

Биология прорастания семян *Hedysarum grandiflorum* (Fabaceae) в лабораторных условиях

Germination biology of *Hedysarum grandiflorum* (Fabaceae) seeds under laboratory conditions

Лебедева А. А.¹, Бакулин С. Д.², Карасёва Т. А.¹, Сафронова И. А.¹

Lebedeva A. A.¹, Bakulin S. D.², Karasyova T. A.¹, Safronova I. A.¹

¹ ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону, Россия

E-mails: djackhorton51@gmail.com, takaras@yandex.ru, isaf@sfedu.ru

¹ Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

² ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева, г. Москва, Россия

E-mail: bakulinsd@yandex.ru

² Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

Реферат. Изучение биологии прорастания семян *Hedysarum grandiflorum* выполнялось на основе семенного материала из одной природной и одной поддерживаемой в культуре популяции Ростовской области и включало определение лабораторной всхожести при использовании различных методов предпосевной обработки, уровня твёрдосемянности, степени поражения и качественного состава фитопатогенов семян. Установлено, что для семян копеечника крупноцветкового характерен комбинированный тип покоя, обусловленный сочетанием экзогенного физического и неглубокого физиологического покоя. Устойчиво высокие показатели всхожести в лабораторных условиях наблюдаются при использовании механической скарификации, тогда как эффективность обработки серной кислотой варьирует в зависимости от года сбора и срока хранения семян. Подтверждено, что доля твёрдых семян *H. grandiflorum* при сухом хранении повышается в течение 3-х месяцев и затем постепенно снижается. Степень выявленной эндогенной инфицированности семян копеечника в изученной природной ценопопуляции выше по сравнению с семенным материалом, полученным в культуре. Среди патогенов семян по видовому разнообразию преобладают микромицеты – сапротрофы или факультативные паразиты, в количественном отношении – бактериальные возбудители.

Ключевые слова. Лабораторная всхожесть, органический покой, твёрдосемянность, эндогенная инфицированность, *Hedysarum grandiflorum*.

Summary. Germination biology of *Hedysarum grandiflorum* seeds research was conducted using seed material collected in one wild and one cultivated population growing in Rostov region and included an identification of seed laboratory germination degree, seed hardness, endogenous infection degree, and seed pathogens composition. A combinational dormancy type combining physical and non-deep physiological dormancy was identified in *Hedysarum* seeds. Stably high germination rates under laboratory conditions was demonstrated if mechanical scarification is used whereas efficiency of sulfuric acid treatment varies it relation to seeds harvest year and retention period. A proportion of hard seeds of *H. grandiflorum* is confirmed to increase during first three month of dry storage and then slowly decrease. A degree of *Hedysarum* seeds endogenous infection revealed is higher in wild population compared with seed material from cultivated plants. Micromycetes – facultative parasites and saprotrophs prevail among seed pathogens regarding their species diversity, and bacterial pathogens quantitatively.

Key words. Dormancy, endogenous infection, *Hedysarum grandiflorum*, laboratory germination, seed hardness.

Введение. Всестороннее исследование биологии редких и угрожаемых видов растений в качестве обязательного компонента предполагает определение показателей всхожести семян и выявление ведущих внешних и эндогенных факторов, влияющих на прорастание. Изучение биологии прорастания семян в лабораторных условиях позволяет установить наличие и тип органического покоя, степень эндогенной инфицированности семян, влияние продолжительности сроков хранения на уровень всхожести. Общеизвестно, что основные показатели успешности семенного воспроизводства в пределах вида существенно варьируют в зависимости от географического местоположения и локальных

условий произрастания популяций, а также погодно-климатических условий конкретного сезона. В полной мере это относится к семейству Бобовые (Fabaceae), на примере широкого круга представителей которого детально изучено явление твёрдосемянности, обусловленное особенностями строения спермодермы (Попцов, 1976; Яковлев, 1991), а также выявлен спектр возбудителей эндогенных инфекций семян и проанализировано их влияние на показатели всхожести. Тем не менее, биология семян значительного числа дикорастущих бобовых России и сопредельных стран до настоящего момента изучена недостаточно. В Красной книге Ростовской области (2014) сем. Бобовые насчитывает 18 видов, среди которых – копеечник крупноцветковый.

