

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.142:57.085(571.6)

СОХРАНЕНИЕ ГЕНОФОНДА ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СЕМЯН

© 2008 г. А. Б. Холина, Н. М. Воронкова

Биолого-почвенный институт ДВО РАН, 690022 Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159
E-mail: kholina@biosoil.ru

Поступила в редакцию 20.12.2006 г.

Изучена криоустойчивость семян 103 видов растений 33 семейств из пяти регионов Дальнего Востока России. Показано, что 89.1% изученных видов не снижали жизнеспособности семян в процессе криохранения. Для 6 видов выявлена межпопуляционная изменчивость ответной реакции семян на действие сверхнизких температур (-196°C). Замораживание семян в жидком азоте, вызывающее глубокий анабиоз, может быть использовано в качестве режима их долговременного хранения. Предварительная оценка генетического разнообразия на популяционном уровне позволяет проводить максимально полную мобилизацию генофонда вида. Полученные результаты являются важным этапом при разработке научной основы для создания банка семян дальневосточной дикорастущей полезной флоры с целью сохранения и восстановления природных ресурсов.

Угроза реального исчезновения множества видов растений диктует создание в разных странах Национальных программ по сохранению природных генетических ресурсов. В связи с этим возрастает интерес к банкам зародышевых плазм семян, меристем, пыльцы и культур клеток как единственному средству долговременного хранения геномов и сбережения генетических стандартов культурных и дикорастущих растений (Roos, 1989; Pence, 1991; Rao, 2004; Panis, Lambardi, 2005). Наиболее перспективным режимом хранения семян считается криоконсервация – замораживание в жидком азоте при температуре -196°C , к настоящему времени широко применяемая для хранения семян культивируемых видов (Молодкин, 1984; Jorgensen, 1990; Gonzales-Benito *et al.*, 1997). В отличие от других режимов криоконсервация семян является надежным, простым и экологически чистым методом хранения, поскольку только замораживание в жидком азоте приводит к практически полной остановке метаболизма и обеспечивает длительное хранение семян (Bonner, 1990). Криоконсервация позволяет исключить истощение запасных веществ, накопление токсинов, распад и инактивацию ферментных комплексов, самоокисление липидов (Stanwood, 1985); применение этой технологии снижает до минимума риск генетических и эпигенетических изменений (Bonner, 1990; Panis, Lambardi, 2005). Использование низкотемпературных банков семян позволяет сохранить биологическое разнообразие видов и поддерживать стабильность генотипов, что особенно важно для редких и исчезающих видов. Исследования по изучению влияния глубокого замораживания на жизнеспособность семян дикорастущих растений в нашей стране немногочисленны.

Их обзор представлен в работе Тихоновой (1999). Результаты работ по изучению реакции семян дальневосточных растений на действие сверхнизких температур частично опубликованы нами ранее (Воронкова и др., 2000, 2003; Холина, Воронкова, 2001).

Изучение данного вопроса особенно актуально для обитателей растительных сообществ Дальнего Востока России – представителей прибрежной и горной вулканической растительности, редких, реликтовых, эндемичных и лекарственных растений. Риск исчезновения этих экосистем и составляющих их видов чрезвычайно высок как в силу естественных причин (извержения вулканов, пожары, колебания уровня моря, периодические штормы, оползни и другие катастрофические воздействия), так и антропогенного давления (высокая рекреационная нагрузка и хозяйственная деятельность). Для уникальных ценозов Дальнего Востока, таких как природный парк о-ва Монерон, экосистемы вулканов Курил и Камчатки, важно сохранение генофонда не только отдельных ценных видов, но и наиболее полное представительство сообщества в банке семян. Известно, что общепринятый режим хранения семян при 5°C не является надежным, так как низкие положительные температуры замедляют потерю жизнеспособности, но не обеспечивают долговременного хранения (Roos, 1989; Николаева и др., 1992). Для семян дальневосточных растений, формирующихся в стрессовых природных, а иногда и антропогенных условиях обитания, вплоть до критических, где довольно часто бывает снижена семенная продуктивность и качество семян, единственно приемлемым режимом хранения является глубокое замораживание семян.

Для того чтобы оценить возможность применения криоконсервации для сохранения генофонда дальневосточных растений, мы исследовали криоустойчивость семян при прямом погружении в жидкий азот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в 1997–2006 гг. Объектами исследования служили семена 103 видов дальневосточных растений из 33 семейств. Семена собирали в 124 природных популяциях на юге Приморского края (18 видов), на Камчатке (30 видов), о-вах Курильской гряды (29 видов), о-вах Сахалине (19 видов) и Монероне (14 видов). После сбора семена хранили до начала опыта в течение 2–4 мес. в лаборатории при 20–25°C (до обретения ими равновесной влажности). Жизнеспособность семян при глубоком замораживании зависит от степени их влажности, поскольку известно, что только в определенном диапазоне ее значений семена могут быть устойчивы к действию сверхнизких температур и сохранять начальные посевные качества. Ортодоксальные семена, с влажностью ниже критической, по сравнению с рекальцитрантными более благополучно переносят замораживание (Jorgensen, 1990; Тихонова, 1999). На данном этапе наших исследований были использованы только ортодоксальные семена, влажность которых находилась в пределах 5–10%.

