

УДК 581.142:57.085(571.6)

СОХРАНЕНИЕ ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ ДАЛЬНОГО ВОСТОКА РОССИИ С ПОМОЩЬЮ ГЛУБОКОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ СЕМЯН

© 2010 г. Н. М. Воронкова, А. Б. Холина

Биолого-почвенный институт ДВО РАН, 690022 Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

E-mail: kholina@biosoil.ru

Поступила в редакцию 12.10.2009 г.

Изучена ответная реакция семян 11 видов — эндемиков Дальнего Востока России — на сверхглубокое замораживание (-196°C) для выяснения возможности их длительного хранения. Показано, что криообработка семян не привела к их гибели. Жизнеспособность 10 видов оставалась на уровне контроля или повышалась. Отклонений в развитии проростков, полученных из деконсервированных семян, не отмечено. Разработаны режимы проращивания семян для мониторинга лабораторной всхожести во время длительного хранения. Полученные результаты необходимы при создании низкотемпературных банков семян для сохранения и восстановления биоразнообразия флоры.

При изучении биоразнообразия растительности особую значимость приобретает охрана эндемичных видов. Согласно последним данным во флоре Дальнего Востока России присутствует 470 (10.8% природной флоры) эндемичных видов, принадлежащих к 147 родам и 45 семействам (Кожеников, 2007). Часто они существуют в форме малых изолированных популяций и связаны со строго определенными условиями среды. Для островных, прибрежных, вулканических территорий Дальнего Востока России они составляют наиболее уязвимую часть региональной флоры. Значительное сокращение, а в ряде случаев и полное разрушение отдельных популяций под действием как природных, так и антропогенных факторов, создающих неустойчивый гидротермический режим, приводят к сокращению ареала, что может закончиться полным вымиранием видов-эндемиков. С учетом динамичности (действие тайфунов и штормов на материковых и островных побережьях, периодические извержения вулканов, рекреационная нагрузка, выпас скота и т.д.) окружающей среды значительной территории и незначительного общего объема семенной продуктивности в связи с малым ареалом эндемиков остро встает вопрос о долгосрочном сохранении семенного материала отдельных видов. С осознанием важности охраны эндемичных видов в мировой практике создаются банки длительного хранения их семян (Pence, 1991; Touchell, Dixon, 1993, 1994; Gonzales-Benito *et al.*, 1998a). Так, в Испании налажено хранение семян эндемиков Средиземноморья при температуре -5°C в запаянных стеклянных ампулах, заполненных углекислым газом (Gomez-Campo, 1979).

Наиболее надежный способ хранения семян, что особенно важно для эндемичных видов, — глубокое замораживание в жидком азоте. Однако успешность такого хранения гарантируется только после изучения ответной реакции семян на глубокое замораживание и разработки режимов проращивания для мониторинга лабораторной всхожести. Следует отметить, что при работе с ди-корастущими видами определенной проблемой являются покой семян и необходимость специфической обработки для его преодоления, при этом требуется изучать взаимодействие способов нарушения покоя семян и криоконсервации (Pence, 1991; Gonzales-Benito *et al.*, 1998b; Salomão, 2002). В более ранних наших работах по криоконсервации семян дальневосточной флоры были получены положительные результаты сохранения жизнеспособности семян ряда видов (в том числе и эндемичных) в условиях глубокого замораживания (Воронкова и др., 2003, 2008; Воронкова, 2007; Холина, Воронкова, 2008). Данная работа — продолжение этих исследований. Полученные результаты необходимы в будущем для создания банка семян.

В данной работе представлены сравнительные результаты по влиянию глубокого замораживания семян некоторых эндемичных видов дальневосточных растений на их жизнеспособность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили семена 11 видов растений-эндемиков, представителей 6 семейств из 16 мест сбора. Видовой состав, географическое распространение и места сбора семян представлены в табл. 1. Для большинства

Таблица 1. Распространение, места обитания и пункты сбора семян изученных видов-эндемиков Дальнего Востока России