Копеечник крупноцветковый (*Hedysarum grandiflorum* Pall.) – травянистый стержнекорневой поликарпик, имеющий в Красной книге Ростовской области категорию статуса редкости 3в, 3д, а в Красной книге Российской Федерации (2008) категорию и статус 3в – редкий вид. Размножение только семенное. С 2001 г. вид представлен в коллекции редких и исчезающих видов растений Ростовской области Ботанического сада Южного федерального университета, где в настоящее время сформирована искусственная микропопуляция копеечника крупноцветкового площадью 60 м² и численностью около 200 разновозрастных особей (Кузьменко, Шмараева, 2022). Особенности прорастания семян вида в лабораторных условиях изучались рядом исследователей на семенном материале из природных популяций Волгоградской, Самарской, Саратовской, Ульяновской областей. Н. М. Кузнецовой (2008) определялись показатели лабораторной всхожести при различном температурном и световом режиме в зависимости от характера диаспор; установлено положительное влияние скарификации семенной кожуры на всхожесть семян. Позднее рядом авторов (Ильина, 2013; Лаврентьев, 2016; Супрун и др., 2020) выявлялись основные показатели лабораторной всхожести семян копеечника в зависимости от сроков хранения семян и способов предпосевной обработки. В качестве основного фактора, тормозящего прорастания семян, указывается экзогенный физический покой, обусловленный твёрдосемянностью, который сочетается с признаками физиологического покоя (Ильина, 2013). Информация о межпопуляционном и погодичном варьировании значений показателей всхожести, а также составе фитопатогенов семян *H. grandiflorum* в литературе не приводится.

Материал и методы. Материалом исследования послужили зрелые выполненные семена копеечника крупноцветкового, собранные в коллекции редких и исчезающих растений Ростовской области Ботанического сада Южного федерального университета (2016, 2017, 2022 гг.) (далее – питомник), а также в естественной ценопопуляции вида, произрастающей в составе каменистой степи в окрестностях с. Несветай Мясниковского р-на Ростовской области (2022 г.). Проращивание семян осуществлялось спустя 3–7 месяцев сухого хранения согласно ГОСТ 12038-84, НБ, Т, в чашках Петри, помещённых в термостат при $+24 \pm 2$ °С, в 5-ти повторностях по 20 семян в каждой во всех вариантах опыта. Каждые двое суток производился учёт проросших, набухших не проросших, аномально проросших, поражённых и твёрдых семян; в 2016–2017 гг. аномально проросшие семена учитывались вместе с проросшими. Показатели всхожести определялись через 30 суток с момента закладки опыта.

Были использованы следующие варианты предпосевной обработки (ППО) семян:

- скарификация семенной кожуры наждачной бумагой со стороны семядолей;
- воздействие 40%-м этанолом в течение 10 минут;
- промораживание: трёхкратное помещение семян во влажной марле в морозильную камеру бытового холодильника на 24 часа, чередующееся с выдерживанием семян при комнатной температуре в течение 12 часов;
- импакция: нарушение целостности семенной кожуры в районе рубчика путём встряхивания семян в замкнутом контейнере с керамзитом;
- воздействие 93%-й серной кислотой в течение 1 часа;
- контроль: семена после сухого хранения.

Полученные данные подвергались стандартной статистической обработке с помощью средств Microsoft Excel 1997–2003. Определение эндогенных патогенов семян проводилось согласно ГОСТ 13056.5–76 на основе микроморфологии спороношений с точностью до рода.

Результаты и их обсуждение. Влияние способов предпосевной обработки и продолжительности хранения на всхожесть семян *H. grandiflorum*. Показатели лабораторной всхожести семян копеечника крупноцветкового в различных вариантах опыта представлены в таблице 1.

