

3. Байкалова Л.П., Кожухова Е.В. Оптимизация продуктивности сенокосных травосмесей в Красноярской лесостепи // Наука и образование: Опыт, проблемы, перспективы развития: мат-лы Междунар. науч.-практ. конф. – Красноярск, 2013. – С. 209–211.
4. Байкалова Л.П., Кожухова Е.В. Оценка многолетних злаково-бобовых трав и их смесей по хозяйственно-ценным признакам // Наука и образование: Опыт, проблемы, перспективы развития: мат-лы Междунар. науч.-практ. конф. – Красноярск, 2013. – С. 206–209.
5. Болтунова Е.В. Корма – основа развития молочного скотоводства // Комбикорма. – 2004. – № 3. – С. 16.
6. Гончаров П.Л. Кормовые культуры Сибири. – Новосибирск: Изд-во НГУ, 1992. – 263 с.
7. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
8. Иванов В.П. Растительные выделения и их значение в жизни фитоценозов. – М.: Наука, 1973. – 295 с.
9. Кожухова Е.В., Косяненко Л.П. Кормовое значение многолетних бобово-злаковых травосмесей при сенокосном использовании в Красноярском крае // Вестн. КрасГАУ. – 2012. – № 9. – С. 66–69.
10. Косяненко Л.П., Аветисян А.Т. Практикум по кормопроизводству. – Красноярск: Изд-во КрасГАУ, 2012. – 335 с.
11. Косяненко Л.П., Кожухова Е.В. Состояние кормопроизводства в Красноярском крае и перспективы его развития // Аграрная Россия. – 2012. – № 4. – С. 38–40.
12. Методические указания по проведению полевых опытов с кормовыми культурами. ВНИИ кормов имени В.Р. Вильямса. – Изд. 2-е. – М., 1987. – 197 с.
13. Кормопроизводство / Н.В. Парахин, И.В. Кобозев, И.В. Горбачев [и др.]. – М.: КолосС, 2006. – 432 с.
14. Сорокин О.Д. Прикладная статистика на компьютере. – Новосибирск, 2009. – 162 с.
15. Федорова Л.Д. Влияние удобрений на урожай трав и агрохимические свойства дерново-подзолистой почвы сенокоса длительного пользования: автореф. дис. ... канд. с-х. наук. – М., 1966. – 20 с.



УДК 581.142:58.084

Н.М. Воронкова, В.П. Верхолат

ВЛИЯНИЕ ГЛУБОКОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН И РОСТ РАСТЕНИЙ *KUMMEROWIA STIPULACEA* (MAXIM.) MAKINO

Авторами статьи изучено влияние глубокого замораживания семян однолетнего бобового растения *Kummerowia stipulacea* в жидким азоте на их всхожесть. Проведен сравнительный анализ морфологических признаков растений, выращенных из замороженных семян.

Ключевые слова: *Kummerowia stipulacea*, прорастание семян, криоконсервация, растения из замороженных семян.

N.M. Voronkova, V.P. Verkholat

THE INFLUENCE OF DEEP FREEZING ON SEED GERMINATION AND PLANT GROWTH OF *KUMMEROWIA STIPULACEA* (MAXIM.) MAKINO

*The influence of the annual bean plant *Kummerowia stipulacea* seed deep freezing in the liquid nitrogen on their germination is studied by the authors. The morphological characteristic comparative analysis of the plants grown from the frozen seeds is conducted.*

Key words: *Kummerowia stipulacea*, seed germination, cryopreservation, the plants from frozen seeds.

Введение. *Kummerowia stipulacea* (Maxim.) Makino – куммеровия прилистниковая сем. *Fabaceae* (корейский клевер – Korean clover; леспедеца корейская – Korean lespedeza) – однолетнее растение, произрастает на территории России только на Дальнем Востоке в пределах трех флористических районов – Нижне-Зейского, Буреинского и Уссурийского [1]. Характеризуется как стержнекорневой травянистый монокарпик с приподнимающимся моноциклическим монокарпическим побегом [2]. В естественных местообитаниях растет на п-ове Корея, в Северном и Северо-Восточном Китае, Средней и Южной Японии [1,3]. В Приморье изучает-

лось как кормовое растение в 50–60-х годах прошлого столетия, но, несмотря на высокую питательную ценность [4] и рекомендации в качестве подсевной пастбищной культуры [5], распространения не получило. Культивируется в Австралии, Индии и Америке, где оно особо рекомендуется для подсева на выбитых и малопродуктивных пастбищах [3].