Глубокое замораживание семян в течение 1 мес. проводили путем непосредственного погружения в жидкий азот. Перед погружением в азот семена заворачивали в алюминиевую фольгу. В контроле семена в течение этого месяца хранили в лаборатории при 20–25°C. Отогревали семена 2 ч при комнатной температуре и ставили на проращивание. Проращивали семена в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге в термостате в условиях естественного освещения (16 ч на свету, 8 ч в темноте). Для большинства исследованных видов данные о типе покоя и режиме проращивания семян отсутствуют, поэтому вначале все семена проращивали при температуре не менее 18°C. Если семена не проросли, их подвергали либо холодной стратификации при температуре 2–5°C в течение 2–4 мес., либо скарификации (обработке серной кислотой в течение 30, 45 и 60 мин с последующим промыванием в проточной воде), учитывая рекомендации по проращиванию семян близких видов (Николаева и др., 1992). Семена ряда изученных растений подвергали холодной стратификации сразу после размораживания.

Жизнеспособность семян оценивали по лабораторной всхожести, наблюдения за ходом прорастания вели ежедневно. Всхожесть определяли как отношение числа проросших семян к числу

заложенных на проращивание, выраженное в процентах. Для анализа динамики прорастания учитывали начало прорастания и определяли показатель T_{50} – число суток, в течение которых всхожесть достигала 50%. В опыте использовали пробы семян по 50 шт. в 3-кратной повторности (для некоторых видов по 25 шт.). Результаты были обработаны статистически, определены средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий полученных результатов по вариантам опыта оценивали по критерию Стьюдента при уровне значимости $P = 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные экспериментальные данные показали, что семена всех видов при равновесной влажности после глубокого замораживания сохраняют жизнеспособность, но их реакция видоспецифична (таблица). У большинства исследованных видов (74.5%) семена после криоконсервации сохраняют всхожесть на уровне контроля, для части видов (14.6%) жизнеспособность семян достоверно увеличивается. Снижение всхожести после криогенного воздействия наблюдали у 11 видов (10.9% от числа изученных), минимальное падение всхожести отмечено у *Hemerocallis esculenta* (на 5%), максимальное у *Epilobium cephalostigma* (на 31%), в среднем составляя $16.2 \pm 7.5\%$. Следует отметить, что для 4 видов – *Cardamine impatiens*, *Hemerocallis esculenta*, *Papaver mtyabeanum*, *Plantago lanceolata* – всхожесть после криоконсервации, при достоверном снижении от уровня контроля, составляет 80–90%. Количество видов, всхожесть семян которых снижается после криогенного воздействия, варьирует по регионам с увеличением в ряду: Сахалин (5.2%) – Камчатка (10%) – Курилы (10.3%) – Приморье (11.1%) – Монерон (14.3%) (рис. 1).

Известно, что негативное влияние глубокого замораживания на прорастание семян обусловлено рядом факторов, среди которых физические повреждения семян в процессе замораживания–оттаивания, влажность семян, их химический состав (Stanwood, 1985; Jorgensen, 1990; Pita *et al.*, 1998). При этом многие экспериментальные работы показали доминирующее значение состава липидов для устойчивости клеток при замораживании (Stanwood, 1985; Vertucci, 1989; Попов, 1993). Для видов с ортодоксальными семенами установлено, что при одинаково низкой влажности семена с высоким содержанием липидов более чувствительны к криогенному воздействию (Stanwood, 1985; Pence, 1991; Орехова, 2005), что может быть связано с фазовыми переходами липидов при быстром замораживании до сверхнизких температур (Stanwood, 1985; Vertucci, 1989). Для 3 (*Cardamine impatiens*, *Plantago lanceolata*, *Salicornia europaea*) из 11 видов, показавших сни-

Жизнеспособность семян дальневосточных растений после криоконсервации

Семейство	Число видов					Реакция на криоконсервацию*		
	Приморье	Камчатка	Курилы	Сахалин	Монерон	I	II	III
Apiaceae					1		1	
Asteraceae	1	11	3	2	1	15	2	1
Boraginaceae		1			1		2	
Brassicaceae			4	3	2	7	1	1
Campanulaceae	1					1		
Caryophyllaceae	3				1	4		
Colchicaceae					1	1		
Chenopodiaceae	3					1		2
Crassulaceae		3			1	2	2	
Empetraceae			1			1		
Ericaceae		2	1		1	3	1	
Fabaceae	4		1	1		6		
Grossulariaceae		1				1		
Hemerocallidaceae				1	1	1		1
Iridaceae			1			1		
Juncaceae			1			1		
Juncaginaceae	1					1		
Liliaceae	1	1				2		
Onagraceae			1					1
Papaveraceae			1					1
Plantaginaceae	1		1	2		3		1
Plumbaginaceae		1				1		
Poaceae			1			1		
Polygonaceae	1		1	1			2	1
Portulacaceae			1			1		
Primulaceae			1				1	
Ranunculaceae	1		1	3	1	5	1	
Rosaceae		4	2	4		9	1	
Saxifragaceae		4		1		3		2
Scrophulariaceae		2	5		2	7	2	
Urticaceae					1			1
Valerianaceae	1			1		2		
Violaceae			2			2		
Итого	18	30	29	19	14	82	16	12

* I – всхожесть семян после замораживания осталась на уровне контроля; II – всхожесть достоверно увеличилась по сравнению с контролем; III – всхожесть достоверно снизилась по сравнению с контролем.