Таблица 1

Лабораторная всхожесть семян *Hedysarum grandiflorum*

Источник семенного материала	Год сбора	Продолжительность сухого хранения, мес.	Всхожесть в разных вариантах опыта, %					
			Контроль	Скарификация	Воздействие этанолом	Промораживание	Импакция	Воздействие H ₂ SO ₄
питомник	2016	6	22 ± 4	94 ± 2	25 ± 4	17 ± 4	–	–
питомник	2017	3	43 ± 5	90 ± 3	–	–	44 ± 5	97 ± 2
питомник	2022	7	15 ± 4	80 ± 3	–	–	–	58 ± 6
Несветай	2022	7	11 ± 2	64 ± 5	–	–	–	39 ± 11

Примеч.: Прочерк означает отсутствие данных.

Анализ данных таблицы позволил выявить следующие закономерности:

1) Семена копеечника крупноцветкового, не подвергнутые предпосевной обработке, отличаются сравнительно невысокими значениями всхожести, что обусловлено характерным для данного вида явлением твёрдосемянности. Средняя всхожесть семян материала, собранного в Ростовской области (от 11 ± 2 до 43 ± 5 %), соответствует значениям, приводимым в литературе – от 12 до 48 % (Кузнецова, 2008; Ильина, 2013). Наблюдаемое в течение первых месяцев сухого хранения снижение всхожести может отчасти отражать повышение степени твёрдости семян, обусловленное постепенным уменьшением содержания в них влаги, что широко известно у многих представителей бобовых (Попцов, 1976).

2) Среди применённых способов предпосевной обработки слабо инвазивные методы (промораживание, обработка этанолом и импакция) оказались наименее эффективными: средние значения всхожести в указанных вариантах опыта не показали достоверных различий с уровнем всхожести в контрольной группе того же года эксперимента. Это несколько расходится с данными Н. А. Супрун и др. (2020), показавшим в эксперименте существенное повышение всхожести семян *H. grandiflorum* после обработки этанолом, что может объясняться разной продолжительностью сухого хранения семян или особенностями семенного материала конкретного урожая.

3) Наиболее эффективным методом ППО с точки зрения преодоления твёрдосемянности и повышения лабораторной всхожести по итогам нескольких лет наблюдений проявила себя механическая скарификация. Всхожесть скарифицированных семян в зависимости от года опыта и источника материала составила от 64 ± 5 до 94 ± 2 %, что соответствует приводимым в литературе сведениям, а для семян, хранившихся в лабораторных условиях не более полугода, превышает ранее полученные данные других исследователей (Кузнецова, 2008; Ильина, 2013; Лаврентьев, 2016; Супрун и др., 2020).

4) Использование в качестве способа ППО обработки концентрированной серной кислотой показало неоднозначные результаты. Данный метод позволил добиться полного снятия твёрдосемянности на 3-и сутки наблюдений и в эксперименте 2017 г. обеспечил наибольшее значение средней всхожести за все годы наблюдений – 97 ± 2 %, а в эксперименте 2022–2023 гг. – наибольшую дружность прорастания (рис. 1). Одновременно с этим всхожесть обработанных H₂SO₄ семян урожая 2022 г. обеих ценопопуляций, достоверно превышая значения в контрольных группах, уступает значениям, достигнутым с помощью скарификации, что обусловлено высокой степенью поражения семян фитопатогенами в данном варианте опыта.