Вид (семейство)	Распространение, местообитание	Место сбора семян
<i>Ermania parryoides</i> Cham. ex Botsch. (Brassicaceae)	Северо-восточная часть Дальнего Востока, на щебнисто-глинистых склонах, осыпях	п-ов Камчатка, Толбачинский дол в р-не горы Высокой, шлаковое поле, высота над ур. м. 500 м
<i>Hedysarum austrokurilense</i> (N.S. Pavlova) N.S. Pavlova (Fabaceae)	Южный Сахалин и южные Курильские о-ва, на скалах, каменистых и травянистых склонах небольших гор и на высоких приморских террасах	о. Сахалин, грязевый вулкан Магунтан, по краю лиственничника
<i>H. sachalinense</i> B. Fedtch. (Fabaceae)	Сахалин, на приморских каменистых склонах, береговых обрывах и скалах, реже в гольцовом поясе	о. Сахалин, устье р. Тихой, на каменистых осыпях по склону сопки
<i>Myosotis sachalinensis</i> M. Pop. (Boraginaceae)	Сахалин и южные Курильские о-ва, во влажных тенистых лесах	о. Монерон (Сахалинская обл.), бух. Чупрова, в зарослях высокотравья
<i>Oxytropis chankaensis</i> Jurtz. (Fabaceae)	Побережья оз. Ханка, на прибрежных песках	Приморский край, оз. Ханка, коса Пржевальского
<i>O. kamtschatica</i> Hult. (Fabaceae)	Северо-восточная часть Дальнего Востока, в горных тундрах, на старых лавовых потоках и шлаковых полях, сухих пойменных галечниках	п-ов Камчатка, вулкан Ключевская сопка, р-н сопки Подкова, шлаковое поле на восточном склоне, высота над ур. м. 1050 м
<i>O. retusa</i> Matsum. (Fabaceae)	Курильские о-ва, на скалах и травянистых склонах морского берега	Курильские о-ва: о. Парамушир, бухта Шелехова, каменистый склон на берегу моря
<i>Saxifraga purpurascens</i> Kom. (Saxifragaceae)	Северо-восточная часть Дальнего Востока, Камчатка и Курильские о-ва, вулканические склоны, скалы и каменистые россыпи, вдоль русел в подгольцовом и гольцовом поясах	п-ов Камчатка, вулканическая сопка Плоская, горные тундры и лавовые потоки
<i>Stellaria eschscholziana</i> Fenzl (Caryophyllaceae)	Северо-восточная часть Дальнего Востока, Камчатка, в горно-тундровом поясе среди каменистых россыпей, на вулканических шлаках и песках, галечниках горных рек	п-ов Камчатка, Толбачинский дол в р-не горы Высокой, шлаковое поле, высота над ур. м. около 550 м
<i>Vaccinium vulcanorum</i> Kom. (Ericaceae)	Северо-восточная часть Дальнего Востока, Камчатка, на щебнистых участках, в кустарничковых тундрах и разреженных каменноберезниках	п-ов Камчатка, вулкан Ключевская сопка, р-н сопки Подкова, восточный склон, древний лавовый поток, вересково-голубичная тундра, высота над ур. м. 1080 м
<i>Vicia subrotunda</i> (Maxim.) Czefr. (Fabaceae)	Южное Приморье, на сухих склонах в смешанных и широколиственных лесах	Приморье, заповедник Кедровая падь

растений дикорастущей флоры Дальнего Востока России режимы проращивания семян не разработаны, хотя они необходимы при интродукции растений, мониторинге коллекций семян, изучении онтогенеза растений, получении культуры тканей растений, экспериментальной криоконсервации для обоснования создания низкотемпературных банков семян и т.д. В отсутствие разработки оптимальных режимов проращивания мы, согласно рекомендациям (Николаева и др., 1992), первоначально проращивали семена при температуре не ниже 18°C. Если же семена в течение 1 мес. не проросли, то для нарушения глубокого покоя применяли холодную стратификацию при низкой положительной температуре (2°C) в течение 4 мес., и далее семена проращивали в тепле.