жение всхожести после криоконсервации в наших опытах, известно, что их семена характеризуются высоким содержанием липидов, триглицеридов и жирных кислот (Растительные ресурсы СССР, 1986, 1990; Растительные ресурсы России ..., 1996). Криохранение семян таких видов требует разработки определенных приемов подготовки семян к глубокому замораживанию.

Количество видов, для которых отмечено достоверное увеличение всхожести семян после криообработки, также варьирует по регионам (рис. 1) с увеличением в ряду: Камчатка (10%) – Монерон (14.3%) – Сахалин (21.1%) – Курилы (27.6%) – Приморье (33.3%). В целом анализ распределения видов по типу реакции на глубокое замораживание по регионам Дальнего Востока

России выявляет определенную тенденцию – в направлении с севера на юг увеличивается число видов, для которых воздействие ультранизких температур стимулирует прорастание семян (рис. 1). При этом на Камчатке отмечено максимальное число видов (80%), семена которых не реагируют на замораживание. Растения этого региона представлены в основном горными видами, обитающими на макросклонах вулканов, в суровых климатических условиях с сильными ветрами и низкими среднегодовыми температурами. Вероятно, здесь семена растений более адаптированы к холоду по сравнению с семенами растений других регионов, где были исследованы в основном прибрежные виды. Некоторое отклонение от этого тренда, обнаруженное для семян растений о-ва Монерон, где стимулирующее действие жидкого азота показано только для 14,3% видов, может быть связано с достаточно суровыми климатическими условиями острова. Ветреная и холодная весна, туманное лето с обильными дождями и штормовыми ветрами, сильно снижающими фактическую температуру воздуха, в немалой степени способствуют формированию адаптаций семян к действию низких температур. Известно, что зимующие растения, обладающие способностью к интенсивному закаливанию, могут выдерживать глубокое замораживание, в то же время клетки теплолюбивых растений также способны выдержать замораживание без необратимых повреждений, но только после соответствующей подготовки. Именно на основе механизма формирования естественной криоустойчивости разработаны различные способы замораживания побегов и меристем растений, включающие предварительный этап закаливания (Попов, 1993; Мануильский, Шалин, 1995; Panis, Lambardi, 2005). Можно предположить, что в суровых условиях существования после естественной закалки и низкотемпературной стабилизации растительные клетки приобретают устойчивость к стрессу, возникающему в процессе криоконсервации. Для более основательных выводов о влиянии географического расположения растений на криоустойчивость их семян необходимы исследования на более обширном материале с привлечением растений из разнообразных экотопов. В связи с этим интересно отметить, что анализ криоустойчивости семян 90 видов растений Австралии (Touchell, Dixon, 1993) показал стимулирующее влияние азота на прорастание семян 34,4% изученных видов.

Хранение семян при ультранизких температурах определенным образом влияет на динамику появления всходов. Для большинства изученных видов (91,3%) прорастание семян в контроле и опыте начиналось одновременно, у 7,6% видов криохранение способствовало более быстрому прорастанию семян, семена *Salicornia europaea* в

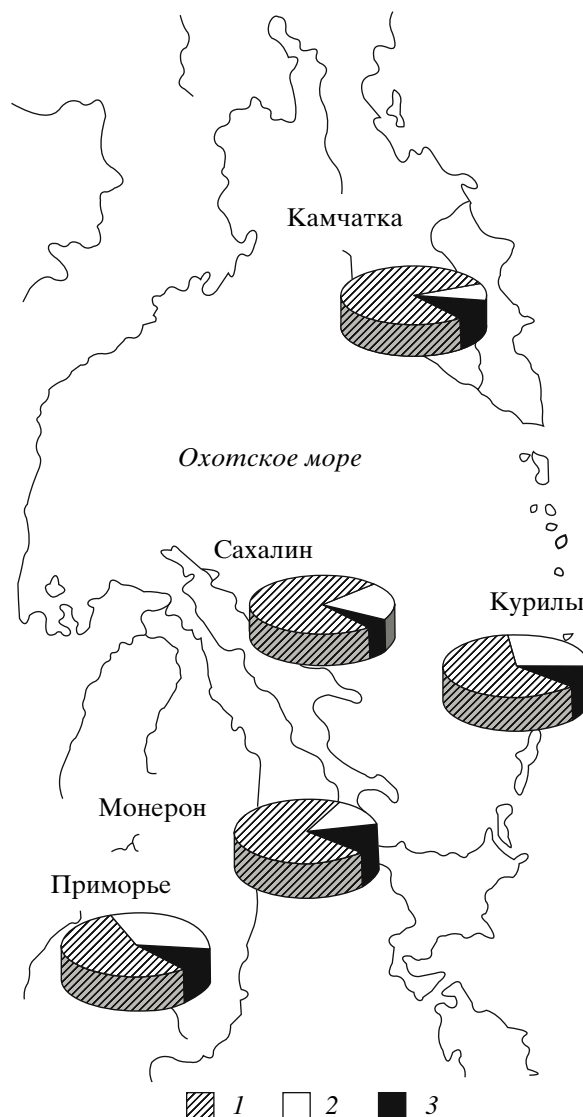


Рис. 1. Влияние криоконсервации (-196°C) на прорастание семян некоторых дикорастущих видов флоры Дальнего Востока России: 1 – доля растений, всхожесть семян которых после замораживания осталась на уровне контроля, 2 – всхожесть семян увеличилась по сравнению с контролем, 3 – всхожесть семян снизилась по сравнению с контролем.

