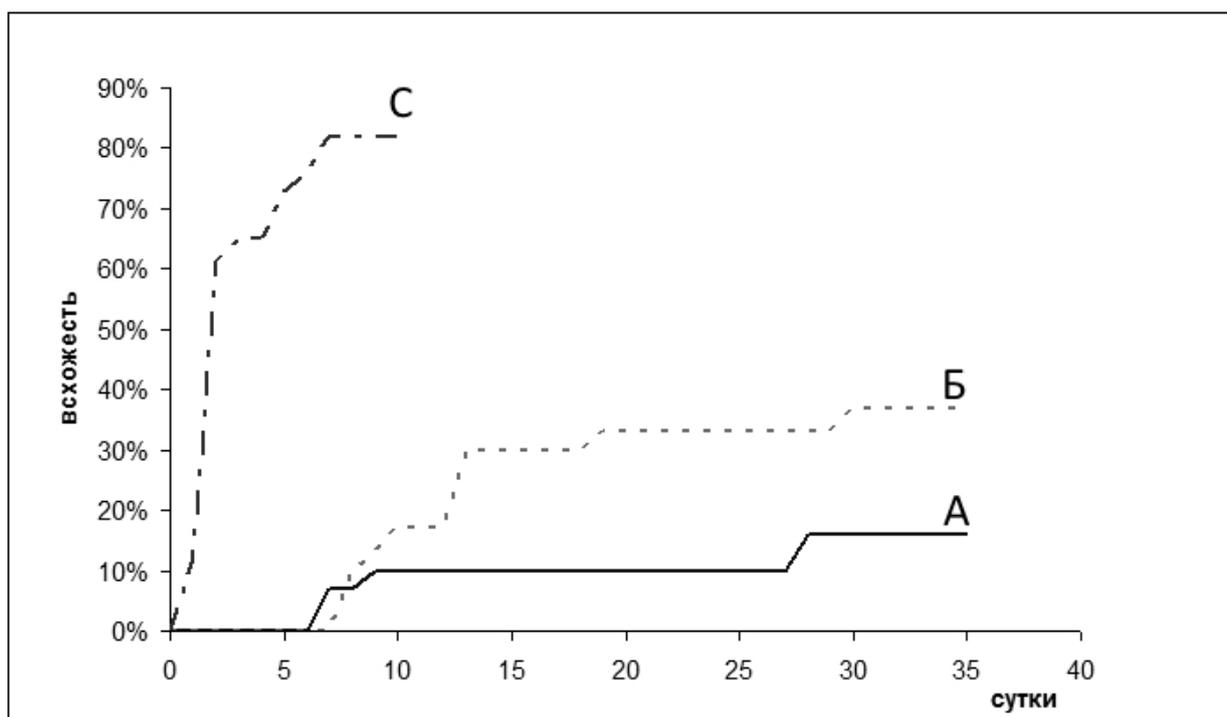


Рис. 1. Динамика прорастания *Astragalus sericeocanus* в зависимости от типов обработки: А – без обработки; Б – химическая скарификация 50%-й серной кислотой (экспозиция 40 мин.); С – механическая скарификация.

Наблюдение за ростом и развитием проростков в контроле и опытных вариантах уже на 2-е сутки показало разницу в набухании семян (табл. 2). Механическая скарификация ускорила развитие проростков в 1,3–2,8 раза в сравнении с контролем и химической скарификацией. Необходимо отметить, что после химической скарификации (экспозиции 20–60 мин.) было

получено наибольшее количество нежизнеспособных проростков. Их доля составила 22,2 %, в то время как выпад при механической обработке семян был 2,2 %. Возможно, это объясняется различной устойчивостью покровов семян к обработкам и токсичностью серной кислоты для зародышей (Sy et al., 2001).

Таблица 2

Сравнительная характеристика этапов развития проростков *Astragalus sericeocanus* в зависимости от типов скарификации

Тип обработки	Этапы развития проростков, сут.		
	Появление зародышевого корня	Раскрытие семядолей	Формирование настоящего листа
Контроль	10–15	20–22	25–30
Химическая (продолжи- тельность обработки H ₂ SO ₄ , мин)	2	10–15	25–30
	10	10–15	25–30
	20	5–7	14–20
	40	5–7	14–20
	60	5–7	14–20
Механическая	2	7–9	10–14

Таким образом, несмотря на простоту использования, скарификация семян 50%-й серной кислотой нецелесообразна для преодоления покоя у *A. sericeocanus*, поскольку процент прорастания семян невысок (40,0 %), а жизнеспособность проростков при данной обработке значительно снижается.

Размножение *Astragalus sericeocanus in vitro*

Культивирование проростков *A. sericeocanus* проводили на индукционных средах, дополненных синтетическим цитокинином – тидиазуром (ТДЗ). Эффективность использования ТДЗ показана на многих растительных объектах, в том числе и для представителей рода *Astragalus*, относящихся к трудно размножаемым видам (Basalma et al., 2008; Erisen et al., 2011; Yorgancilar, Erisen, 2011). Кроме того, использование цитокининов способствует не только пролиферации клеточных культур астрагалов *in vitro*, но и

накоплению в них флавоноидов (Ionkova, 2009).

