

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ ВОДНЫХ И ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ  
Дальневосточного отделения РАН

**Российская конференция с международным участием**  
**РЕГИОНЫ НОВОГО ОСВОЕНИЯ:**  
**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ИЗУЧЕНИЯ И**  
**СОХРАНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО И ЛАНДШАФТНОГО**  
**РАЗНООБРАЗИЯ**

15-18 октября 2012 г.

г. Хабаровск

**Сборник докладов**

УДК 502.7:582(571.6); 591(571.62)

**Конференция с международным участием «Регионы нового освоения: теоретические и практические вопросы изучения и сохранения биологического и ландшафтного разнообразия»**, 15-18 окт. 2012 г., Хабаровск: сб. докладов [Электронный ресурс] - Хабаровск: ИВЭП ДВО РАН, 2012. - 390 с.; объем 16 Мб; 1 опт. компакт-диск (CD-ROM).

ISBN 978-5-88570-337-6

Приведены материалы, раскрывающие теоретические практические основы изучения и сохранения биологического разнообразия популяционно-видового, экосистемного и биосферного уровней наземных и водных экосистем. Рассмотрены основные экологические факторы, определяющие условия существования организмов в специфических природных условиях дальневосточного региона, даются научные основы охраны природной среды и оптимизации ООПТ.

Сборник предназначен для широкого круга специалистов-исследователей в области видового и экосистемного разнообразия, рационального природопользования, работников заповедников, учителей, преподавателей вузов, аспирантов и студентов биологических специальностей.

*Ключевые слова:* биоразнообразие растительного и животного мира, флора, реобиом, ландшафтное разнообразие, особо охраняемые территории, пирогенез, болотные экосистемы, микромицеты.

Редакционная коллегия: коллегия: член-корр. РАН Б.А. Воронов (ответственный редактор).  
Члены редколлегии: д.г.н. А. Н. Махинов; д.б.н. С.Д. Шлотгауэр; д.б.н. Н. А. Рябинин.

Материалы конференции напечатаны в авторской редакции

ISBN 978-5-88570-337-6

© ИВЭП ДВО РАН, 2012

INSTITUTE OF WATER AND ECOLOGY PROBLEMS  
Far Eastern Branch, RAS

**Russian Conference with International Participation**  
**REGIONS OF NEW DEVELOPMENT:**  
**THEORETICAL AND PRACTICAL ASPECTS OF STUDIES AND**  
**CONSERVATION OF BIOLOGICAL AND LANDSCAPE DIVERSITY**

October, 15-18, 2012  
Khabarovsk

Conference Proceedings

UDC 502.7:582(571.6); 591(571.62)

**Conference with International Participation «Regions of New Development: Theoretical and Practical Aspects of Studies and Conservation of Biological and Landscape Diversity», Oct. 15-18, 2012, Khabarovsk: Conf. Proc. [electronic resource] - Khabarovsk: IWEP FEB RAS, 2012. - 390 p.; content 16 Mb; 1 opt. Compact disc (CD-ROM).**

ISBN 978-5-88570-337-6

Selected materials clarify theoretical and practical aspects of studies and conservation of biological diversity of population-species, ecosystem and biosphere levels of land and water ecosystems, as well as discuss main ecological factors that determine organism existence in specific-natural conditions of the Far Eastern region. Scientific guidelines for natural environment conservation and optimization of special protected areas are recommended.

Will be of interest to various researchers and experts in species and ecosystem diversity, rational natural resource use, natural reserves, as well as lecturers, teachers, post graduates and students of biology.

*Key Words:* flora and fauna biodiversity, flora, rheobiom, landscape diversity, special protected areas, pyrogenesis, wetland ecosystems, micromycets.

Editorial Board: B.A. Voronov, RAS Corresponding Member (executive editor),  
Members: A. N. Makhinov, Dr. Geogr.; S.D. Shlotgauer, Dr. Biol.; N. A. Ryabinin, Dr. Biol.

Conference Proceedings are published as authors' addition

ISBN 978-5-88570-337-6

© IWEP FEB RAS, 2012

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И СОХРАНЕНИЕ ГЕНОФОНДА ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ ВИДОВ РОДА *OXYTROPIS* DC.