Криообработку проводили путем прямого погружения семян, завернутых в фольгу, в жидкий азот (–196°C), затем отогревали 2 ч при комнатной температуре и ставили на проращивание. Время криоконсервации составляло от 1 до 60 сут. Как известно из литературных данных, период хранения семян в жидком азоте не оказывает значительного влияния на их прорастание (Irigorondo *et al.*, 1992; Gonzales-Benito *et al.*, 1998a). Семена проращивали в чашках Петри при комнатной температуре в условиях естественного освещения. Субстрат (фильтровальная бумага с подстилкой из ваты) увлажняли по мере необходимости водопроводной водой. Семена с твердой кожурой, обладающие физическим типом покоя, обрабатывали концентрированной (95–96%-ной)

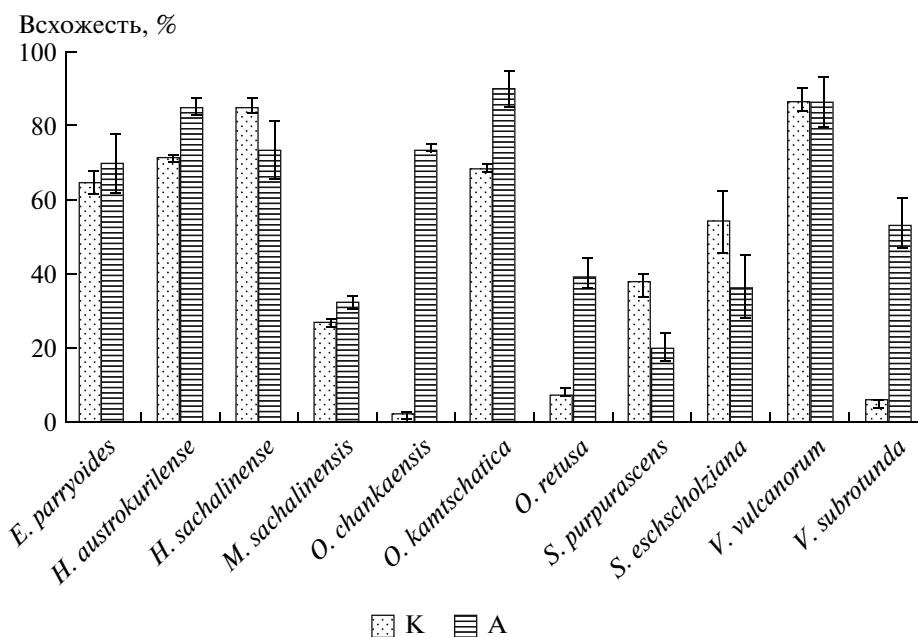


Рис. 1. Влияние криоконсервации (-196°C) на прорастание семян эндемичных видов. К — контроль без предпосевной обработки, А — азот (предпосевное замораживание семян в жидком азоте) (для рис. 1, 2).

серной кислотой. Семена с глубоким органическим покоем стратифицировали при температуре 2°C . 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 процентах. Опыты проводили трижды (по 50 семян в каждой повторности). Достоверность разницы между контролем и опытом оценивали по критерию Стьюдента при уровне значимости $p = 0.05$. Длину побега, корешка и гипокотилиа измеряли через 5, 10 и 15 сут после начала прорастания. Указание на эндемизм (Кожевников, 2007), латинские названия растений, географическое распространение и места произрастания приводятся с использованием данных сводки “Сосудистые растения советского Дальнего Востока” (1988, 1989, 1991, 1996).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование жизнеспособных семян в нестабильных и жестких экологических условиях обитания большинства исследованных эндемиков (табл. 1) является одним из показателей успешной приспособительной эволюции.

Для мониторинга лабораторной всхожести во время хранения семян необходима разработка режимов их проращивания. У дикорастущих видов по сравнению с культурными чаще затруднено прорастание семян из-за наличия органического покоя, снятие которого требует определенной

предпосевной подготовки. Было установлено, что для прорастания семян *Stellaria eschscholziana* и *Vaccinium vulcanorum* необходима стратификация. Представленные на рис. 1 результаты (контроль) указывают на достаточно высокую всхожесть ($\geq 50\%$) семян шести видов (семена видов бобовых проращивали без предпосевной обработки). Известно, что представители сем. Fabaceae относятся к растениям с физическим типом покоя (Николаева и др., 1985), вызванным непроницаемостью семенной кожуры. Среди исследуемых видов значительная доля видов принадлежит к сем. Fabaceae, и прежде всего к роду *Oxytropis*. На Дальнем Востоке России сем. Fabaceae — одно из наиболее распространенных среди эндемиков (3-е место), а род *Oxytropis* — самый крупный по числу эндемичных видов (более половины видов аборигенной фракции (Кожевников, 2007)). Малая всхожесть представителей сем. Fabaceae объясняется их физическим типом покоя. Опыты по устранению твердосемянности путем нарушения целостности семенной кожуры воздействием концентрированной серной кислоты, открывающим тем самым доступ воде и кислороду, показали высокую всхожесть семян видов этого семейства (табл. 2). Исключением являются семена *Hedysarum sachalinense*, которые в наших опытах обладали низкой твердосемянностью и погибали от воздействия серной кислоты, но имели высокую всхожесть без обработки ($\geq 80\%$). В наших опытах степень твердосемянности зависела от сроков сбора семян. По-видимому, твердосемянность при ранних сроках сбора формируется во