При выборе типов эксплантов для введения в культуру *in vitro* мы учитывали, что, согласно литературным данным, ткани и органы, содержащие меристемы, наиболее предпочтительны для клонального микроразмножения редких видов, поскольку они устойчивы к генетическим изменениям и остаются стабильными в процессе субкультивирования (Vysotskiy, 1988; Butenko, 1999). Наибольшей регенерационной способностью в нашем эксперименте обладали первичные побеги проростков (частота регенерации от 31,7 до 100 %), развитие которых происходило путем активации пазушных меристем (табл. 3). Начало регенерации было отмечено через 4 недели культивирования на питательных средах, дополненных ТДЗ (рис. 2а), а к концу первого пассажа (через 8 недель культивирования) у эксплантов формировались множественные микропобеги (рис. 2б).

Таблица 3

Влияние ТДЗ на регенерационный потенциал эксплантов *Astragalus sericeocanus in vitro*

Тип морфогенеза	ТДЗ, мг/л	Частота регенерации, %	Число побегов на эксплант, шт.	
			Первый пассаж	Второй пассаж
Прямая регенерация	Первичные побеги проростков			
	0,0	52,3 ^b	0,9 ± 0,16 ^{cd}	1,4 ± 0,15 ^{bc}
	0,05	31,7 ^c	2,8 ± 0,32 ^a	2,9 ± 0,41 ^b
	0,1	100,0 ^a	3,5 ± 0,45 ^a	5,2 ± 0,83 ^a
	0,2	99,8 ^a	2,5 ± 0,29 ^{ab}	6,6 ± 1,44 ^a
	1,0	48,5 ^b	1,4 ± 0,43 ^{bc}	2,0 ± 0,16 ^b
	2,0	0,0 ^d	0,0 ^d	0,0 ^c
	Пазушные почки микропобегов			
	0,0	0,0 ^d	0,0 ^c	0,0 ^d
	0,05	26,1 ^b	2,3 ± 0,44 ^b	4,2 ± 0,46 ^c
	0,1	22,0 ^c	2,6 ± 0,34 ^b	6,0 ± 0,45 ^b
	0,2	31,1 ^a	6,2 ± 0,62 ^a	11,4 ± 0,64 ^a
	1,0	20,3 ^c	0,0 ^c	0,0 ^d
	2,0	0,0 ^d	0,0 ^c	0,0 ^d

Окончание таблицы 3

Тип морфогенеза	ТДЗ, мг/л	Частота регенерации, %	Число побегов на эксплант, шт.	
			Первый пассаж	Второй пассаж
Непрямая регенерация	Гипокотили			
	0,0	0,0 ^c	0,0 ^b	0,0 ^b
	0,05	15,4 ^{*b}	0,0 ^b	0,0 ^b
	0,1	25,0 ^{*a}	5,4 ± 0,50 ^a	7,2 ± 0,42 ^a
	0,2	0,0 ^c	0,0 ^b	0,0 ^b
	1,0	0,0 ^c	0,0 ^b	0,0 ^b
	2,0	0,0 ^c	0,0 ^b	0,0 ^b
	Семядольные листья			
	0,0	0,0 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a
	0,05	38,1 ^{*a}	0,0 ^a	0,0 ^a
	0,1	61,9 ^{*b}	0,0 ^a	0,0 ^a
	0,2	0,0 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a
	1,0	0,0 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a
	2,0	0,0 ^c	0,0 ^a	0,0 ^a
Фактор		<i>P</i>		
Среда		**	**	**
Тип экспланта		**	**	**
Среда × Тип экспланта		**	**	**

Прим.: Средние значения в столбцах, за которыми следуют одинаковые буквы, не имеют значимого отличия друг от друга в соответствии с тестом Дункана при $p = 0,05$. *Образование каллусной ткани. Взаимодействие между факторами Среда × Тип экспланта было оценено с помощью многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). **Значения достоверны при $p = 0,001$.

