



БИОЛОГИЯ

УДК 581.6:601

ПРЕОДОЛЕНИЕ ФИЗИЧЕСКОГО ПОКОЯ СЕМЯН БОБОВНИКА АНАГИРОВИДНОГО *IN VIVO* И В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

С. Н. Тимофеева¹, О. И. Юдакова², Л. А. Эльконин³

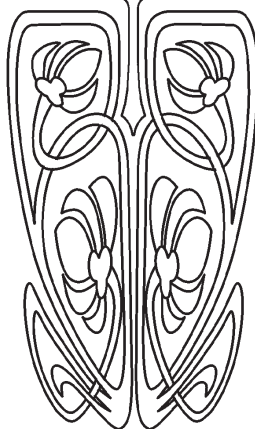
¹УНЦ «Ботанический сад» Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского

²Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

³Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока, Саратов
E-mail: yudakovaio@info.sgu.ru



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ



Laburnum anagyroides Medik. – популярное в странах Средиземноморья декоративное древесное растение, семена которого характеризуются физическим покоем, осложняющим семенное размножение. С целью преодоления физического покоя семян были протестированы следующие варианты стратификации: холодовая и тепловая обработка, переменный температурный режим. Преодообработанные семена проращивали в почвенном субстрате и на различных питательных средах в условиях *in vitro*. Наиболее эффективной оказалась предобработка семян кипящей водой в течение 20 минут с последующим культивированием их на среде MS, дополненной 0.5 мг/л БАП. Частота прорастания семян в данном варианте составляла в среднем 77.7%.

Ключевые слова: физический покой семян, стратификация, культивирование *in vitro*, бобовник анагировидный.

Breaking Physical Dormancy of the *Laburnum anagyroides* Seeds by *in vivo* and *in vitro* Conditions

S. N. Timofeeva, O. I. Yudakova, L. A. Elkonin

Laburnum anagyroides Medik. is a popular ornamental tree native to the Mediterranean region. Its seeds are characterized of a physical dormancy, complicating seed reproduction. The present study was conducted to identify the seed dormancy breaking treatments to improve seed germination. The various stratification techniques (cold and warm treatments, alternate temperature regime) were tested. Simultaneously, the seeds were germinated in soil and on different nutrient media *in vitro*. The hot water treatment for 20 minutes and followed cultivating on the MS medium, supplemented with 0.5 mg/l BAP, was a most effective (77.7–83.8% of germinate seeds).

Key words: physical seed dormancy, stratification, cultivation *in vitro*, *Laburnum anagyroides*.

DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-1-30-35

Явление физического покоя семян, или твердосемянности, обусловленное полной водо- и газонепроницаемостью семенной кожуры, широко распространено в растительном мире. Оно встречается у 25% известных на сегодня видов из 18 семейств покрытосеменных растений [1]. Среди них немало ценных сельскохозяйственных, декоративных и экономически важных культур. Видовые особенности физического покоя семян во многом зависят от жизненной формы растения и его адаптации к условиям прорастания [2–4].



Твердосемянность достаточно хорошо изучена у бобовых в силу наибольшей выраженности этого явления и практической значимости семейства. Семенная кожура бобовых состоит из четырех отдельных слоев: кутикулы, палисадной эпидермы, слоя остеосклерид и паренхимы [5]. Герметичность кожуры обеспечивают первые два внешних слоя: воскодержащая кутикула с водоотталкивающими свойствами и сильно развитая палисадная эпидерма, состоящая из длинных, узких, плотно примыкающих друг к другу вертикальных клеток. Как правило, состояние твердосемянности развивается постепенно, по мере высыхания семян на завершающих стадиях созревания или во время хранения после отделения их от материнского растения [6].