Нетребовательность *K. stipulacea* к почвенному плодородию, распространение в природе на бедных маломощных почвах, обитание на щебнистых горных склонах, песках и галечниках, устойчивость к вытаптыванию, холodu и засухе привлекает внимание к использованию данного вида при подборе фитомелиорантов. Вероятно, благодаря этим свойствам растений *K. stipulacea*, мы встречали их в числе видов зарастающих промышленных минерализованных отвалов, на участках с начальными процессами первичного почвообразования у подножья отвалов, по обочинам дорог. Вид размножается только семенами, вегетативно неподвижен. При изучении возможности использования искусственных посевов для малоплодородных и нарушенных хозяйственной деятельностью почв данный вид весьма перспективен, особенно если учесть, что растения бобовых обогащают почву азотом. С целью разработки эффективных методов улучшения деградированных земель активно изучают и других представителей бобовых, например, однолетние астрагалы [6].

Однако сохранение всхожести семян *K. stipulacea* всего в течение 2 лет [4] создает определенную проблему. Актуальным становится вопрос разработки режимов долговременного хранения семян. Известно, что общепринятый стандартный температурный режим хранения семян в банках при температуре 4°C [7] и неглубоком замораживании [8] значительно замедляет потерю их жизнеспособности по сравнению с хранением при комнатной температуре, однако длительного сохранения всхожести не обеспечивает. При этих температурах процессы метаболизма не прекращаются, идет перекисное окисление липидов. Наиболее перспективным считается сверхглубокое замораживание семян в жидком азоте при температуре –196°C (криоконсервация) с предварительным изучением реакции семян конкретных видов растений [9].

Цель исследований. Изучение влияния глубокого замораживания на жизнеспособность семян *K. stipulacea*, рост и развитие растений из деконсервированных семян.

Материалы и методы исследований. Семена *K. stipulacea* собраны в 2011 г. на участках с нарушенным почвенным покровом на зарастающих угольных отвалах открытых разработок в Приморском крае (с. Ретиховка). Площадки сбора находились в средней части склона на уплотненном участке вдоль обочины старой дороги. Популяция занимает участок до 1 м ширины. Побеги расположены довольно плотно. Сомкнутость надземной части в центральных участках достигает 100 %, а на периферии снижается до 30–50 %. На неуплотненных участках склонов встречается разреженно, что возможно связано с рыхлым субстратом поверхностных слоев с большим количеством мелких фракций, которые перемещаются при сильных ветрах и легко смываются поверхностным стоком.

До начала опытов семена хранили в течение 5 месяцев в бумажных пакетах в холодильнике. Размеры семян определяли измерением 25 шт., массу – взвешиванием 3 проб по 100 семян в каждой. Замораживание в жидком азоте проводили путем прямого погружения воздушно-сухих семян, завернутых в алюминиевую фольгу. Экспозиция – 15, 95 и 380 сут. Размораживали семена в течение 2 ч при комнатной температуре. Для сравнительного изучения при всех указанных сроках определяли всхожесть семян после замораживания и одновременно всхожесть контрольных семян, хранившихся в холодильнике. При проращивании семян регистрировали нормальность проростков. Скарификацию их проводили концентрированной серной кислотой в течение 20 мин, затем промывали в проточной воде. Контрольные семена предпосевным обработкам не подвергали.

Проращивали семена в лабораторных условиях при естественном освещении по 50 шт. в 3-кратной повторности в чашках Петри на увлажненной фильтровальной бумаге с подстилкой из ваты. Подсчет проросших семян проводили ежедневно. Всхожесть оценивали по отношению количества проросших семян к количеству, заложенных на проращивание, и выражали в процентах. Для характеристики активности прорастания семян этого вида определяли энергию прорастания (всхожесть за 3 дня, %).

Динамику морфометрических и продукционных характеристик сеянцев изучали в течение 380 дней. Проросшие семена (в контроле и после замораживания) высаживали в низкие контейнеры с почвой. Измерения и взвешивания проводили через 0,5; 1; 1,5; 2,5 мес. Морфометрические показатели сеянцев получали измерением 20 шт. в каждом образце. Сырую и сухую массу проростков в ранние фазы развития определяли как общую массу 20 шт., затем рассчитывали на 1 проросток, в поздние фазы – взвешиванием каждого растения в отдельности. Данные по всхожести, энергии прорастания, морфометрическим и продукционным при-

знакам при оценке динамики роста растений и продуктивности обработаны статистически с помощью программы Excel. Представлены средние значения и их стандартные ошибки. Для оценки различий между вариантами использовали критерий Стьюдента при уровне значимости $P=0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. Сформированные семена *K. stipulacea* были овальными, слегка приплюснутыми, нормально развитыми, $2,46\pm0,05$ (1,78–3,01) мм длины, $1,49\pm0,04$ (1,17–1,92) мм ширины. Масса 1000 шт. воздушно-сухих семян $1,35\pm0,08$ г. Для сравнения в природных популяциях диаметр семян указан до 2 мм [1].