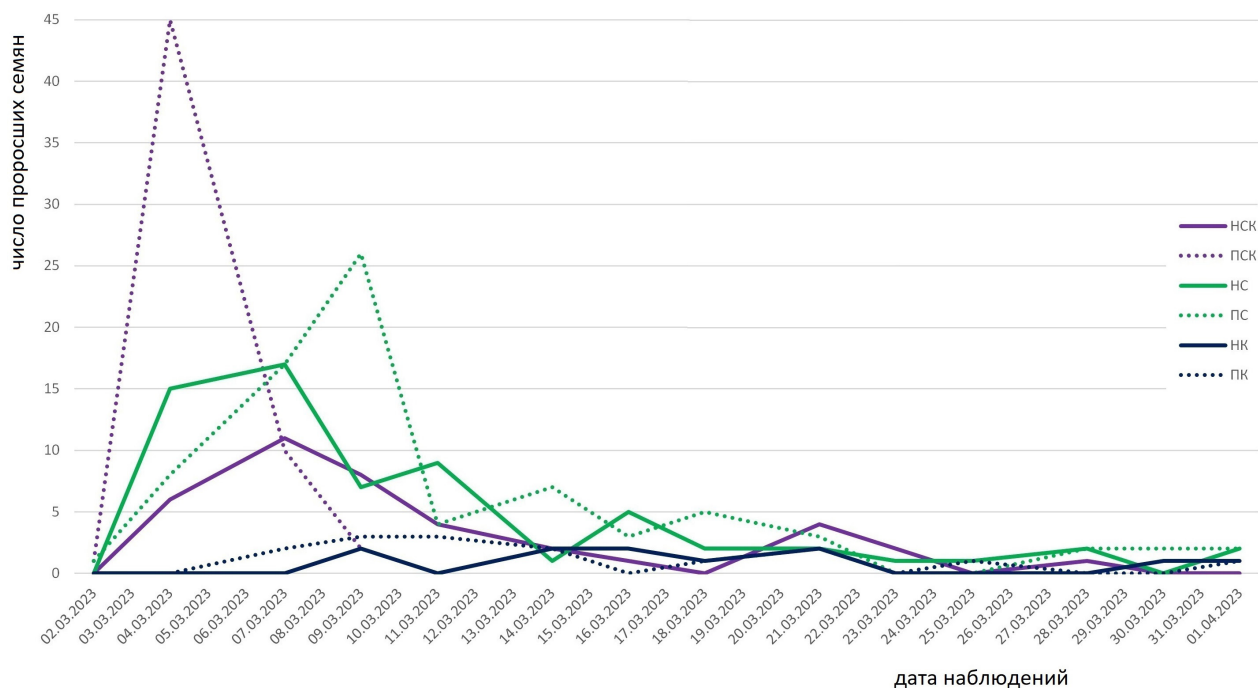


Рис. 1. Динамика прорастания семян *Hedysarum grandiflorum* из двух ценопопуляций в различных вариантах предпосевной обработки. Условные обозначения (здесь и далее): НСК – семенной материал из с. Несветай после обработки серной кислотой; ПСК – семенной материал из питомника после обработки серной кислотой; НС – семенной материал из с. Несветай после скарификации; ПС – семенной материал из питомника после скарификации; НК – семенной материал из с. Несветай, контроль; ПК – семенной материал из питомника, контроль.

Содержание не проросших семян и его вероятные причины. Распределение семян *H. grandiflorum* по категориям учёта в каждом варианте опыта 2017–2018 и 2022–2023 гг. представлено на рис. 2.