Таблица 2. Влияние обработки концентрированной серной кислотой (скарификации) на прорастание семян представителей сем. Fabaceae

Вид	Длительность скарификации, мин	Всхожесть, %	
		без обработки (контроль)	после скарификации
<i>Hedysarum austrokurilense</i>	30	71 ± 1	88 ± 5
<i>H. sachalinense</i>	40	85 ± 2	4 ± 0
<i>Oxytropis chan-kaensis</i>	60	2 ± 1	65 ± 2
<i>O. kamtschatica</i>	20	68 ± 1	94 ± 4
<i>O. retusa</i>	20	9 ± 1	67 ± 2
<i>Vicia subrotunda</i>	70	5 ± 1	74 ± 2

время хранения семян, при поздних — на материнском растении.

В результате с учетом увеличения всхожести после скарификации у семян видов сем. Fabaceae было установлено, что из 11 исследованных видов высокую всхожесть имели 9, низкую — *Myosotis sachalinensis* и *Saxifraga purpurascens* (рис. 1) (табл. 2).

После криоконсервации все виды сохранили способность к прорастанию. Сравнительные данные указывают на видоспецифичную ответную реакцию семян на сверхглубокое замораживание (рис. 1). Более половины исследованных видов реагировали на криообработку семян повышением их всхожести, что подтверждено статистически для *M. sachalinensis* и большинства представителей сем. Fabaceae. Для видов этого семейства воздействие ультранизкой температуры с последующим размораживанием аналогично воздействию серной кислоты и, по-видимому, также связано с повреждением семенной кожуры. Нарушение твердосемянности при глубоком замораживании семян дикорастущих представителей сем. Fabaceae отмечалось неоднократно (Pritchard *et al.*, 1988; Shibata *et al.*, 1995; Salomão, 2002), в том числе и в более ранних наших работах (Холина, Воронкова, 2001; Воронкова, Холина, 2003).

Достоверное снижение всхожести показано только для *S. purpurascens*. В остальных случаях варьирование показателей статистически не подтверждено, т.е. прорастание семян после глубокого замораживания достоверно не отличалось от контроля. Следует отметить, что виды, семена которых для преодоления покоя нуждаются в стратификации, показали разную реакцию на сочетание криообработки и стратификации: для семян *V. vulcanorum* разницы между контролем и опытом не обнаружено, для семян *S. eschscholziana* отмечено снижение доли проросших семян после двухэтапного воздействия. Снижение всхожести

после криогенного хранения, в том случае, когда после азота семена проращивают по схеме тепло—холод—тепло, было отмечено нами ранее в работе с пионерными растениями вулканов Камчатки (Воронкова и др., 2008). В то же время, если семена исследуемых видов после хранения в азоте сразу подвергаются стратификации, для большинства видов угнетения прорастания не происходит, а для ряда видов наблюдается стимуляция прорастания: для растений штата Огайо эти показатели соответственно составляют 62 и 13% (Pence, 1991); для растений южного Подмосковья из 26 видов для 21 вида показатели в контроле и опыте не различаются (81%), для 3 видов отмечена стимуляция прорастания, для 2 — угнетение (Левицкая, 2009). Очевидно, что сочетание криообработки и способов преодоления покоя требует дальнейшего изучения.