В отличие от других типов покоя семян при твердосемянности происходит не частичное, а полное прекращение поступления воды и остановка ростовых процессов [6–8]. Физический покой семян препятствует их прорастанию в неблагоприятных условиях и способствует распространению посредством эндозоохории [9]. Покой прерывается либо биотическими факторами после прохождения семян через желудочно-кишечный тракт животных, либо абиотическими, такими как высокие летние температуры почвы, зимние циклы замораживания и оттаивания. Твердосемянность, которая в природе играет положительную адаптивную роль, осложняет технологии возделывания культурных растений необходимостью искусственного выведения семян из состояния физического покоя. Поскольку особенности твердосемянности видоспецифичны, для каждого конкретного вида требуется эмпирический подбор эффективных методов ее преодоления. Такие методы, по-видимому, имитируют естественные процессы. Обычно используется скарификация, промораживание, обработка семян горячей водой или концентрированной H_2SO_4 [5, 6]. У ряда культур стимуляция прорастания покоящихся семян была успешно осуществлена при проращивании обработанных семян на питательных средах в условиях *in vitro* [10–14].

Как и для большинства бобовых, состояние физического покоя семян характерно для бобовника анагировидного (*Laburnum anagyroides* Medik., сем. Leguminosae). Это кустарник или невысокое деревце, которое за особую привлекательность в период цветения, получило своё второе название «Золотой дождь». Как декоративная культура он широко культивируется в парках и садах Средиземноморья [15], однако

в России представлен лишь единичными экземплярами в коллекциях ботанических садов. Его интродукция осложняется малой эффективностью вегетативного и семенного размножения. В нетипичных для этого вида условиях семена, как правило, не выходят из состояния физического покоя. Вопросы искусственной стимуляции прорастания семян у *L. anagyroides* недостаточно изучены: рекомендуют использовать только скарификацию концентрированной H_2SO_4 в течение 0.5–2 ч [6, 16]. Однако этот метод небезопасен для исполнителя, кроме того, в вышеуказанных работах не указывается его эффективность.

Целью проведенного нами исследования явился поиск высокоэффективных и безопасных способов преодоления физического покоя семян *L. anagyroides* с привлечением методов биотехнологии.

Материалы и методы

Донором растительного материала послужило 12-летнее деревце в генеративной фазе развития, выращиваемое в полевых условиях УНЦ «Ботанический сад» Саратовского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского. Стручки были собраны в конце сентября – начале октября, отшелушены; все дефектные, щуплые и темноокрашенные семена отбракованы. В экспериментах использовали свежесобранные выполненные семена. Исследования проводились в 2012–2014 гг.

Для стимуляции прорастания семян были протестированы следующие варианты их предобработки:

Тепловая стратификация

1-й вариант (+100°C, субстрат). Семена заливали кипящей водой, выдерживали 20 минут и высаживали в условиях теплицы в почвенный субстрат (торф : песок, 1:1).

2-й вариант (+100°C). Семена заливали кипящей водой, выдерживали 20 минут, стерилизовали и затем культивировали на питательных средах различного состава в ростовой комнате.

3-й вариант (+28°C). Простерилизованные семена помещали на поверхность питательной среды, выдерживали 2 недели в термостате при +28°C, после чего культивировали в ростовой комнате.

Холодовая стратификация

4-й вариант (+4°C). Простерилизованные семена помещали на поверхность питательных сред различного состава, выдерживали 4 недели при +4°C, затем переносили в условия ростовой комнаты.



5-й вариант (-18°C). Сухие семена выдерживали 4 недели при -18°C в условиях бытовой морозильной камеры, стерилизовали и культивировали на питательных средах различного состава в ростовой комнате.

Переменный температурный режим

6-й вариант ($+100^{\circ}/+4^{\circ}\text{C}$). Семена заливали кипящей водой, выдерживали 20 минут, стерилизовали, помещали на питательные среды и выдерживали 4 недели при $+4^{\circ}\text{C}$, после чего культивировали в ростовой комнате.

7-й вариант ($-18^{\circ}\text{C}/+100^{\circ}\text{C}$). Сухие семена выдерживали 4 недели в условиях бытовой морозильной камеры при -18°C , затем заливали кипящей водой, выдерживали 20 минут, стерилизовали и культивировали на питательных средах различного состава в ростовой комнате.

До введения в стерильную культуру семена поверхностно стерилизовали 15 минут в 0.1%-ном растворе сулемы, затем трижды промывали стерильной дистиллированной водой и помещали на поверхность питательных сред.