Холина А.Б., Наконечная О.В., Воронкова Н.М.  
Биолого-почвенный институт ДВО РАН

## GENETIC DIVERSITY AND GENE POOL CONSERVATION OF FAR EASTERN *OXYTROPIS* SPECIES

Kholina A.B., Nakonechnaya O.V., Voronkova N.M.  
Institute of Biology and Soil Science, FEB RAS

The levels of genetic diversity and cryotolerance of seeds have been studied for seven *Oxytropis* species of Russian Far East. Comparative analysis has revealed the factors maintaining an optimal level of polymorphism within each species (life history traits, mating system and ploidy level). The response of seeds to ultralow temperature ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) has been analyzed to evaluate the possibility of their cryopreservation for creating a seed bank. The one-month freezing of the seeds in liquid nitrogen did not decrease seed viability. The stimulatory effect of cryostorage on germination was observed in all species studied.

Среди бобовых Дальнего Востока России род Остролодочник *Oxytropis* DC. занимает первое место по богатству и разнообразию – 55 видов из 8 секций, из них 32 вида эндемичны для этой территории [4]. В крайних для жизни условиях (морские побережья, высокогорья, пионерные зарастания вулканов) преобладают полиплоидные виды остролодочников; большинство эндемичных видов остролодочника являются тетра- (32), гекса- (48) и октоплоидами (64) [5]. Представители рода имеют существенное практическое значение. Благодаря строению корневой системы, растения остролодочника способствуют укреплению песчаных берегов, щебнистых осыпей и вершин, вулканогенных субстратов. Остролодочники как пионерные растения поселяются в местах с отсутствием почвенного покрова, в результате их жизнедеятельности идет формирование благоприятных почвенно-грунтовых условий для поселения других растений [2]. Симбиоз растений остролодочника с клубеньковыми азотфиксирующими бактериями приводит к обогащению почвы азотом, что также делает возможным поселение многих других видов. Химические и фармакологические исследования остролодочников показали перспективность этих видов как возможных источников сырья для создания лекарственных средств [1]. При этом риск исчезновения данных видов чрезвычайно высок как в силу естественных причин (извержения вулканов, колебания уровня моря, периодические штормы, оползни и другие катастрофические воздействия), так и антропогенного давления. В аспекте охраны биоразнообразия растений в районах со сложной экологической ситуацией особенно актуальными становятся исследования, связанные с сохранением генофонда видов и созданием коллекций геномов. Наиболее надежным способом хранения является криоконсервация семян в жидком азоте при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  [5], но при этом требуется экспериментальная проверка реакции семян на сверхглубокое замораживание. При создании генного банка для максимально полной мобилизации геноресурсов вида рекомендуется оценка внутривидового разнообразия с использованием молекулярных маркеров.

Цель настоящей работы состоит в исследовании генетических ресурсов семи дальневосточных видов рода *Oxytropis* и реакции семян этих видов на криогенное хранение. Исследование предполагает использование метода аллозимного анализа для

характеристики состояния генофонда видов и метода криоконсервации семян с последующей оценкой их жизнеспособности.

Семена собирали в природных местообитаниях на п-ове Камчатка (*O. erecta* Kom., *O. exserta* Jurtz., *O. evenorum* Jurtz. et Khokhr., *O. kamtchatica* Hult., *O. ochotensis* Bunge, *O. revoluta* Ledeb.) и о-ве Шикотан Курильской гряды (*O. hidakamontana* Miyabe et Tatew.). Криоконсервацию проводили выдерживанием семян в жидком азоте (–196°C) в течение 1 мес. Жизнеспособность семян оценивали по лабораторной всхожести. Семена бобовых имеют водонепроницаемую кожуру, и для успешного прорастания необходимо нарушение оболочки (скарификация). Семена исследуемых видов подвергали обработке серной кислотой (20 мин) с последующей промывкой в проточной воде. В качестве материала для генетического анализа использовали трех- или четырехнедельные проростки исследуемых видов. Генетическую изменчивость изучали по общепринятым методикам с использованием в качестве маркеров полиморфных ферментных систем.

На основе частот аллелей были рассчитаны основные показатели генетического полиморфизма для семи видов *Oxytropis* (табл. 1).