Для выяснения ответной реакции семян на замораживание необходимо знать режимы прорастания семян при мониторинге их жизнеспособности. Дикорастущим бобовым свойственно явление твердосемянности [10]. Твердосемянность формируется как на материнском растении, так и после отделения семян во время их хранения. Прорастание этих семян сильно затруднено из-за непроницаемости семенной кожуры. Такие семена находятся в эзогенном покое, их относят к типу А_ф [11]. Для удаления твердосемянности используют приемы, нарушающие целостность семенной кожуры. Степень твердосемянности зависит от многих причин, в том числе от видовых особенностей. Подтверждение этому мы наблюдали ранее при работе с 12 видами бобовых при использовании химической скарификации серной кислотой. При этом всхожесть 11 видов повысилась значительно [12]. Повышение всхожести представителей сем. *Fabaceae* после обработки семян серной кислотой отмечалось неоднократно [13, 14]. Скарификация серной кислотой семян *K. stipulacea* хотя и привела к ускорению прорастания семян, повышению энергии и увеличению размеров проростков (разница достоверна), однако не повлияла на итоговую всхожесть семян (табл. 1). Обнаруженный уровень всхожести контрольных семян указывает на отсутствие твердосемянности. Похожая картина наблюдалась и при действии жидкого азота. Отмеченное видоспецифическое повышение всхожести после экспозиции семян в жидким азоте для ряда исследованных нами ранее видов сем. *Fabaceae* [12] для семян *K. stipulacea* почти во всех вариантах опыта статистически не подтвердилось как в отношении энергии, так и конечного процента прорастания (табл. 1). Небольшое повышение итоговой всхожести отмечено только для семян после замораживания при весеннем их посеве. Замораживание семян *K. stipulacea* в жидким азоте (температура -196°C) показало, что семена не погибли и сохранили свою жизнеспособность в пределах не ниже контрольного уровня. При этом губительного действия не оказал и срок хранения семян в жидким азоте (табл. 1). Начало прорастания отмечено через 1–2 дня как в контроле, так и в опыте.

Таблица 1

Всхожесть семян и морфометрическая характеристика 3-дневных проростков после скарификации и глубокого замораживания

Показатель (время экспозиции семян в жидким азоте, сут)	Контроль (К)	Скарификация (С)	Азот (А)
Всхожесть и энергия при прорашивании в декабре, % (15)	$53,3\pm3,7$ $5,3\pm0,7$	$46,0\pm3,5$ $41,3\pm2,7$	$51,3\pm1,8$ $10,7\pm1,8$
Всхожесть и энергия при прорашивании в апреле, % (95)	$53,3\pm1,3$ $32,7\pm4,4$	–	$63,3\pm3,5$ $38,7\pm7,9$
Всхожесть и энергия при прорашивании в феврале, % (380)	$55,3\pm6,4$ $16,0\pm4,2$	$54,7\pm4,7$ $47,3\pm2,9$	$61,3\pm6,6$ $11,3\pm1,8$
Длина корня*, мм (380)	$3,7\pm0,3$	$8,0\pm0,8$	$4,3\pm0,3$
Длина гипокотиля**, мм (380)	$5,8\pm0,4$	$8,3\pm0,6$	$6,2\pm0,2$

*К/А $t_1 - 1,43$; К/С $t_2 - 4,78$. **К/А $t_1 - 0,97$; К/С $t_2 - 3,45$.

Примечание. Семена прорашивали в чашках Петри.

Возможность применения режима сверхглубокого замораживания семян во время их хранения может быть обоснована только после изучения динамики роста и развития растений, выращенных из замороженных семян. Морфометрические и продукционные показатели роста и развития растений, полученных из семян, хранившихся в жидким азоте в течение 380 дней, представлены в табл. 2. Сравнительный анализ морфометрических и продукционных показателей не выявил статистически достоверной разницы между кон-

трольными и опытными растениями (превышение длины стебля у полупорамесчных сеянцев из замороженных семян над контрольными нивелируется на следующем этапе развития).