Ранее при изучении криогенных свойств семян эндемичных растений было принято считать, что исследование криоустойчивости семян родственного эндемику широкоареального вида позволит предсказать степень выживаемости и поведение семян уязвимого вида при криохранении; при этом было рекомендовано проверять подобный прогноз, вследствие малого количества семян эндемика (Pence, 1991). Однако дальнейшие исследования показали, что предсказать, выдержат ли семена конкретного вида криообработку, на основе их принадлежности к близким таксонам невозможно (Touchell, Dixon, 1993, 1994; Gonzales-Benito *et al.*, 1998b). Полученные нами сведения о поведении семян эндемичных видов рода *Hedysarum* и рода *Oxytropis* свидетельствуют об индивидуальных особенностях растений каждого исследованного вида, связанных со степенью твердосемянности, глубиной покоя, физическими и химическими свойствами семян. Поэтому важно продолжать массовое обследование различных видов-эндемиков для эффективного сохранения их генофонда.

Наиболее информативные показатели успеха криоконсервации — нормальный рост и развитие растений из деконсервированных семян. Прорастание семян и ранние этапы роста и развития проростков являются наиболее уязвимым этапом репродуктивного процесса. Для оценки последствий сверхглубокого замораживания на уровне динамики морфометрических показателей проростков в начальный период развития исследованы два вида рода *Hedysarum* (рис. 2). Замораживание семян этих видов не привело к появлению уродливых экземпляров проростков. Рост и развитие растений из замороженных семян протекают нормально, криохранение семян не повлияло на морфологические показатели растений. Сравнительная динамика роста проростков на ранних этапах развития не показала разницы между проростками из контрольных и деконсер-

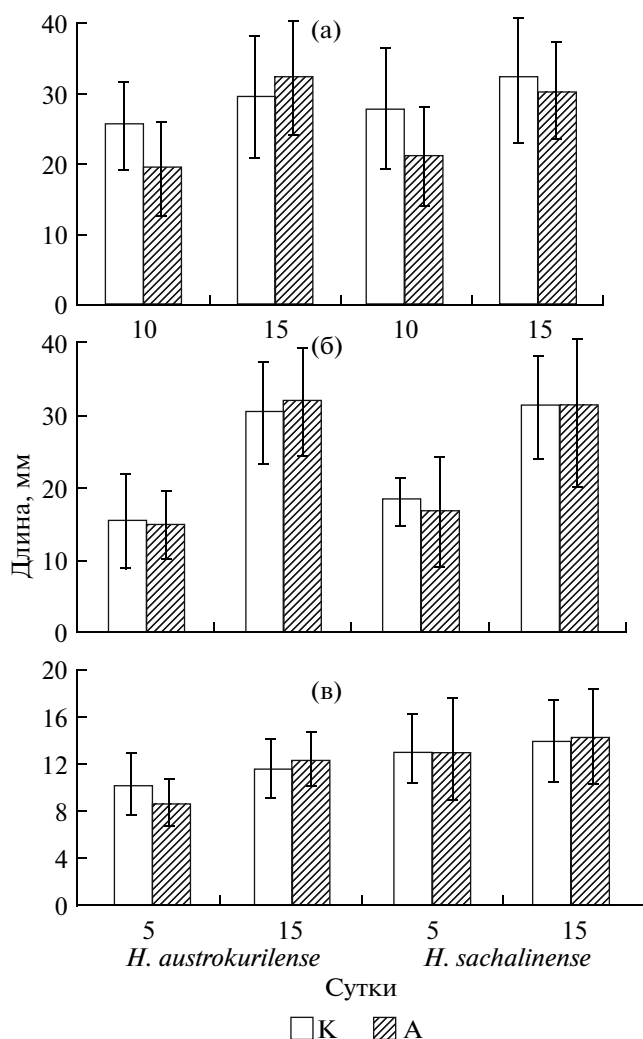


Рис. 2. Влияние криоконсервации на длину побега (а), корешка (б) и гипокотили (в) проростков видов *Hedysarum*. По оси абсцисс — сутки от начала прорастания.