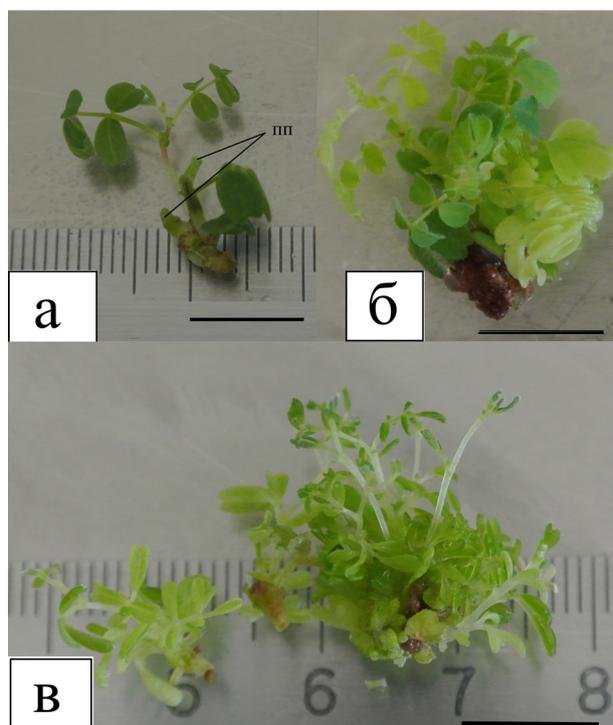


Рис. 2. Прямой органогенез из первичных побегов *Astragalus sericeocanus*: а) образование пазушных побегов (пп) через 4 недели; б) развитие пп через 8 недель культивирования на среде V_3 , дополненной 0,1 мг/л ТДЗ (введение в культуру *in vitro*); в) побеги, сформировавшиеся через 8 недель культивирования на среде V_3 , дополненной 0,2 мг/л ТДЗ (собственно микроразмножение). Масштаб: 1 см.

Кроме того, были выявлены различия в частоте регенерации и образовании пазушных побегов в зависимости от концентраций ТДЗ. Максимальные морфогенный ответ (100,0 % частота регенерации) и число микропобегов ($3,5 \pm 1,44$) были получены на средах с 0,1 мг/л ТДЗ. При изолировании и переносе микропобегов на среды для микроразмножения, содержащие те же концентрации ТДЗ, наблюдался следующий цикл активации роста пазушных меристем. Таким образом, через 8 недель, в течение которых был проведен второй пассаж, коэффициент размножения увеличился до $6,6 \pm 1,44$ под действием 0,2 мг/л ТДЗ, что, вероятно, связано с накоплением регулятора роста в тканях эксплантов (рис. 2в). При использовании в качестве эксплантов частей вегетативных побегов с пазушными почками в основании пазухи листа формировались почки *de novo*, которые в дальнейшем развивались в побеги (рис. 3в, г). Максимальные частота регенерации (31,1 %) и количество адвентивных побегов на этапе введения в культуру *in vitro* (до $6,2 \pm 0,62$) были получены на средах, дополненных 0,2 мг/л ТДЗ. Увеличение концентрации ТДЗ до 1,0 мг/л приводило к уменьшению частоты регенерации (20,3 %), концентрация 2,0 мг/л ТДЗ полностью подавляла регенерационные процессы. Через 8 недель культивирования

регенеранты, полученные под действием ТДЗ, представляли собой конгломераты укороченных микропобегов с длиной менее 0,5 см. Как известно, ТДЗ оказывает тормозящее действие на рост побегов (Hare et al., 1994), поэтому для их элонгации конгломераты помещали на безгормональные среды B_5 в течение 4–6 недель. Затем удлинненные побеги длиной более 1 см культиви-

ровали на средах для собственно размножения в течение 6 недель с последующей элонгацией на безгормональной B_5 в течение 4–6 недель (рис. 3д, е). Мультипликация на данной стадии происходила за счет закладки адвентивных побегов в базальной части эксплантов. Максимальный коэффициент размножения составил $11,4 \pm 0,64$ при концентрации ТДЗ в среде 0,2 мг/л.