В экспериментах использовали 3 варианта питательных сред: 1) MS [17] без добавления фитогормонов; 2) MS, дополненную 6-бензиламинопурином, БАП (Sigma, Germany) в концентрации 0.5 мг/л; 3) WPM, Woody Plant Medium [18], дополненную 0.5 мг/л БАП. Среда содержала 20 г/л сахарозы, смесь витаминов по прописи соответствующей среды, 7 г/л агара (Panreac). pH сред был скорректирован до 5.8–6.0 до автоклавирования. Среда автоклавировали 20 минут при 120°C , охлаждали до $+40^{\circ}\text{C}$ и разливали в

чашки Петри по 25 мл. Культуры выращивали в ростовой комнате при температуре $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ при 14-часовом фотопериоде, используя OsramFluora лампы (3 klux).

Контролем служили необработанные семена, которые проращивали в условиях *in vivo* в почвенном субстрате (торф : песок, 1:1), либо после стерилизации культивировали в вышеописанных условиях *in vitro*.

Каждый вариант экспериментов включал 4 повторности по 15–20 семян. Количество проросших семян учитывали через 4 недели культивирования.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ AGROS.

Результаты и их обсуждение

В контрольном варианте частота прорастания интактных семян в почвенном субстрате (*in vivo*), как и следовало ожидать, оказалась крайне низкой (2,1%). Увеличение количества проросших в почве семян наблюдалось после их обработки кипящей водой в течение 20 минут, а также при культивировании необработанных семян на среде MS (18,9 и 13,5% соответственно). В связи с этим нами были протестированы другие способы проращивания семян, в которых различная температурная предобработка сочеталась с последующим культивированием на питательных средах разного состава. Количество развившихся проростков в протестированных вариантах значительно варьировало от 16.1 до 88.9% (таблица).

Влияние предобработки сухих семян и состава питательной среды на прорастание семян *L. anagyroides* в условиях *in vitro*

Питательная среда (фактор А)	Температурная предобработка сухих семян (фактор В), число проросших семян, %							Среднее значение по фактору А
	без (контроль)	тепловая		холодовая		переменная		
		+100°C	+28°C	+4°C	-18°C	+100°C/+4°C	-18°C/+100°C	
MS	13.5 ab	70.0 cdefhij	27.8 b	18.2 ab	26.0 ab	77.8 defhijk	80.7 fgijk	44.8 a
MS + 0.5 мг/л БАП	12.5 ab	82.3 hijk	19.9 ab	16.1 ab	19.6 ab	84.9 jk	79.7 efghijk	44.9 a
WPM + 0.5 мг/л БАП	11.2 a	80.8 ghijk	16.9 ab	17.3 ab	27.2 b	88.9 k	84.0 ijk	46.6 a
Среднее значение по фактору В	12.4 a	77.7 cde	21.5 b	17.2 ab	24.0 b	83.8 e	81.5 de	—
$F_{(A)}$ 0.33 ns $F_{(B)}$ 155.4 ** $F_{(A \times B)}$ 0.04 ns								

Примечание. Изучено 3 повторности по 10–15 штук; ns – нет достоверной разницы; ** $p \leq 0.01$; варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана.



Для выявления степени влияния на частоту проростков температурной обработки и состава питательных сред был проведен двухфакторный дисперсионный анализ полученных данных.

Культивирование *in vitro* в целом способствовало выходу семян из состояния физического покоя, однако, как показала статистическая обработка данных, состав питательной среды не влиял на частоту прорастания семян. На всех изученных средах среднее количество проросших семян было практически одинаковым (44.8–46.6 %) (см. таблицу). В то же время «качество» проростков на разных средах различалось. На среде MS с добавлением 0.5 мг/л БАП проростки развивались нормально, были «крепкими», с укороченным гипокотилем и небольшим корешком. На среде WPM с добавлением 0.5 мг/л БАП и на безгормональной MS формировались слабые, вытянутые в длину проростки с признаками витрификации тканей.