вированных семян. Небольшое снижение длины проростка в первые 10 сут оказалось статистически недостоверным. Нормальное развитие проростков из семян после глубокого замораживания констатируется многими исследователями (Тихонова, 1999; Роров *et al.*, 2004), в том числе и нами (Воронкова, Холина, 2003).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показали, что после воздействия ультранизких температур (-196°C) семена 11 исследованных видов-эндемиков сохранили способность к прорастанию. После криоконсервации всхожесть всех видов (за исключением *S. purpurascens*) либо оставалась на уровне контроля, либо повышалась. На ранних стадиях роста растений отклонения в развитии

проростков, полученных из деконсервированных семян, не отмечались. Следовательно, для этих видов замораживание в жидком азоте можно рекомендовать в качестве режима их длительного хранения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Воронкова Н.М. Влияние криоконсервации на жизнеспособность семян некоторых видов флоры острова Монерон (Сахалинская область) // Раст. ресурсы. 2007. Т. 43. Вып. 3. С. 34–41.
- 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., Верхолат В.П. Биоморфология растений и прорастание семян пионерных видов вулканов Камчатки // Изв. РАН. Сер. биол. 2008. № 6. С. 696–702.
- 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.
- Кожевников А.Е. Эндемичный элемент во флоре Российского Дальнего Востока // Комаровские чтения. Вып. LIV. Владивосток: Дальнаука, 2007. С. 8–81.
- Левицкая Г.Е. Биологические характеристики семян представителей флоры южного Подмосковья и их криоконсервация // Раст. ресурсы. 2009. Т. 45. Вып. 3. С. 9–30.
- Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. Л.: Наука, 1985. 348 с.
- Николаева М.Г., Тихонова В.Л., Далецкая Т.В. Долговременное хранение семян дикорастущих видов растений. Биологические свойства семян. Пушкино: ОНТИ ПНЦ РАН, 1992. 37 с.
- Сосудистые растения советского Дальнего Востока. Л.: Наука, 1988. Т. 3. 421 с.; 1989. Т. 4. 380 с. СПб.: Наука, 1991. Т. 5. 390 с.; 1996. Т. 8. 383 с.
- Тихонова В.Л. Долговременное хранение семян // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 3. С. 467–476.
- 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.
- Холина А.Б., Воронкова Н.М. Сохранение генофонда дальневосточных растений методом криоконсервации семян // Изв. РАН. Сер. биол. 2008. № 3. С. 304–312.
- Gomes-Campo C. The role of seed banks in the conservation of Mediterranean flora // Webbia. 1979. V. 34. № 1. P. 101–107.
- Gonzales-Benito M.E., Fernandez-Llorente F., Perez-Garcia F. Interaction between cryopreservation, rewarming rate and seed humidification on the germination of two Spanish endemic species // Ann. Bot. 1998a. V. 82. P. 683–686.

- Gonzales-Benito M.E., Iriorondo J.M., Perez-Garcia F.* Seed cryopreservation: an alternative method for the conservation of Spanish endemic species // *Seed Sci. Technol.* 1998b. V. 26. P. 257–262.
- Iriorondo J.M., Perez C., Perez-Garcia F.* Effect of seed storage in liquid nitrogen on germination of several crop and wild species // *Seed Sci. Technol.* 1992. V. 20. P. 165–171.
- Pence V.C.* Cryopreservation of seeds of Ohio native plants and related species // *Seed Sci. Technol.* 1991. V. 19. P. 235–251.
- 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 // *Ann. Bot.* 1988. V. 62. P. 1–11.
- Salomzão A.N.* Tropical seed species' responses to liquid nitrogen exposure // *Braz. J. Plant Physiol.* 2002. V. 14. № 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. V. 147. P. 127–131.
- Touchell D.H., Dixon K.W.* Cryopreservation of seed of Western Australian native species // *Biodiversity Conservation.* 1993. V. 2. P. 594–602.
- Touchell D.H., Dixon K.W.* Cryopreservation for seedbanking of Australian species // *Ann. Bot.* 1994. V. 74. P. 541–546.

Conservation of Endemic Species from the Russian Far East Using Seed Cryopreservation

N. M. Voronkova and A. B. Kholina

*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

Received October 12, 2009

Abstract—A seed response to cryopreservation has been studied in 11 endemic plant species from the Russian Far East to determine the possibility of their long-term storage. It has been shown that the cryogenic treatment does not kill seeds. The viability of 10 species did not decrease (or even increased) after their cryogenic storage. We have not revealed any deviations in the development of plants germinated from seeds stored at an extremely low temperature (–196°C). To monitor germination after long-term storage, procedures of seed germination under laboratory conditions have been developed. The results of this study contribute to the creation of low-temperature seed banks, able to conserve and restore a floral biological diversity.