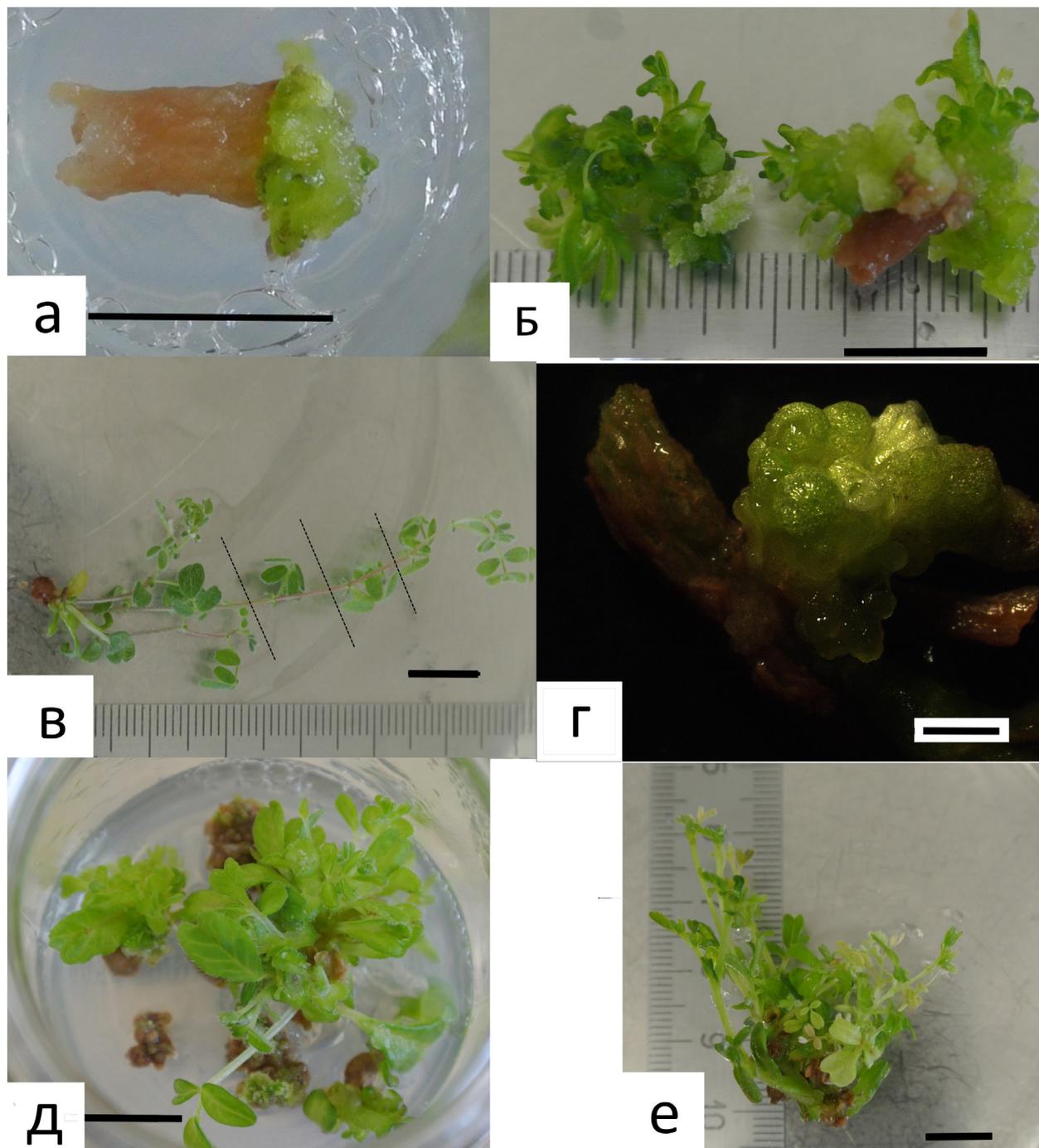


Рис. 3. Адвентивное побегообразование *Astragalus sericeocanus*: а) образование каллусной ткани на гипокотилеях через 10 суток культивирования на среде B_5 с 0,1 мг/л ТДЗ; б) развитие микропобегов в культуре гипокотилей через 8 недель культивирования на среде B_5 с 0,1 мг/л ТДЗ; в) вегетативный побег через 12 недель культивирования; г) закладка адвентивных почек в пазухе листа вегетативного побега через 14 суток культивирования на среде B_5 с 0,2 мг/л ТДЗ; д) конгломераты укороченных побегов через 4 недели культивирования на среде B_5 с 0,2 мг/л ТДЗ; е) микропобегов после элонгации в течение 6 недель на среде B_5 . Масштаб: 1 см.

Кроме регенерации из первичных побегов и пазушных почек микрорастений была изучена возможность развития адвентивных побегов из семядолей и гипокотилей проростков. Начало регенерации при культивировании эксплантов происходило через 10–14 суток (рис. 3). В вариантах с изолированными семядольными листьями в 100 % случаев было отмечено образование компактной неморфогенной каллусной ткани, которая впоследствии некротизировалась (табл. 2). В то же время, у гипокотилей формировались множественные адвентивные почки в первичной каллусной ткани эксплантов на средах с 0,05 и 1,0 мг/л ТДЗ (рис. 3а, б). Частота регенерации составила 15,4 % и 25,0 %, соответственно. Однако жизнеспособные микропобеги (до $5,4 \pm 0,50$) были получены только на среде с 1,0 мг/л ТДЗ. Повторный цикл культивирования микропобегов на среде с 0,1 мг/л ТДЗ в течение 4 недель (стадия собственно размножения) способствовал усилению регенерационной активности эксплантов и увеличению коэффициента размножения до $7,2 \pm 0,42$ побегов на эксплант.

Использование ТДЗ для клонального микро-размножения дикорастущих видов астрагалов показано в ряде работ (Basalma, 2008; Yorgancilar, Erisen, 2011), однако авторы индуцировали формирование побегов через стадию каллусообразования, что нежелательно для размножения *in vitro* редких видов из-за возможной соматоклональной изменчивости. В нашем эксперименте установ-

лены как прямой органогенез из первичных побегов проростков и пазушных почек микрорастений, так и образование адвентивных побегов из каллусных культур, полученных из гипокотилей и семядолей. Наиболее предпочтительной для размножения и сохранения *A. sericeocanus* является прямая регенерация побегов, полученная на этапах индукции и собственно размножения *A. sericeocanus in vitro* на средах Гамборга-Эвелега, дополненных 0,1 и 0,2 мг/л ТДЗ, соответственно.

Биохимический анализ растительного материала

Для оценки состава и содержания вторичных метаболитов в листьях ювенильных растений *A. sericeocanus in vitro* (*U in vitro*), проростках (*P in vivo*) и листьях генеративных растений из природной ценопопуляции (*G in vivo*) проведен ВЭЖХ-анализ. В гидролизатах экстрактов листьев генеративных растений из природной ценопопуляции обнаружено 7 веществ агликоновой природы. Из них идентифицированы: кверцетин, лютеолин, кемпферол, изорамнетин, апигенин. На основании спектральных данных вещества «агликон 1» и «агликон 2» отнесены к агликонам флавоноидов. По содержанию преобладают кверцетин и изорамнетин. Апигенин отсутствует в листьях регенерантов. Кверцетин, лютеолин и агликон 1 не обнаружены в проростках из природной ценопопуляции (табл. 4).