Температурная предобработка семян не только оказывала влияние на качество проростков, но и достоверно изменяла частоту их появления ($p \leq 0.01$). Неэффективным оказалось культивирование семян в течение 4 недель при температуре +4°C, мало эффективным – культивирование при температуре +28°C, а также промораживание сухих семян при –18°C с последу-

ющим их культивированием при +26°C. Частота проросших семян в этих вариантах составила в среднем 17.2, 21.5 и 24.0% соответственно.

Массовый выход семян из состояния физического покоя наблюдали в тех случаях, когда в ходе предобработки использовали кипящую воду. Однократная обработка кипятком стимулировала прорастание в среднем 77,7% семян, переменное температурное воздействие кипятком–холод (+4°C или –18°C) увеличивало количество проросших семян в среднем до 83.8 и 81.5% соответственно (см. таблицу). Несмотря на то что в результате сочетания тепловой и холодной обработки было получено максимальное количество проростков, данные варианты не могут быть рекомендованы для практического использования. При переменном температурном режиме в среднем около 10% проростков имели скрученный гипокотиль, недоразвитые или, напротив, гипертрофированные семядольные листья.

Таким образом, наиболее эффективным способом вывода семян *L. anagyroides* из состояния физического покоя является выдерживание их в кипящей воде в течение 20 минут с последующим культивированием на искусственной питательной среде MS, дополненной 0.5 мг/л БАП (рисунок, а).



а

б

Проростки *L. anagyroides*: а – развившиеся через 3 недели первичного культивирования на среде MS, дополненной 0.5 мг/л БАП (слева – после предобработки семян кипящей водой, справа – без предобработки); б – полученные при клональном микроразмножении *in vitro* через 8 недель вторичного культивирования

Эффективность высокотемпературной тепловой предобработки семян, возможно, связана с тем, что она имитирует условия внешней среды, запускающие процессы прорастания семян *L. anagyroides* в естественных условиях. Как отмечалось выше, его родиной является

Средиземноморский регион, где весенне-летний период характеризуется высокими температурами почв и выраженной флуктуацией положительных дневных и ночных температур почвенного покрова. Существует предположение, что именно высокая температура почв



является в этом регионе тем экзогенным триггером, который выводит семена из состояния физического покоя [19].

Тепловая предобработка может запускать химические процессы, приводящие к изменению состава и концентрации физиологически активных веществ. Так, Т. Horimoto et al. [20] показали, что в семенах *Styrax japonicus* после высокотемпературного воздействия увеличивается общее количество (GA_1, GA_{19}, GA_{53}) и концентрации эндогенных гибберелловых кислот, стимулирующих ростовые процессы, и снижается концентрация абсцизовой кислоты, которая ингибирует рост и развитие.

Однако следует отметить, что в наших экспериментах высокотемпературное воздействие на семена *L. anagyroides* было эффективным лишь в условиях *in vitro*, тогда как в почвенном субстрате проросло всего 18.9% обработанных кипящей водой семян. Также мало эффективным было культивирование на питательных средах интактных семян (11.2–13.5%). Только после объединения двух факторов, температурного воздействия и условий *in vitro*, наблюдался ярко выраженный синергизм их действия, в результате которого частота прорастания семян резко увеличивалась. Питательная среда обеспечивает проростки необходимыми для роста веществами в легко усваиваемой форме. Видимо, в силу этого культивирование на питательной среде может интенсифицировать процессы прорастания семян.

Проращивания семян в условиях *in vitro* не только способствует преодолению физического покоя семян, но и позволяет получать стерильный ювенильный материал, который обладает высоким морфогенетическим потенциалом и может использоваться в биотехнологических исследованиях, в том числе для клонального микроразмножения (см. рисунок, б) и селекции.