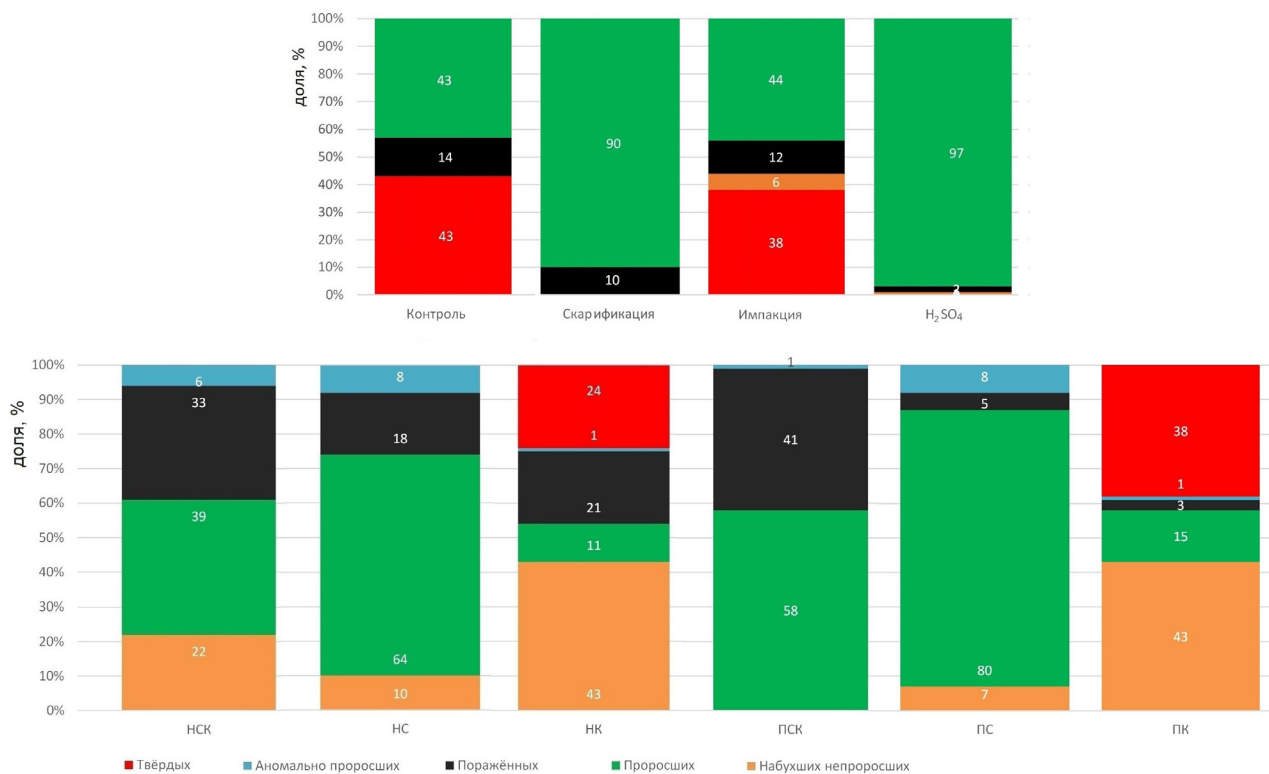


Рис. 2. Распределение проращиваемых семян *Hedysarum grandiflorum* по категориям. Условные обозначения – см. рис. 1; верхний ряд – эксперимент 2017–2018 гг., нижний ряд – эксперимент 2022–2023 гг.

В большинстве вариантов опыта через 30 суток с начала проращивания сохранились непроросшие непоражённые семена, которые могут быть представлены двумя категориями:

1) Твёрдые. Доля твёрдых семян в контрольных группах варьирует от 24 ± 6 (с. Несветай, 2022) до 43 ± 4 % (питомник, 2017), что позволяет говорить о достаточно высокой, но не абсолютной твёрдосемянности изучаемого вида. Несколько меньшее содержание твёрдых семян в материале 2016 (31 ± 5 %) и 2022 гг. (рис. 2) по сравнению с семенами 2017 г. может быть следствием частичного преодоления твёрдосемянности в процессе сухого хранения. Это согласуется с данными М. Н. Кузнецовой (2008), согласно которым доля твёрдых семян копеечника максимальна спустя три месяца сухого хранения и затем начинает снижаться. Набухание семян, заложенных на проращивание, в течение первых 15–20 дней происходит более быстрыми темпами (рис. 3). Доля семян, оставшихся твёрдыми в течение 30 суток проращивания, в материале из питомника 2022 г. приблизительно в полтора раза выше по сравнению с семенами их ценопопуляции окр. с. Несветай того же года сбора. Статистическую достоверность различий подтвердить не удалось, однако полученные данные могут говорить в пользу наличия межпопуляционной изменчивости уровня твёрдосемянности у *H. grandiflorum*, что требует дальнейшего исследования.