Таблица 4

Спектральная характеристика и содержание агликонов флавоноидов в ювенильных растениях *Astragalus sericeocanus in vitro* (*U in vitro*), в проростках (*P in vivo*) и генеративных растениях из природной ценопопуляции (*G in vivo*) (окр. с. Турки, 2012 г.)

Вещество	Время удерживания, мин.	λ_{\max} , нм	Содержание агликонов флавоноидов, % от массы абсолютно сухого сырья		
			<i>U in vitro</i>	<i>P in vivo</i>	<i>G in vivo</i>
Кверцетин	6,7	255, 370	0,01	н. о.	0,29
Лютеолин	8,4	255, 270, 350	0,01	н. о.	0,15
Агликон 1	9,5	255, 360	0,02	н. о.	0,05
Кемпферол	11,3	265, 366	0,04	0,02	0,05
Агликон 2	11,7	270, 370	0,02	0,01	0,07
Изорамнетин	12,6	254, 370	0,13	0,04	0,18
Апигенин	14	270, 340	н.о.	0,02	0,02
Сумма			0,23	0,09	0,81

Примеч.: «Н. о.» означает «вещество не обнаружено».

При сравнении профилей ФС экстрактов листьев генеративных растений *in vivo* обнаружено около 23 не идентифицированных ФС, в растениях *in vitro* – 21 компонент, в проростках

из природной ценопопуляции – 15 (рис. 4). По спектральным характеристикам среди ФС изученных экстрактов растений преобладают гликозиды флавоноидов. Фенолоксилоты присут-

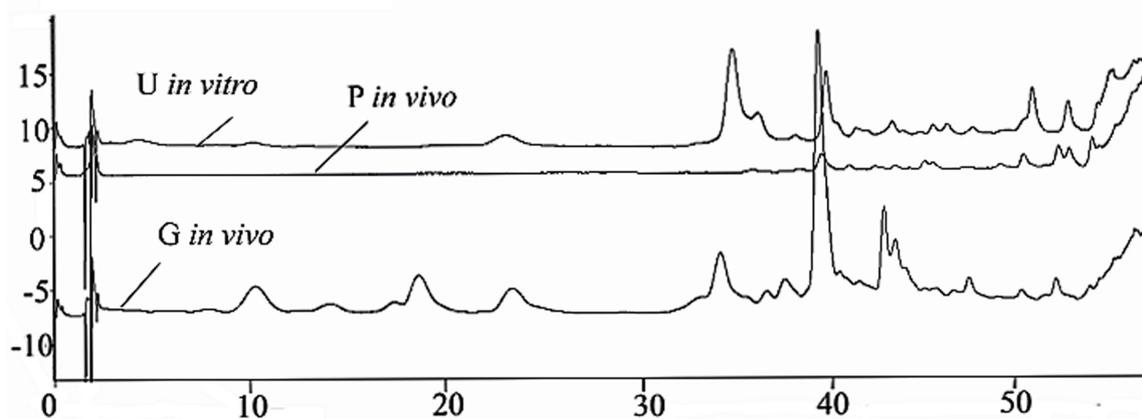


Рис. 4. Хроматограммы экстрактов листьев ювенильных растений *Astragalus sericeocanus in vitro* (U in vitro), проростков (P in vivo) и листьев генеративных растений из природной ценопопуляции (G in vivo) (окр. с. Турки, 2012 г.). По оси абсцисс – время удерживания, мин., по оси ординат – оптическая плотность, е. о. п.

ствуют в незначительном количестве ($t = 39,5, 40,8, 42,6, 43,1, 44, 44,7, 45,4$ мин.), свободных агликонов не обнаружено. Состав (21 компонент) и содержание (1,25 % от массы воздушно-сухого сырья) ФС ювенильных растений *in vitro* подобны составу (23 компонента) и содержанию

(1,22 %) ФС генеративных растений *in vivo*. Обнаружено до 19 общих компонентов, содержание некоторых веществ отличается значительно, соотношение других компонентов близко (табл. 5). В сравниваемых образцах общими являются 12 веществ.

Таблица 5

Содержание фенольных соединений в ювенильных растениях *Astragalus sericeocanus in vitro* (U in vitro), в проростках (P in vivo) и генеративных растениях из природной ценопопуляции (G in vivo) (окр. с. Турки, 2012 г.)