Таблица 1

Основные показатели генетического полиморфизма для семи видов рода *Oxytropis*

Вид	Статус редкости	2n	N <sub>i</sub>	N <sub>1</sub>	P, %	A	A <sub>p</sub>	H <sub>o</sub>
<b>Секция <i>Arctobia</i></b>								
<i>O. exserta</i>	эндем	16	35	20	45.0	1.65	2.44	0.162
<i>O. kamtchatica</i>	эндем, редкий	16	81	18	50.0	1.67	2.20	0.125
<i>O. revoluta</i>	–	16	133	20	25.0	1.40	2.33	0.124
<b>Секция <i>Orobia</i></b>								
<i>O. evenorum</i>	эндем	32	43	15	35.7	1.33	2.00	0.160
<i>O. erecta</i>	эндем	48	151	22	59.1	1.64	2.08	0.278
<i>O. hidakamontana</i>	эндем	64	150	19	42.1	1.53	2.13	0.235
<i>O. ochotensis</i>	–	64	77	12	41.7	1.50	2.20	0.255

Примечание: 2n – число хромосом; N<sub>i</sub>, N<sub>1</sub> – число исследованных растений, локусов; P, % – доля полиморфных локусов (полиморфность), A – число аллелей на локус, A<sub>p</sub> – число аллелей на полиморфный локус, H<sub>o</sub> – наблюдаемая гетерозиготность

Все изученные виды демонстрируют довольно высокий уровень генетического разнообразия. От 25 до 59% их генов находятся в полиморфном состоянии (P), а число аллелей на локус (A) составляет для разных видов от 1.33 до 1.67. Наиболее высокие значения этих показателей характерны для *O. erecta* и *O. kamtchatica*. Полученные величины находятся в диапазоне значений, характерных для травянистых многолетников (P = 39.6, A = 1.42), насекомоопыляемых видов (P = 50.1, A = 1.99), растений с половым типом репродукции (P = 51.6, A = 2.00) [7]. Наблюдаемая гетерозиготность (H<sub>o</sub>) варьировала от 0.124 до 0.278. Выявленный ранее для ряда видов бобовых высокий уровень генетического разнообразия обусловлен, в большинстве случаев, особенностями биологии, экологии и жизненной стратегии. Среди них наиболее важны особенности системы размножения (самонесовместимость и перекрестное опыление с помощью насекомых), высокая семенная продуктивность и значительная продолжительность жизни особей, которая приводит к наличию перекрывающихся поколений и увеличивает эффективную численность популяции.

Эти особенности характерны и для изученных видов (для многих видов остролодочников установлена облигатная аллогамность [6]), и они в совокупности способствуют поддержанию генетического разнообразия.

Известно, что размер ареала и степень эндемизма вида также оказывают влияние на уровень генетической изменчивости [7]. При этом, как правило, широкоареальные виды имеют более высокие показатели разнообразия. При сравнении уровня аллозимного полиморфизма видов остролодочников в настоящей работе результаты не всегда этому соответствовали, и эндемичные виды демонстрировали большую вариабельность по сравнению с распространенными. Исследованные виды относятся к двум секциям (табл. 1). *Arctobia* – это метаарктическая амфиберингийская секция с преимущественно диплоидными видами [6]; малое число хромосом косвенно свидетельствует о древности секции [3]. Среди трех видов этой секции *O. exserta* и *O. kamtchatica* являются эндемиами территории, охватывающей северную часть побережья Охотского моря, и прилегающие р-ны, Корякию, Камчатку и Северные Курилы; *O. revoluta* широко распространен на этих же территориях, но его ареал включает побережье Аляски и Алеутские о-ва [4]. При этом показатели изменчивости последнего ниже, чем у эндемичных видов этой секции. Возможно, здесь проявляется взаимное влияние ряда факторов, ответственных за уровень разнообразия. Существует мнение, что данный вид является производным от *O. exserta* [6], и в таких случаях родительский вид, как правило, является более полиморфным. Не менее важное значение имеет и жизненная форма растений. *O. exserta* и *O. kamtchatica* – рыхлодерновинные растения, в ценозах отдельные растения этих видов находятся на некотором расстоянии друг от друга, тогда как низкие куртины *O. revoluta* путем интенсивного ветвления побегов образуют обширные “ковры”, что значительно увеличивает вероятность близкородственного скрещивания, приводящего к потере аллельного разнообразия. Наконец, следует отметить расположение мест сбора изученных растений. Принято считать, что центральные популяции имеют больший резерв генетического разнообразия вида, в отличие от краевых [9]. Места сбора проб *O. kamtchatica* и *O. exserta* (вулкан Ключевская сопка и вулкан Мутновский) расположены в центральной части ареала каждого вида. Для растений *O. revoluta*, собранных в тех же пунктах, эти локальности являются краевыми юго-западными популяциями. Обедненность краевых популяций, а также усиление процессов отбора в субоптимальных условиях на границе ареала также могут играть важную роль в формировании невысокого уровня полиморфизма *O. revoluta*.