опыте прорастали на 2–4 сут позднее. Достижение 50%-ной всхожести (T_{50}) происходило одновременно в контроле и опыте для 76,9% видов. Более активное появление всходов в опыте отмечено для 17,3% видов, а для *Erysimum pallasii* (в одной из изученных популяций), *Triglochin palustris*, *Epilobium cephalostigma* показатель T_{50} в опыте был ниже, чем в контроле. Таким образом, и для хода прорастания деконсервированных семян характерна видовая специфика. На рис. 2 представлен ход прорастания семян 8 редких и эндемичных видов. *Myosotis sachalinensis* и *Saxifraga purpurascens* являются эндемиками, оставшиеся 6 видов

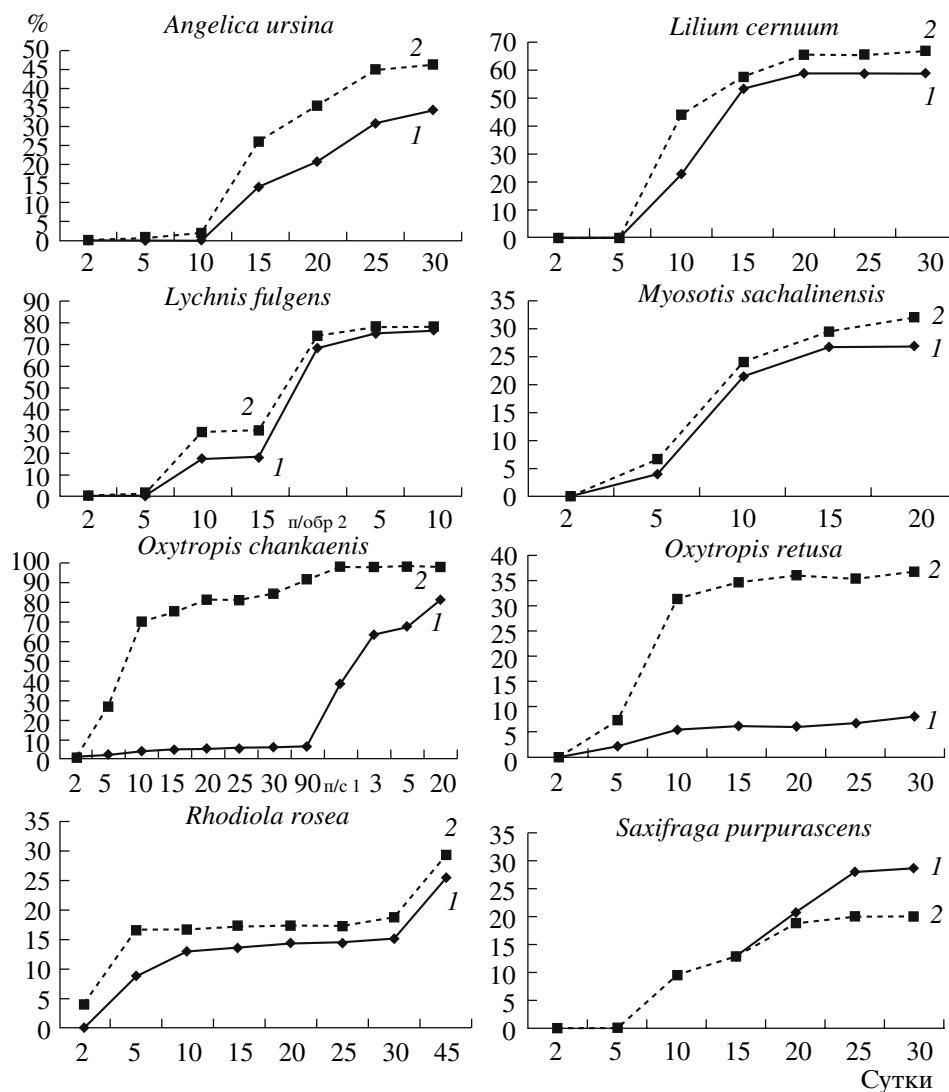


Рис. 2. Влияние криоконсервации (-196°C) на ход прорастания семян восьми редких и эндемичных растений Дальнего Востока России. 1 – ход прорастания в контроле, 2 – в опыте; п/с – после скарификации (для *Oxytropis chankaensis*), п/обр – после стратификации (для *Lychnis fulgens*). По оси абсцисс – время проращивания, сут; по оси ординат – всхожесть, %.

рекомендованы к охране на Дальнем Востоке России (Харкевич, Качура, 1981); из них *Lilium cernuum*, *Oxytropis chankaensis* и *Rhodiola rosea* включены в готовящуюся Красную книгу Приморского края (Перечень..., 2002). За исключением *Saxifraga purpurascens*, жизнеспособность семян при низкотемпературном хранении не снижается, а для 4 редких видов достоверно увеличивается по сравнению с контролем, при этом для двух видов *Oxytropis* очевидно влияние криоконсервации как на жизнеспособность семян, так и на динамику появления проростков (рис. 2).