№ соединения	Время удерживания, мин.	Содержание фенольных соединений, % от массы абсолютно сухого сырья		
		U in vitro	P in vivo	G in vivo
1	8	0,02	н. о.	0,01
2	10	0,02	н. о.	0,05
3	14	н. о.	н. о.	0,02
4	17,2	н. о.	н. о.	0,02
5	18,5	н. о.	н. о.	0,07
6	23	0,06	н. о.	0,06
7	34,5	0,27	н. о.	0,13
8	35,7	0,15	0,02	0,02
9	37,7	0,04	0,02	0,05
10	39,2	0,11	0,04	0,26
11	39,5	0,03	н. о.	0,04
12	40,8	0,09	0,01	0,04
13	41,2	0,02	н. о.	н. о.
14	41,7	н. о.	0,01	н. о.
15	42,1	н. о.	н. о.	0,07
16	42,6	0,05	0,007	0,10
17	43,1	0,03	н. о.	0,04
18	44	0,02	0,007	0,02
19	44,7	0,02	0,01	0,03
20	45,4	0,05	н. о.	0,02
21	46,7	0,03	0,01	0,05
22	48,9	0,03	0,03	0,02
23	49,3	0,05	0,04	0,03

Окончание таблицы 5

№ соединения	Время удерживания, мин.	Содержание фенольных соединений, % от массы абсолютно сухого сырья		
		U <i>in vitro</i>	P <i>in vivo</i>	G <i>in vivo</i>
24	49,7	0,07	н. о.	н. о.
25	50,3	н. о.	0,04	н. о.
26	51	н. о.	0,03	н. о.
27	51,5	0,02	0,03	0,04
28	53	0,07	0,07	0,03
Сумма	–	1,25	0,37	1,22

Примеч.: «Н. о.» означает «вещество не обнаружено».

Полученные результаты указывают на высокий биосинтетический потенциал растений-регенерантов *A. sericeocanus*. По литературным данным, использование регуляторов роста цитокининовой природы усиливает накопление вторичных метаболитов в микроклонах (Ionkova, 2009). В настоящем исследовании синтетический цитокинин ТДЗ не только стимулировал регенерацию побегов, но и, возможно, способствовал биосинтезу вторичных метаболитов в культуре.

Заключение

В результате проведенных исследований изучены особенности морфогенеза *A. sericeocanus in vitro*. Установлено, что в культуре первичных побегов проростков и пазушных почек вегетативных побегов регенеранты развивались прямым путем, непосредственно из тканей эксплантов. Содержание фенольных соединений растений *in vitro*, сравнимое с содержанием веществ в расте-

ниях *in vivo*, позволяет сделать вывод о высоком биосинтетическом потенциале микрорастений и перспективности их использования в дальнейших исследованиях по накоплению вторичных метаболитов у данного эндемичного вида.

Благодарности

Выражаем благодарность сотрудникам лаборатории редких и исчезающих растений ЦСБС СО РАН за любезно предоставленные семена растений *A. sericeocanus*, а также лично к. б. н. И. Ю. Селютиной за образцы растений *A. sericeocanus* из природной ценопопуляции.

Работа выполнена в рамках государственного задания ЦСБС СО РАН № 0312-2016-0001 по проекту «Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами». При подготовке публикации использовались материалы биоресурсной научной коллекции ЦСБС СО РАН «Коллекция живых растений в открытом и закрытом грунте», УНУ № USU 440534.

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Altuhov Ju. P.** 2004. The dynamics of gene pools under anthropogenic actions. *Vestnik VOGiS [VOGiS Herald]* 8, 2: 40–59 [In Russian]. (**Алтухов Ю. П.** Динамика генофондов при антропогенных воздействиях // Вестник ВОГиС, 2004. Т. 8, № 2. С. 40–59).
- Basalma D., Uranbey S., Gurlek D., Ozcan S.** 2008. TDZ-induced plant regeneration in *Astragalus cicer*. *Afr. J. Biotechnol.* 7(8): 955–959. DOI: 10.5897/AJB07.628.
- Baskin J. M., Baskin C. C.** 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 14(1): 1–16. DOI: <https://doi.org/10.1079/SSR2003150>.
- Benson E. E., Danaher J. E., Pimbley I. M., Anderson C. T., Wake J. E., Daley S., Adams L. K.** 2000. *In vitro* micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant. *Biodiversity & Conservation* 9(6): 711–726. DOI: 10.1023/A:1008941726419.
- Butenko R. G.** 1999. *Biologiya kletok vysshikh rasteniy in vitro i biotekhnologii na ikh osnove* [Cell biology of higher plants in vitro and biotechnology on their base]. FBK-PRYESS, Moscow, 160 pp. [In Russian]. (**Бутенко Р. Г.** Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.).
- Dewir Y. H., El-Sayed El-Mahrouk M., Naidoo Y.** 2011. Effects of some mechanical and chemical treatments on seed germination of *Sabal palmetto* and *Thrinax morrisii* palms. *AJCS* 5(3): 248–253.
- Erisen S., Atalay E., Yorgancilar M.** 2011. The effect of thidiazuron on the *in vitro* shoot development of endemic *Astragalus cariensis* in Turkey. *Turk. J. Bot.* 35(5): 521–526. DOI:10.3906/bot-1009-74.

Gamborg O. L., Eveleigh D. E. 1968. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem.* 46(5): 417–421.

Global strategy for plant conservation: 2011-2020. 2012. Convention on biological diversity. BGGI, Richmond, UK, 36 pp.