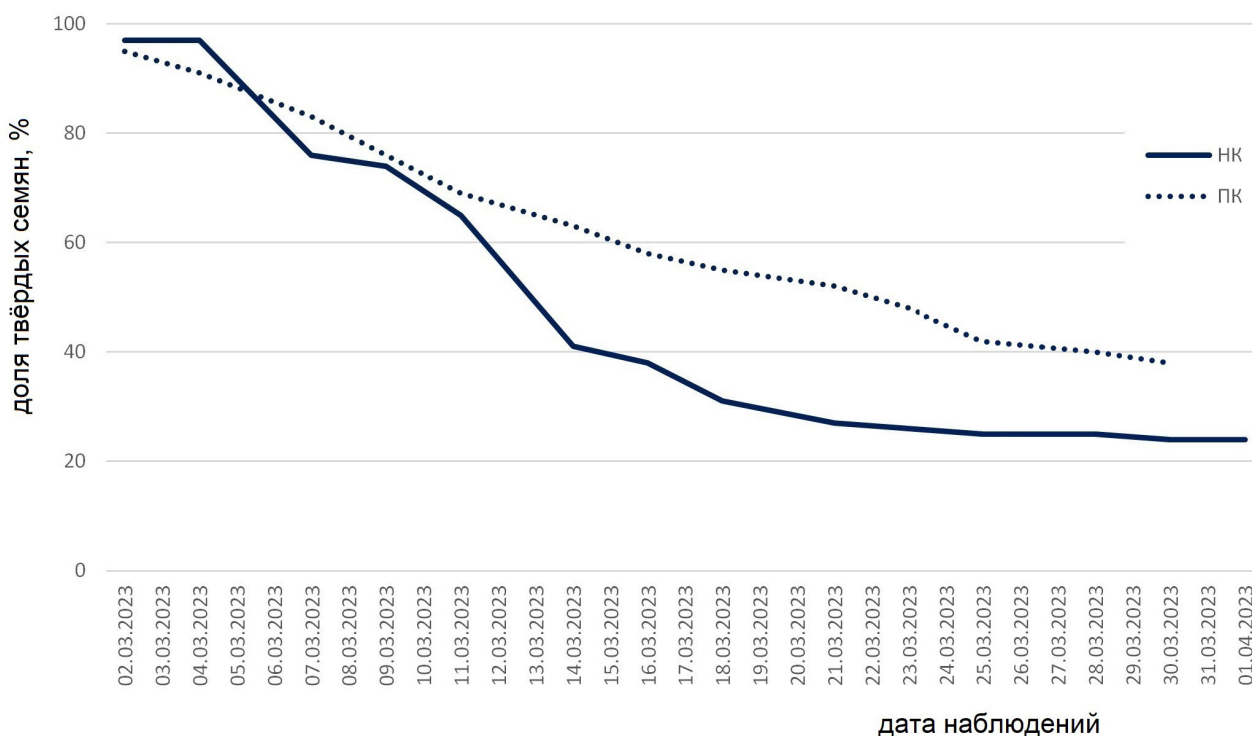


Рис. 3. Потеря твёрдости семенами *Hedysarum grandiflorum* в ходе проращивания (2022–2023 гг.). Условные обозначения – см. рис. 1.

2) Набухшие не проросшие без признаков поражения. Данная категория семян наиболее характерна для материала обеих ценопопуляций 2022 г. сбора, где в контрольном варианте достигает 43 ± 6 % (рис. 2). Представленность набухших не проросших семян в пяти из шести вариантов опыта и достаточно высокая доля этой категории в материале, не подвергнутом предпосевной обработке, позволяет предположить наличие у семян *H. grandiflorum* неглубокого физиологического покоя, что также высказывалось ранее другими авторами (Кузнецова, 2008; Ильина, 2013). В случае торможения прорастания набухших семян ингибиторами, содержащимися в тканях зародыша, преодоление покоя будет происходить более быстрыми темпами за счёт более интенсивного вымывания ингибиторов во влажной среде, чему, в свою очередь, способствует нарушение целостности семенной кожуры. Это объясняет достоверно более низкую долю покоящихся набухших семян среди скарифицированных по сравнению с контрольной группой в материале обеих ценопопуляций 2022 г. сбора.

Эндогенная инфицированность семян *H. grandiflorum*. Уровень эндогенной инфицированности семян копеечника определялся в эксперименте 2017–2018 и 2022–2023 гг. (рис. 2); его статистическая обработка и анализ качественного состава фитопатогенов проведены по материалу 2022 г. В результате проведённого анализа можно отметить следующее.