Рост и развитие растений из замороженных семян, как показали исследования, проведенные под руководством Тихоновой (1999) для 30 видов дикорастущих растений, протекают нормально,

криохранение семян не влияет достоверно на морфологические показатели растений. Обнаруженные у отдельных видов отличия опытных растений от контрольных по ряду признаков побегов не выходили за рамки природной и интродукционной изменчивости. Нормальное развитие растений из семян после хранения в жидком азоте показано для 7 видов орхидных (Никишина и др., 2001; Popov *et al.*, 2004), редкого вида *Melandrium dioicum* (Арапетян и др., 2004). Наши данные по влиянию криогенной обработки семян на развитие сеянцев согласуются с полученными ранее результатами. Например, изучение динамики роста растений *Sophora flavescens* из семян после глубокого замораживания не выявило значительных отклонений (Воронкова, Холина, 2003). Несмот-

ря на некоторое отставание в темпах роста сеянцев в начале вегетационного периода, к концу сезона достоверных различий биометрических показателей между контролем и опытом не было обнаружено.

Анализ реакции на криоконсервацию представителей различных семейств показал, что семена систематически близких видов неодинаково реагируют на замораживание. Так, для 83% изученных представителей сем. Asteraceae характерно сохранение жизнеспособности на уровне контроля (таблица), но для *Erigeron thunbergii* отмечено уменьшение всхожести, а для *Arnica unalaschcensis* и *Tripolium pannonicum* – увеличение. Для большинства изученных представителей семейств Ranunculaceae, Rosaceae и Scrophulariaceae также не отмечено достоверной разницы между контрольным и опытным вариантом (таблица), за исключением видов *Anemonastrum sachalinensis* (Ranunculaceae), *Scrophularia grayana* и *Veronica americana* (оба вида Scrophulariaceae), замораживание семян которых привело к увеличению всхожести. Увеличение жизнеспособности семян ряда видов может быть вызвано активизацией ферментного комплекса семян при криоконсервации, отмеченной ранее для некоторых культурных (Стрибуль, 1993) и дикорастущих видов (Тихонова и др., 1997). При полном отсутствии прорастания семян *Fragaria yezoensis* (Rosaceae) в контроле всхожесть после замораживания составила 34%. Такой эффект может быть связан с преодолением экзогенного типа покоя под действием сверхнизких температур. Однако для прорастания семенам *Fragaria* требовалась стратификация, что указывает на наличие комбинированного покоя. Стимулирующее влияние замораживания на прорастание семян с плотной кожурой и экзогенным типом покоя в полной мере проявляется на семенах дикорастущих представителей сем. Fabaceae, всхожесть которых после криоконсервации достоверно увеличивается (таблица, рис. 2) (два вида *Oxytropis*) иногда в 3–15 раз (Холина, Воронкова, 2001). Предполагается, что в результате резкого перепада температур происходят повреждения семенной кожуры либо перестройки липидного комплекса, что приводит к увеличению проницаемости. В данном случае криоконсервация заменяет предпосевную механическую или химическую скарификацию семян. Нарушение твердосемянности под действием жидкого азота показано для исследованных ранее видов дикорастущих бобовых (Pritchard *et al.*, 1988; Shibata *et al.*, 1995). Сравнительный анализ жизнеспособности семян дальневосточных видов бобовых при различных режимах хранения (в лаборатории при комнатной температуре, неглубокое замораживание при –10 и –20°C, глубокое замораживание) показал очевидные преимущества криоконсервации для преодоления покоя и ускорения прораста-

ния (Холина, Воронкова, 2001; Воронкова, Холина, 2003).

Реакция семян разных видов одного рода на действие жидкого азота была в основном сходной. Из 18 родов, для которых было исследовано от 2 до 6 видов, семена представителей 9 родов (*Arabis*, *Artemisia*, *Cardaminopsis*, *Patrinia*, *Pedicularis*, *Picris*, *Potentilla*, *Trollius*, *Viola*) не реагировали на криовоздействие. Для 5 родов (*Arnica*, *Oxytropis*, *Rhodiola*, *Rhododendron*, *Veronica*) наряду с отсутствием реакции было отмечено стимулирующее влияние замораживания на прорастание. Всхожесть семян представителей 4 родов (*Cardamine*, *Erigeron*, *Plantago*, *Saxifraga*) после замораживания либо оставалась без изменения, либо понижалась. Изучение реакции на криовоздействие видов одного рода имеет большое значение при разработке способов долговременного хранения семян редких видов (Pence, 1991). Так как у редких, эндемичных и реликтовых видов, как правило, невысокие показатели плодоношения и образуется небольшое количество семян, изучение последствий криоконсервации на семенах близких широко распространенных видов позволяет прогнозировать вероятность выживания и сохранения жизнеспособности семян уязвимых видов при хранении в жидком азоте. Однако следует учитывать тот факт, что семена близких видов в ряде случаев реагируют на криообработку неодинаково, что может быть вызвано различиями свойств семян – их размеров, влажности, химического состава, наличия и глубины покоя.