Gorbunov Yu. N., Dzybov D. S., Kuzmin Z. E., Smirnov I. A. 2008. Methodological recommendations for botanic gardens on the reintroduction of rare and threatened plants. Grif & Co, Tula – Moscow, 53 pp. URL: http://www.mobot.org/bep/pdf/Reintroduction_manual_engl.pdf

Hare P. D., Staden J., Van Staden J. 1994. Inhibitory effect of TDZ on the activity of cytokinin oxidase isolated from soybean callus. *Plant Cell Physiol.* 35(8): 1121–1125.

Hussain Md. S., Fareed S., Ansari S., Rahman Md. A., Ahmad I. Z., Saeed M. 2012. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* 4(1): 10–20. DOI: 10.4103/0975-7406.92725.

Ionkova I. 1995. *In vitro* cultures and formation of secondary metabolites in *Astragalus*. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants, VIII.* Ed. Y. P. Bajaj. Springer – Verlag, Berlin, 97–138 pp.

Ionkova I. 2009. Optimization of flavonoid production in cell cultures of *Astragalus missouriensis* Nutt. (Fabaceae). *Phcog Mag.* 5(18): 92–97.

International rules for seed testing (ISTA). 1993. *Seed Science and Technology* 21: 160–186.

Khramova E. P., Komarevtseva E. K. 2008. Variability of flavonoids composition in *Potentilla fruticosa* (Rosaceae) leaves at different age states in the conditions of the Mountain Altai. *Plant Resources* 44, 3: 96–102 [In Russian]. (Храмова Е. П., Комаревцева Е. К. Изменчивость флавоноидного состава листьев *Potentilla fruticosa* (Rosaceae) разных возрастных состояний в условиях Горного Алтая // Раст. ресурсы, 2008. Т. 44. № 3. С. 96–102).

Konichenko E. S., Selyutina I. Yu., Dorogina O. V., Sandanov D. V. 2014. Karyotype studies endemic plant species *Astragalus sericeocanus* Gontsch. (Fabaceae) around Lake Baikal, Siberia. *Caryologia* 67(2): 172–177. 10.1080/00087114.2014.931639.

Krivenko D. A. 2015. *Endemiki pribaykalya Astragalus olchonensis* Gontsch. i *Astragalus sericeocanus* Gontsch. (Fabaceae): ekologo-biologicheskie osobennosti tsenopopulyatsiy, voprosy filogenii, okhrana [Astragalus olchonensis Gontsch. and Astragalus sericeocanus Gontsch. (Fabaceae) are the endemics of Pribaikalye: ecological and biological characteristics of cenopopulations, phylogeny questions, conservation]. Abstract of Dis. ... PhD. biol. sciences. Tomsk, 18 pp. [In Russian]. (Кривенко Д. А. Эндемики Прибайкалья *Astragalus olchonensis* Gontsch. и *Astragalus sericeocanus* Gontsch. (Fabaceae): эколого-биологические особенности ценопопуляций, вопросы филогении, охрана: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Томск, 2015. 18 с.).

Lin L.-Z., He X.-G., Lindenmaier M., Nolan G., Yang J., Cleary M., Qiu S.-X., Cordell A. G. 2000. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry study of the flavonoids of the roots of *Astragalus mongholicus* and *A. membranaceus*. *J. Chromatogr. A.* 876(1–2): 87–95.

Maksimov O. B., Kulesh N. I., Gorovoy P. G. 2002. *Polifenoly dalnevostochnykh rasteniy* [Polyphenols Far Eastern plants]. Dalnauka, Vladivostok, 332 pp. [In Russian]. (Максимов О. Б., Кулеш Н. И., Горовой П. Г. Полифенолы дальневосточных растений. Владивосток: Дальнаука, 2002. 332 с.).

Nikolaeva M. G. 2001. Ecological and physiological aspects of seed dormancy and germination (review of investigations for the last century). *Bot. Zhurn. (Moscow & St. Peterburg)* 86(12): 1–14 [In Russian]. (Николаева М. Г. Эколого-физиологические особенности покоя и прорастания семян (итоги исследований за истекшее столетие) // Бот. журн, 2001. Т. 86, № 12. С. 1–14).

Novikova T. I. 2013. Use of biotechnological approaches for the conservation of plant biodiversity. *Plant Life of Asian Russia* 12(2): 119–128 [In Russian]. (Новикова Т. И. Использование биотехнологических подходов для сохранения биоразнообразия растений // Растительный мир Азиатской России, 2013. Т. 12, № 2. С. 119–128).

Pathak M. R., Abido M. S. 2014. The role of biotechnology in the conservation of biodiversity. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* 2(4): 352–363.

Ranal M. A., De Santana D. G. 2006. How and why to measure the germination process? *Revista Brasil. Bot.* 29(1): 1–11.

Rao S. R., Ravishankar G. A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20(2): 101–153. DOI: 10.1016/S0734-9750(02)00007-1.

Sandanov D. V., Krivenko D. A. 2013. *Astragalus sericeocanus* Gontsch. In: *The Red Data Book of Republic of Buryatia: Rare and endangered species of animals, plants and fungi.* Buryat Scientific Center SB RAS Publisher, Ulan-Ude, 518–519 pp. [In Russian]. (Санданов Д. В., Кривенко Д. А. Астрagal шелковисто-седой. *Astragalus sericeocanus* Gontsch. // Красная книга Республики Бурятия: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных, растений и грибов. Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2013. С. 518–519).