Список литературы

1. Baskin C. C., Baskin J. M. Seeds : Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination (2nd ed.). San Diego : Academic Press, 2014. 1600 p.
2. Grime J. P., Mason G., Curtis A. V., Rodman J., Band S. R., Mowforth M.A.G., Neal A. M., Shaw S. A comparative study of germination characteristics in a local flora // J. of Ecology. 1981. Vol. 69. P. 1017–1059.
3. Hu X. W., Wu Y. P., Wang Y. R. Different requirements for physical dormancy release in two populations of *Sophora alopecuroides* relation to burial depth // Ecol. Res. 2009. Vol. 24. P.1051–1056.
4. Renzi J. P., Chantre G. R., Cantamutto M. A. Effect of water availability and seed source on physical dormancy break of *Vicia villosa* ssp. *villosa* // Seed Sci. Res. 2016. Vol. 26, № 3. P. 254–263.
5. Schmidt L. H. Tropical Forest Seed. Berlin : Springer-Verlag, 2007. 408 p.
6. Николаева М. Г., Разумова М. В., Гладкова В. Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. Л. : Наука. Ленингр. отд-ние, 1985. 245 с.
7. Baskin J. M., Baskin C. C., Li X. Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds // Plant Species Biology. 2000. Vol. 15. P. 139–152.
8. Baskin J. M., Baskin C. C. Classification, biogeography, and phylogenetic relationships of seed dormancy // Seed conservation : turning science into practice. Kew, UK: The Royal Botanic Gardens Press, 2004. P. 517–544.
9. Jaganathana K. G., Yuleb K., Liu B. On the evolutionary and ecological value of breaking physical dormancy by endozoochory // Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics. 2016. Vol. 22. P. 11–22.
10. Ray A., Bhattacharya S. An improved micropropagation of *Eclipta alba* by *in vitro* priming with chlorocholine chloride // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2008. Vol. 92. P. 315–319.
11. Parveen S., Shahzad A., Saema S. *In vitro* plant regeneration system for *Cassia siamea* Lam., a leguminous tree of economic importance // Agrofor Syst. 2010. Vol. 80. P. 109–116.
12. Barekat T., Otroshy M., Samsam-Zadeh B., Sadrarhami A., Mokhtari A. A novel approach for breaking seed dormancy and germination in *Viola odorata* (A medicinal plant) // J. of Novel Appl. Scien. Available. 2013. Vol. 2, № 10. P. 513–516.
13. Dahanayake N. Application of Seed treatments to increase germinability of cardamom (*Elettaria cardamomum*) seeds under *in vitro* conditions // Sabaragamuwa Univ. J. 2014. Vol. 13, № 2. P. 23–29.
14. Rego M. M., Rego E. R., Nattrodt L. P. U., Barroso P. A., Finger F. L., Otoni W. C. Evaluation of different methods to overcome *in vitro* seed dormancy from yellow passion fruit // Afric. J. of Biotechnol. 2014. Vol. 13, № 36. P. 3657–3665.
15. Hewood V. H. Flowering plants of the world. Batsford : BT Londres, 1993. 336 p.
16. Hartmann H. T., Kester D. E., Davies F. T., Geneve R. Plant propagation : principles and practices. Berlin ; Heidelberg : Springer-Verlag, 2010. 864 p.
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. P. 473–497.
18. Lloyd G., McCown B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture // Int'l. Plant Prop. Soc. Comb. Proc. 1980. Vol. 30. P. 421–427.



19. Moreno-Casasola P., Grime J. P., Martinez L. A comparative study of the effects of fluctuations in temperature and moisture supply on hard coat dormancy in seeds of coastal tropical legumes in Mexico // *J. of Tropic. Ecology*. 1994. Vol. 10. P. 67–86.
20. Horimoto T., Koshioka M., Kubota S., Mander L. N., Hirai N., Ishida N., Suh J. K., Lee A. K., Roh M. S. Effect of warm and cold stratification on ¹H-NMR profiles, endogenous gibberellins and abscisic acid in *Styrax japonicus* seeds // *Hort. Environ. Biotechnol.* 2011. Vol. 52, № 3. P. 233–239.

Образец для цитирования:

Тимофеева С. Н., Юдакова О. И., Эльконин Л. А. Преодоление физического покоя семян бобовника анагировидного *in vivo* и в культуре *in vitro* // *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология*. 2017. Т. 17, вып. 1. С. 30–35. DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-1-30-35.

Cite this article as:

Timofeeva S. N., Yudakova O. I., Elkonin L. A. Breaking Physical Dormancy of the Laburnum Anagyroides Seeds by *in Vivo* And *in Vitro* Conditions. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2017, vol. 17, iss. 1, pp. 30–35 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-1-30-35.