В то же время криоустойчивость семян, собранных в разных природных популяциях, иногда варьирует и на уровне вида (Тихонова и др., 1996). Поскольку этот факт необходимо учитывать при создании репрезентативной коллекции семян, мы оценили жизнеспособность семян различных популяций одного и того же вида после замораживания. В экспериментах 20 видов растений из 11 семейств были представлены 2–3 популяциями, при этом межпопуляционная изменчивость реакции семян на действие сверхнизких температур была выявлена для 6 видов (рис. 3). В одной популяции (или двух, если исследовали три) отсутствовала реакция на криоконсервацию, в другой – всхожесть семян после замораживания увеличивалась (*Arnica unalaschcensis*, *Rhododendron aureum*, *Primula cuneifolia*), или понижалась (*Hemerocallis esculenta*, *Papaver miyabeum*, *Saxifraga purpurascens*). Подобные различия могут быть вызваны либо случайными причинами, либо проявлением криптической природной изменчивости на межпопуляционном уровне. В то же время нельзя исключать влияние экологических условий их мест обитания. Для исследованных территорий характерно разнообразие экологических ниш с множественными почвенными и микроклиматическими вариациями, что оказывает значительное влия-

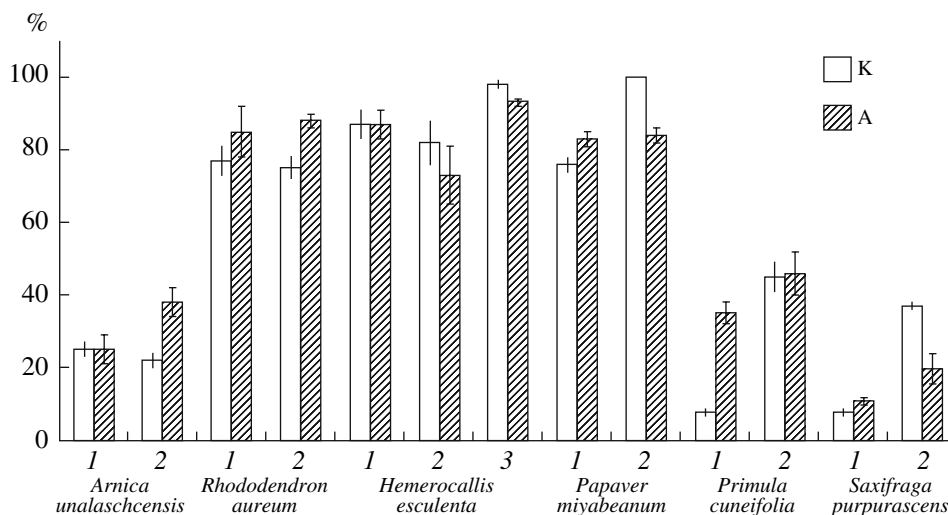


Рис. 3. Межпопуляционная изменчивость реакции семян 6 видов дальневосточных растений на замораживание в жидком азоте. К – контроль, А – азот. По оси абсцисс – виды и популяции этих видов (1, 2, 3), по оси ординат – всхожесть, %.

ние на морфологию растений в целом и на отдельные их органы. Особенно важную роль играет при этом интенсивность инсоляции и степень защищенности от постоянных ветров, усиленное действие которых способствует формированию черт ксероморфности у растений, приводит к иссушению семян. Очевидно, что для определения криоустойчивости данных видов требуется увеличение числа популяций.

Для максимально полного сохранения генофонда вида требуется привлечение семян из всех доступных местообитаний. В этом смысле необходимым этапом исследования является характеристика генофонда, оценка генетического разнообразия вида с помощью молекулярных маркеров (Falk, 1990; Petit *et al.*, 1998; Rao, 2004). Это важно для описания популяционно-генетической структуры вида, определения наиболее уязвимых популяций, выявления центров наибольшего генетического разнообразия и мобилизации геноресурсов вида на основе полученных данных. Подобные исследования проведены нами к настоящему времени для трех редких видов *Oxytropis chankaensis*, *O. retusa* и *Aristolochia manshuriensis* (Kholina *et al.*, 2000; Холина, 2004; Наконечная и др., 2005). В трех популяциях эндемика Курильских островов *O. retusa* выявлен низкий уровень генетического разнообразия ($P = 0.14$, $H_e = 0.069$), отсутствие достоверных различий между популяциями по показателям полиморфизма и гетерозиготности (Kholina *et al.*, 2000), что допускает возможность использования для мобилизации генофонда семян растений из любой изученной популяции вида. Иная ситуация с узколокальным эндемиком западного побережья оз. Ханка (Приморский край) *Oxytropis chankaensis*. Уровень изменчивости *O. chankaensis* весьма высок для редкого вида ($P = 0.42$, $H_e = 0.301$), при этом