Для секции *Orobia* характерны полиплоидия и гибридогенез (“сетчатая эволюция”) [6]. Предполагается, что в секции *Orobia* повышенное разнообразие числа хромосом сопряжено с более поздней эволюцией в связи с климатическими изменениями и горообразованием в бореальной зоне, и что высокая плоидность хромосом у многих видов секции косвенно указывает на ее вторичное происхождение [3]. Уровень плоидности, наряду с размером ареала и системой размножения вида, относится к основным факторам, ответственным за поддержание генетического разнообразия [8]. Все изученные представители секции являются полиплоидами, для которых в целом известны повышенные показатели полиморфизма. При общем высоком уровне генетического разнообразия представителей этой секции (табл. 1), максимальные показатели параметров изменчивости выявлены у *O. erecta*, эндемичного камчатского вида. По-видимому, и в этом случае важное значение имели места сбора растений, поскольку растения изученных видов этой секции относятся к одной жизненной форме (представляют собой плотные дерновины) и не отличаются по способу размножения. Для трех видов секции, двух эндемиков и распространенного на Дальнем Востоке и в Сибири *O. ochotensis* сбор растений производили в краевых

популяциях: для *O. evenorum* и *O. ochotensis* – на восточных границах их ареалов, для эндема Южных Курил и Японии *O. hidakamontana* место сбора – о-в Шикотан – это северный предел распространения. В отличие от них исследованные популяции *O. erecta* (окрестности Петропавловска-Камчатского, Авачинская сопка) расположены близко к центру ареала вида, и поэтому, вероятно, обладают наибольшим резервом изменчивости.

Особенностью полиплоидных видов является повышенная гетерозиготность, что очевидно справедливо для высокополиплоидных видов изученных остролодочников – гекса- и октоплоидов (табл. 1). Совмещение двух и более вариантов одного фермента, а также гибридных гетерополимерных молекул мультимерных белков, которые превосходят оба типа гомомультимеров по биохимическим и физиологическим показателям, может придавать гетерозиготным растениям большую пластичность в неблагоприятных условиях. Имеются данные, что гетерозиготы лучше приспособлены к условиям экологического стресса. Очевидно, что и для изученных видов, обитающих в условиях сурового климата, в местах с нарушенным почвенным покровом, в условиях резкого колебания температуры и иссушающего воздействия сильных ветров, высокая гетерозиготность имеет адаптивное значение.

В результате проведенных исследований установлено, что изученные популяции семи видов рода *Oxytropis* имеют высокий уровень генетической изменчивости и могут служить источником материала для сохранения генофонда видов.

Исследование реакции семян на криохранение включает изучение прорастания семян. Для представителей сем. Fabaceae характерно наличие твердосемянности, которое обеспечивает физический тип покоя, и объясняется водонепроницаемостью кожуры. Семена таких растений обладают высокой стойкостью к неблагоприятным факторам среды. Исследованные виды *Oxytropis* сформировали семена с различной степенью твердосемянности (табл. 2, контроль). Самой низкой твердосемянностью обладали семена *O. kamtschatica*, самой высокой – *O. evenorum*. Вероятно, различную степень твердосемянности можно считать видоспецифической особенностью. Нарушение непроницаемости кожуры при обработке серной кислотой привело к активному прорастанию семян (табл. 2), что указывает на присутствие только физического типа покоя. С учетом увеличения всхожести после скарификации было установлено, что из исследованных видов 5 имели высокую всхожесть (свыше 60%), *O. erecta* – среднюю (табл. 2).