Selyutina I. Yu., Konichenko E. S., Dorogina O. V. 2014. The possibility of using ISSR-markers for detection of genetic differentiation of populations of rare species of *Astragalus sericeocanus* (Fabaceae). *Plant Life of Asian Russia* 16, 4: 3–8 [In Russian]. (Селютина И. Ю., Кониченко Е. С., Дорогина О. В. Возможности использования ISSR-маркеров для выявления генетической дифференциации популяций редкого вида *Astragalus sericeocanus* (Fabaceae) // Растительный мир Азиатской России, 2014. Т. 16, № 4. С. 3–8).

Semenova G. P. 2007. *Redkiye i ischezayushchiye vidy flory Sibiri* [Rare and endangered species of Siberia flora]. Geo, Novosibirsk, 408 pp. [In Russian]. (**Семенова Г. П.** Редкие и исчезающие виды флоры Сибири. Новосибирск: Академ. изд-во «Гео», 2007. 408 с.).

Sidneva O. V. 2006. *Khemotaksonomicheskoe issledovanie vidov sekcii Cenanthrum Koch roda Astragalus L. (Fabaceae Lindl.) Sibiri* [Chemotaxonomic study of Siberia Astragalus L species of the section Cenanthrum Koch (Fabaceae Lindl.)]. Abstract of Dis. ... PhD. biol. sciences. Novosibirsk, 16 pp. [In Russian]. (**Сиднева О. В.** Хемотаксономическое исследование видов секции *Cenanthrum* Koch рода *Astragalus* L. (Fabaceae Lindl.) Сибири: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2006. 16 с.).

Song Ch., Zheng Zh., Liu D., Hu Zh., Sheng W. 1997. Pterocarpan and isoflavans from *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge. *Zhiwu Xuebao* 39(12): 1169–1171.

Sy A., Grouzis M., Danthu P. 2001. Seed germination of seven Sahelian legume species. *J. Arid. Environ.* 49, 4: 875–882. DOI: 10.1006/jare.2001.0818.

Tang W., Eisenbrand G. 1992. *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. In: *Chinese drugs of plant origin: chemistry, pharmacology and use in traditional and modern medicine*. Springer – Verlag, Berlin, 191–197 pp.

Vydrina S. N. 1994. *Astragalus* L. In: *Flora Sibiri* [Flora of Siberia]. Т. 9: Fabaceae (Leguminosae). Sibirskaya izdatelskaya firma VO "Nauka", Novosibirsk, 20–71 pp. [In Russian]. (**Выдрина С. Н.** Астрagal // Флора Сибири. Т. 9: Fabaceae (Leguminosae). Новосибирск: Сибирская издательская фирма ВО «Наука», 1994. С. 20–71).

Vysotskiy V. A. 1998. *Biotekhnologicheskiye metody v sisteme proizvodstva ozdorovlennogo posadochnogo materiala i selekcii plodovykh i yagodnykh rasteniy* [Biotechnological methods for production and breeding of redeveloped fruit and berry plant material]. Abstract of Dis. ... Dr. agricultural sciences. Moscow, 44 pp. [In Russian]. (**Высоцкий В. А.** Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала и селекции плодовых и ягодных растений: автореф. дисс... д-ра с.-х. наук. М., 1998. 44 с.).

Yorgancilar M., Erisen S. 2011. The effect of thidiazuron (TDZ) on shoot regeneration of *Astragalus schizopterus*. *Journal of Animal and Plant sciences* 21(3): 519–524.

Zhmud E. V., Elisafenko T. V., Krivenko D. A., Verkhozina A. V., Zviagina N. S., Dorogina O. V. 2012. State of coenopopulations of *Astragalus sericeocanus* (Fabaceae), an endemic species of the eastern coast of Baikal lake. *Bot. Zhurn. (Moscow & St. Peterburg)* 97(10): 1310–1320 [In Russian]. (**Жмудь Е. В., Елисафенко Т. В., Кривенко Д. А., Верхозина А. В., Звягина Н. С., Дорогина О. В.** Состояние ценопопуляций *Astragalus sericeocanus* (Fabaceae) – эндемика восточного побережья озера Байкал // Бот. журн., 2012. Т. 97, № 10. С. 1310–1320).

Zhuravlev Yu. N., Koren O. G., Muzarok, T. I., Reunova G. D., Kozurenko M. M., Artyukova E. V., Pyushko M. V. 1999. Molecular markers for the conservation of plants rare species of the Far East. *Fiziologiya rasteniy* [Russian Journal of Plant Physiology] 46(6): 838–848 [In Russian]. (**Журавлев Ю. Н., Корень О. Г., Музарок Т. И., Реунова Г. Д., Козыренко М. М., Артюкова Е. В., Илюшко М. В.** Молекулярные маркеры для сохранения редких видов растений Дальнего Востока // Физиология растений, 1999. Т. 46, № 6. С. 838–848).