для 5 изученных популяций установлено наличие генетической гетерогенности, несмотря на слабую дивергенцию популяций. В каждой популяции обнаружены уникальные генотипы, которые могут иметь важное значение для сохранения аллельного и генотипического разнообразия, и, в конечном итоге, отражать адаптационное разнообразие вида. Принимая во внимание низкую численность существующих популяций *O. chankaensis*, необходима мобилизация генофонда каждой из них в виде представительной коллекции семян (Холина, 2004). Анализ растений редкого реликтового вида *Aristolochia manshuriensis* проводили в 13 выборках из трех изолированных популяций. Популяции *A. manshuriensis* характеризуются невысоким уровнем генетического разнообразия в пределах ареала вида ($P = 0.27$, $H_e = 0.110$) (Наконечная и др., 2005). Предварительная оценка состояния генофонда свидетельствует о наличии выраженной внутренней субпопуляционной структуры вида, при этом установленный уровень различий между выборками указывает на необходимость представительства каждой выборки в генном банке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении криоустойчивости семян 103 видов растений установлено, что глубокое замораживание в жидком азоте (-196°C) в течение 30 сут не приводит к гибели семян. Реакция семян на действие сверхнизких температур видоспецифична: 89.1% изученных видов не снижают жизнеспособности семян, всхожесть семян с экзогенным типом покоя повышается из-за увеличения проницаемости семенной оболочки. Динамика прорастания семян после криохранения для большинства изученных видов (76.9%) остается на

уровне контроля, ускоренное прорастание отмечено для 17.3% видов. Для 6 видов выявлена межпопуляционная изменчивость ответной реакции семян на криоконсервацию. Полученные данные свидетельствуют, что замораживание семян дальневосточных растений в жидком азоте, вызывающее глубокий анабиоз, может быть использовано в качестве режима их длительного хранения. Предварительная оценка генетического разнообразия на популяционном уровне дает возможность проводить максимально полную мобилизацию генофонда вида. Результаты исследований позволяют предположить, что успех криоконсервации обусловлен не единственным фактором, а комплексом и взаимодействием различных факторов, включающих физические и химические свойства семян, условия местообитаний и др. Изучение этих факторов в совокупности с информацией о криоустойчивости близких распространенных видов предоставляет обоснованный прогноз об уровне криоустойчивости редких и исчезающих видов. В случаях неблагоприятного влияния криоконсервации на прорастание необходимо подробное изучение свойств семян этих видов, при этом содержание и состав липидов заслуживают особого внимания.

Работа поддержана грантами НШ 6923-2006.4 Президента РФ, программами Президиума РАН “Динамика генофондов растений, животных и человека” (№ 10002-251/П-24/154-392/290404-169) и “Научные основы сохранения биоразнообразия России” (№ 04-1-П12-033).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Воронкова Н.М., Холина А.Б. Влияние температурного фактора и скарификации на прорастание семян и рост сеянцев *Sophora flavescens* Soland. // Раст. ресурсы. 2003. Т. 39. Вып. 1. С. 43–49.
- Воронкова Н.М., Холина А.Б., Журавлев Ю.Н. Морфобиологическая характеристика и реакция на криоконсервацию семян некоторых видов флоры Курильских островов // Раст. ресурсы. 2000. Т. 36. Вып. 4. С. 40–47.
- Воронкова Н.М., Холина А.Б., Якубов В.В. Влияние глубокого замораживания на прорастание семян некоторых видов флоры Дальнего Востока России // Раст. ресурсы. 2003. Т. 39. Вып. 4. С. 76–87.
- Мануильский В.Д., Шалин А.Ю. Проблемы длительного хранения растительных объектов в условиях низкотемпературного криобанка // Генетические коллекции растений / Отв. ред. Коваль С.Ф. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 1995. Вып. 3. С. 6–25.
- Молодкин В.Ю. Хранение семян зерновых, бобовых и технических культур при сверхнизких температурах // Бюл. ВИР. 1984. № 144. С. 38–40.
- Наконечная О.В., Корень О.Г., Холина А.Б. Аллозимный полиморфизм двух редких видов растений Дальнего Востока России // Экология: от генов до экосистем / Под ред. Веселкина Д.В., Полявиной О.В. Екатеринбург: Академкнига, 2005. С. 176–182.
- Никишина Т.В., Попов А.С., Коломейцева Г.Л., Головкин Б.Н. Влияние криоконсервации на прорастание семян редких тропических орхидей // Физиология растений. 2001. Т. 48. № 6. С. 930–936.
- Николаева М.Г., Тихонова В.Л., Далецкая Т.В. Долговременное хранение семян дикорастущих видов растений. Биологические свойства семян // Консервация генетических ресурсов. Информ. материал. Пущино: Пущинский НЦ РАН, 1992. 36 с.
- Орехова Т.П. Семена дальневосточных деревянистых растений (морфология, анатомия, биохимия и хранение). Владивосток: Дальнаука, 2005. 161 с.
- Перечень объектов растительного и животного мира, занесенных в Красную книгу Приморского края / Отв. ред. Кожевников А.Е., Костенко В.А. Владивосток: Апостроф, 2002. 48 с.
- Попов А.С. Некоторые механизмы криоповреждений клеток растений *in vitro* и особенности их криосохранения // Физиология растений. 1993. Т. 40. № 3. С. 485–495.
- Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование / Отв. ред. Соколов П.Д. Л.: Наука, 1986. 336 с.
- Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование / Отв. ред. Соколов П.Д. Л.: Наука, 1990. 328 с.
- Растительные ресурсы России и сопредельных государств: Цветковые растения, их химический состав, использование / Отв. ред. Буданцев А.Л. СПб.: Мир и семья-95, 1996. 571 с.
- Стрибуль Т.Ф. Действие низких температур на интенсивность начального роста и продуктивные свойства семян кукурузы и овощных культур: Автореф. дис. канд. биол. наук. Харьков: Ин-т проблем криобиологии и криомедицины, 1993. 17 с.
- Тихонова В.Л. Долговременное хранение семян // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 3. С. 467–476.
- Тихонова В.Л., Лысых Н.И., Фирсанова В.М. Влияние замораживания на жизнеспособность семян дикорастущих растений // Бюл. ГБС. 1997. Вып. 175. С. 83–90.
- Тихонова В.Л., Шугаева Е.В., Фирсанова В.М. Жизнеспособность семян некоторых видов дикорастущих лекарственных растений при глубоком и неглубоком замораживании // Раст. ресурсы. 1996. Т. 32. Вып. 3. С. 43–50.
- Харкевич С.С., Качура Н.Н. Редкие виды растений советского Дальнего Востока и их охрана. М.: Наука, 1981. 234 с.
- Холина А.Б. Генетическое разнообразие и сохранение генофонда редкого эндемичного растения *Oxytropis chankaensis* Jurtz. // Цитология. 2004. Т. 46. № 10. С. 873–875.
- Холина А.Б., Воронкова Н.М. Влияние замораживания на прорастание семян некоторых видов сем. Fabaceae флоры Дальнего Востока России // Раст. ресурсы. 2001. Т. 37. Вып. 2. С. 39–42.
- Арапетян Е., Бондар В., Прокопів А., Надрага М. Зберігання насіння рослин природної флори мето-