Таблица 2  
Всхожесть семян видов рода *Oxytropis* после скарификации и криоконсервации (–196°С)

Вид	контроль			скарификация			–196°С		
	T <sub>0</sub>	T <sub>50</sub>	G±SE,%	T <sub>0</sub>	T <sub>50</sub>	G±SE,%	T <sub>0</sub>	T <sub>50</sub>	G±SE,%
<i>O. erecta</i>	29	29	1.3±1.3	2	3	33.7±9.7	3	7	20.0±1.2
<i>O. evenorum</i>	-	-	0	1	2	62.9±12.8	3	7	21.3±4.4
<i>O. hidakamontana</i>	7	10	8.0±1.2	2	3	93.3±2.4	4	11	32.0±3.1
<i>O. kamtschatica</i>	2	11	68.0±1.2	2	3	93.6±4.2	2	9	89.3±4.8
<i>O. ochotensis</i>	2	12	36.0±1.2	2	2	87.3±5.2	2	9	62.0±3.1
<i>O. revoluta</i>	2	33	42.0±2.0	2	2	79.3±1.9	2	6	84.7±7.1

После криоконсервации семена всех видов сохранили способность к прорастанию. Реакция семян на криообработку проявилась повышением их всхожести по сравнению с контролем, и, для большинства видов, увеличением скорости прорастания. Воздействие ультранизкой температуры с последующим размораживанием было аналогично воздействию серной кислоты и, по-видимому,

также связано с повреждением семенной кожуры, однако энергия прорастания после криообработки была ниже, что, безусловно, связано с различной степенью нарушения целостности семенной кожуры. Результаты свидетельствуют об индивидуальных особенностях растений каждого вида, очевидно, связанных со степенью твердосемянности, глубиной покоя, физическими и химическими свойствами семян. Поэтому важно продолжать массовое обследование различных видов рода для эффективного сохранения их генофонда.

Таким образом, глубокое замораживание семян дальневосточных видов рода *Oxytropis* в жидком азоте не оказало отрицательного действия на их жизнеспособность и может быть использовано в качестве режима их долговременного хранения. Полученные данные вносят вклад в накопление массового экспериментального материала по изучению ответной реакции семян на криоконсервацию в жидком азоте и могут быть использованы при создании низкотемпературного банка семян. Предварительный анализ состояния генофонда видов рода *Oxytropis* позволяет охарактеризовать их аллельное и генотипическое разнообразие и дает возможность проводить мобилизацию генетических ресурсов данных видов для генного банка.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам БПИ ДВО РАН Баркалову В.Ю., Верхолат В.П. и Якубову В.В. за сбор материала.

#### Литература

1. Блинова К.Ф., Саканян Е.И. Виды *Oxytropis* DC., применяемые в тибетской медицине, и их флавоноидный состав // Раст. ресурсы. 1986. Т. 22. Вып. 2. С. 266–272.
2. Воронкова Н.М., Холина А.Б., Верхолат В.П. Биоморфология растений и прорастание семян пионерных видов вулканов Камчатки // Известия РАН. Серия биологическая. 2008. Т. 35. № 6. С. 696–702.
3. Малышев Л.И. Экологический анклава азиатского рода остролодка (*Oxytropis* DC., *Fabaceae*) в Северной Америке // Растительный мир Азиатской России. 2009. № 1(3). С. 31–43.
4. Павлова Н.С. Бобовые – *Fabaceae* // Сосудистые растения советского Дальнего Востока / Отв. ред. С.С. Харкевич. Л.: Наука, 1989. Т. 4. С. 191–339.
5. Тихонова В.Л. Долговременное хранение семян // Физиология растений. 1999. Т. 46, № 3. С. 467–476.
6. Юрцев Б.А. *Oxytropis* DC. // Арктическая флора СССР. Л.: Наука, 1986. Вып. 9. Ч. 2. С. 61–146.
7. Hamrick J.L., Godt M.J.W. Allozyme diversity in plant species // Plant population genetics, breeding, and genetic resources / Eds. Brown A.H.D., Clegg M.T., Kahler A.L., Weir B.S. Massachusetts: Sinauer Associates, Sunderland, 1989. P. 43–63.
8. Soltis P.S., Soltis D.E. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 7051–7057.
9. Vucetich J.A., Waite T.A. Spatial patterns of demography and genetic processes across the species' range: null hypotheses for landscape conservation genetics. *Conserv. Genetics*. 2003. Vol. 4. P. 639–645.