1) В эксперименте 2022 г. наибольшая доля инфицированных семян в материале из обеих ценопопуляций наблюдалась при обработке серной кислотой (33 ± 14 % в материале из с. Несветай и 41 ± 6 % в семенном материале питомника), тогда как в 2017 г. данный вариант опыта зарекомендовал себя как проявляющий стерилизующие свойства, позволивший снизить проявление эндогенных патогенов до 2 ± 2 %. Данных о влиянии H_2SO_4 на прорастание семян данного вида копеечника в литературе не приводится, тогда как информация о применении данного метода ППО к другим видам рода *Hedysarum* противоречива. Например, при обработке серной кислотой семян *Hedysarum theinum* Krasnob. их полевая всхожесть достигала 100 % (Карнаухова, Сысева, 2012); хорошие показатели лабораторной всхожести (свыше 50 %) после воздействия H_2SO_4 проявили семена 8 из 9 испытанных видов дикорастущих копеечников Кыргызстана (Конурбаева и др., 2015). Одновременно с этим воздействие серной кислотой на семенной материал *H. austrokurilense* (N. S. Pavlova) N. S. Pavlova в лабораторных условиях положительно повлияло на всхожесть семян, тогда как аналогичная обработка семян близкородственного вида *H. sachalinense* В. Fedtch. вызвало снижение всхожести с 85 ± 2 до 4 ± 0 % (Воронкова, Холина, 2010). Можно предположить, что реакция семян разных видов копеечника на обработку серной кислотой носит не только видоспецифичный характер, но также зависит от условий формирования и сроков хранения семян. В частности, отмеченные выше различия воздействия H_2SO_4 на семенной материал *H. grandiflorum* могут объясняться повышением проницаемости семенной кожуры в ходе более продолжительного хранения семян 2022 г. урожая, вследствие чего воздействие серной кислоты оказывается чрезмерно агрессивным.

2) Частота проявлений эндогенной инфицированности семян урожая 2022 г., подвергнутых менее травмирующим вариантам ППО, в семенном материале с. Несветай оказалась в несколько раз выше по сравнению с материалом питомника: 18 ± 5 и 5 ± 2 % при скарификации и 21 ± 11 и 3 ± 2 % в контроле, соответственно. Более высокая поражённость фитопатогенами семян природной ценопопуляции по сравнению с полученными из культуры, ожидаема и объясняется как персистенцией возбудителей эндогенной инфекции в популяции, так и возможным переносом фитопатогенов семядами. Достоверность различий была подтверждена на примере скарифицированных семян, что, вероятно, объясняется полным преодолением твёрдосемянности.

3) Анализ качественного состава обнаруженных фитопатогенов (табл. 2) демонстрирует, что в отношении видового разнообразия среди эндогенных патогенов преобладают микромицеты – сапротрофы – факультативные паразиты, обнаруженные исключительно на семенах с предварительно нарушенной целостностью оболочки. Отмечена единичная находка *Erysiphe communis* – специализированного облигатного паразита, часто поражающего бобовые культуры. Точного количественного учёта поражения семян отдельными видами патогенов не производилось, однако следует отметить, что более половины случаев развития инфекции составляли бактериозы. Все семена копеечника, имевшие признаки поражения, погибли, не прорастая, что может отражать общую уязвимость изучаемого вида к возбудителям эндогенных инфекций семян.

Таблица 2

Состав и распределение патогенов семян *Hedysarum grandiflorum* 2022 г. сбора

№	Фитопатоген	Вариант опыта	Трофическая группа
1	<i>Aspergillus</i> sp. 1	ПСК, НСК	Сапротроф, факультативный паразит
2	<i>Aspergillus</i> sp. 2	НСК	Сапротроф, факультативный паразит
3	<i>Alternaria</i> sp.	ПС	Сапротроф, факультативный паразит
4	<i>Erysiphe communis</i>	НК	Специализированный паразит
5	Бактериоз неясного происхождения	Все	Не определена

Примеч.: Условные обозначения к вариантам опыта – см. рис. 1.