- дом криоконсервації // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2004. Вип. 36. С 186–189.
- Bonner F.T. Storage of seeds: Potential and limitations for germplasm conservation // Forest Ecol. Management. 1990. V. 35. P. 35–43.
- Falk D.A. Integrated strategies for conserving plant genetic diversity // Ann. Missouri Bot. Gard. 1990. V. 17. P. 38–47.
- Gonzales-Benito E., Pita J.M., Perez C., Perez-Garcia F. Effect of cryopreservation on seed germination of different Leguminosae species // Basic and applied aspects of seed biology / Eds. Ellis R.H., Black M., Murdoch A.J., Hong T.D. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1997. P. 797–802.
- Jorgensen J. Conservation of valuable gene resources by cryopreservation in some forest tree species // J. Plant Physiol. 1990. V. 136. P. 373–376.
- Kholina A.B., Koren O.G., Zhuravlev Yu.N. Allozyme variation in *Oxytropis retusa* Matsum. from the Kurile Archipelago // Nat. History Res. 2000. № 7. P. 15–20.
- Panis B., Lambardi M. Status of cryopreservation technologies in plant (crops and forest trees) // Proc. Int. Workshop “The role of biotechnology for the characterization and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources”. Turin, 2005. P. 43–54.
- Pence V.C. Cryopreservation of seeds of Ohio native plants and related species // Seed Sci. Technol. 1991. V. 19. P. 235–251.
- Petit R.J., El Mousadik A., Pons O. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers // Conservation Biology. 1998. V. 12. P. 844–855.
- Pita J.M., Sanz V., Escudero A. Seed cryopreservation of seven Spanish native pine species // Silvae Genetica. 1998. V. 4. P. 220–223.
- Popov A.S., Popova E.V., Nikishina T.V., Kolomeytseva G.L. The development of juvenile plants of the hybrid orchid *Bratonia* after seed cryopreservation // CryoLetters. 2004. V. 25. P. 205–212.
- Pritchard H.W., Manger K.R., Prendergast F.G. Changes in *Trifolium arvense* seed quality following alternating temperature treatment using liquid nitrogen // An. Botany. 1988. V. 62. P. 1–11.
- Rao N.K. Plant genetic resources: Advances conservation and use through biotechnology // African J. Biotechnol. 2004. V. 3. P. 136–145.
- Roos E.E. Long-term seed storage // The national plant germplasm system of the United States: Plant Breeding Rev. 1989. V. 7. P. 129–158.
- 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. V. 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.
- Touchell D.H., Dixon K.W. Cryopreservation of seed of Western Australian native species // Biodiversity Conservation. 1993. V. 2. P. 594–602.
- Vertucci C.W. Effect of cooling rate on seeds exposed to liquid nitrogen temperatures // Plant Physiol. 1989. V. 90. P. 1478–1485.

Conserving the Gene Pool of Far Eastern Plants by Means of Seed Cryopreservation

A. B. Kholina and N. M. Voronkova

*Institute of Biology and Soil Science, Far East Division, Russian Academy of Sciences,
pr. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok 690022, Russia
e-mail: kholina@biosoil.ru*

Abstract—Cryotolerance of seeds has been studied in 103 plant species of 33 families from five regions of the Russian Far East. In 89.1% of these species, seed viability has not decreased in the course of cryogenic storage. Six species have shown interpopulation variation in the seed response to extremely low temperature (–196°C). Freezing in liquid nitrogen, which results in deep anabiosis, can be used as a means for long-term seed storage. A preliminary assessment of genetic diversity at the population level provides for the maximum possible mobilization of the species gene pool. The results of this study contribute to the development of a scientific basis for creating a seed bank of the Far Eastern flora with the purpose to conserve and restore biological resources of the region.