Выводы.

1. Семена *Hedysarum grandiflorum* характеризуются комбинированным типом органического покоя: экзогенным физическим, обусловленным твёрдосемянностью, в сочетании с неглубоким физиологическим.

2. Наиболее действенный способ предпосевной обработки семян копеечника в лабораторных условиях – механическая скарификация. Обработка концентрированной серной кислотой, обеспечивая снятие твёрдосемянности и наибольшую дружность прорастания, при более длительных сроках хранения семян провоцирует развитие эндогенных патогенов.

3. Уровень твёрдосемянности копеечника крупноцветкового зависит как от продолжительности хранения семенного материала, так и, вероятно, от конкретных условий произрастания.

4. Среди патогенов семян *H. grandiflorum* по видовому разнообразию преобладают микромицеты – сапротрофы или факультативные паразиты, в количественном отношении – бактериальные возбудители.

ЛИТЕРАТУРА

Воронкова Н. М., Холина А. Б. Сохранение эндемичных видов Дальнего Востока России с помощью глубокого замораживания семян // Известия РАН. Сер. биол., 2010. – № 5. – С. 581–586.

ГОСТ 12038–84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. – М.: Стандартинформ, 2011.

ГОСТ 13056.5–76. Семена деревьев и кустарников. Методы фитопатологического анализа. – М.: Стандартинформ, 1976.

Ильина В. Н. Перспективы интродукции некоторых видов семейства Бобовые в связи с особенностями начальных периодов онтогенеза // Самарский научный вестник, 2013. – № 3(4). – С. 44–47.

Карнаухова Н. А., Сысева С. Я. Опыт создания искусственных популяций *Hedysarum theinum* (Fabaceae) // Растительный мир Азиатской России, 2012. – № 2(10). – С. 142–149.

Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) // Министерство природных ресурсов и экологии РФ, и др. Сост. Р. В. Камелин и др. – М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2008. – 855 с.

Красная книга Ростовской области. Т. 2. Растения и грибы: Изд. 2-е. – Ростов н/Д.: Минприроды Ростовской области, 2014. – 344 с.

Конурбаева Р. У., Алдаярбек кызы Гулзар, Умралина А. Р. Введение в культуру и сохранение в коллекции *in vitro* копеечников Кыргызстана // Известия вузов, 2015. – № 2. – С. 126–131.

Кузнецова М. Н. Семенное воспроизведение Копеечника крупноцветкового (*Hedysarum grandiflorum* Pall.) // Современные проблемы морфологии и репродуктивной биологии семенных растений: Материалы междунар. конф., посвящ. памяти Р. Е. Левиной (г. Ульяновск, 14–16 октября 2008 г.). Сборник науч. статей. – Ульяновск: УлГПУ, 2008. – С. 76–84.

Кузьменко И. П., Шмараева А. Н. Интродукция редкого вида *Hedysarum grandiflorum* Pall. (сем. Fabaceae Lindl.) в Ботанический сад Южного федерального университета // Биологическое разнообразие и биоресурсы степной зоны в условиях изменяющегося климата: сб. материалов Междунар. науч. конф. (г. Ростов-на-Дону, 24–29 мая 2022 г.). – Ростов н/Д., Таганрог: Изд-во ЮФУ, 2022. – С. 282–290.

Лаврентьев М. В. Характеристика репродуктивных особенностей *Hedysarum grandiflorum* (Fabaceae) в южной части Приволжской возвышенности // Бюл. Бот. сада Сарат. гос. ун-та, 2016. – Т. 14, вып. 2. – С. 35–43.

Попцов А. В. Биология твёрдосемянности. – М.: Наука, 1976. – 156 с.

Супрун Н. А., Малаева Е. В., Шумихин С. А. Особенности семенного размножения *Hedysarum grandiflorum* Pall. *ex situ* и *in vitro* // Вестн. Пермского ун-та. Сер. Биол., 2020. – Вып. 4. – С. 286–293.

Яковлев Г. П. Бобовые земного шара. – Л.: Наука, 1991. – 144 с.