Таблица 2
Рост и развитие сеянцев, выращенных из семян после замораживания
в жидким азоте (криохранилище 380 сут)

Показатель	Контроль	Криохранилище	t
Время роста сеянцев 0,5 мес.			
Длина корня, мм	30,4±1,9	35,3±2,6	1,59
Длина гипокотиля, мм	39,9±1,1	38,4±2,0	0,67
Длина эпикотиля, мм	7,6±0,7	8,0±0,6	0,55
Длина семядольного листа, мм	5,2±0,1	5,1±0,1	0,65
Ширина семядольного листа, мм	3,7±0,1	3,5±0,1	0,92
Индекс формы листа (длина/ширина)	1,41	1,46	-
Длина 1-го листа, мм	5,5±0,4	5,3±0,2	0,52
Ширина 1-го листа, мм	6,0±0,4	5,8±0,2	0,48
Индекс формы листа (длина/ширина)	0,92	0,91	-
Сырая фитомасса, мг	24,25	19,0	-
Сухая фитомасса, мг (%)	3,5 (14,4)	2,75 (14,5)	-
Время роста сеянцев 1,0 мес.			
Длина корня, мм	33,6±1,5	32,7±2,0	0,48
Длина стебля, мм	47,8±1,3	48,8±1,8	0,54
Длина центральной доли настоящего листа, мм	4,4±0,3	4,7±0,4	0,91
Ширина центральной доли настоящего листа, мм	4,3±0,3	4,3±0,4	0,0
Индекс формы листа (длина/ширина)	1,02	1,09	-
Время роста сеянцев 1,5 мес.			
Длина корня, мм	52,8±2,5	60,7±4,0	1,90
Длина стебля, мм	99,3±3,9	111,2±3,1	2,33*
Число ветвей, шт.	0	0,1	-
Сырая фитомасса, мг	81,0	100,0	-
Сухая фитомасса, мг (%)	13,0 (16,05)	16,5 (16,5)	-
Время роста сеянцев 2,5 мес.			
Длина корня, мм	105,8±4,2	104,8±7,5	0,10
Длина стебля, мм	304,0±9,8	283,8±10,1	1,34
Число ветвей, шт.	2,9±0,5	3,5±0,6	0,96
Число перистых листьев, шт.	20,7±2,3	24,0±2,6	0,91
Сырая фитомасса, мг	683±80	647±76	0,32
Сухая фитомасса, мг (%)	167±14 (24,5)	163±13 (25,2)	0,21

Примечание. Семена прорашивали в контейнерах с почвой.

Очевидно, что криоконсервация не повлияла на рост и развитие растений *K. stipulacea*. Подобные результаты для представителей бобовых были получены для *Sophora flavescens* [15], *Hedysarum austrokurilense* и *H. sachalinense* [16], *Trifolium pratense* и *Medicago sativa* [17]. В то же время для ряда видов отмечены повреждения и даже гибель проростков, например, для *Phaseolus vulgaris* [17] и *Astragalus mongolicus* [18]. Поэтому оценка жизнеспособности растений и их морфологического состояния при выращивании из замороженных семян должна проводиться для каждого конкретного вида. Глубокое замораживание семян *K. stipulacea* не привело к появлению уродливых экземпляров. Статистически обоснованных различий в динамике роста и развития растений между контролем и опытом не обнаружено.

Заключение. Полученные результаты показали, что криоконсервация семян *K. stipulacea* в жидким азоте не оказала отрицательного действия на жизнеспособность семян и растений первого поколения, полученных из семян после глубокого замораживания. Применение предпосевной обработки при мониторинге лабораторной всхожести во время криохранения семян этого вида не требуется. Данные могут быть использованы при создании низкотемпературного банка семян.

Литература

1. Павлова Н.С. Бобовые – *Fabaceae* // Сосудистые растения советского Дальнего Востока. – Л.: Наука, 1989. – Т. 4. – С. 191–339.
2. Калинкина В.А. Биоморфологические особенности видов рода *Kummerowia* Schindl. (*Fabaceae*) Дальнего Востока России //Актуальные проблемы современной биоморфологии /под ред. Н.П. Савиных. – Киров: Радуга-ПРЕСС, 2012. – 610 с.
3. Васильев В.Н. Куммеровия – *Kummerowia* Schindl. // Флора СССР. – М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1948. – Т. 13. – С. 383–386.
4. Кормовые растения сенокосов и пастбищ СССР / И.В. Ларин, Ш.М. Агабабян, Т.А. Работнов [и др.]. – М.; Л.: Гос. изд-во с.-х. лит-ры, 1951. – Т. 2. – 947 с.
5. Кузина П.В. Дикорастущие бобовые Приморья и их кормовое значение // Флора и растительность Дальнего Востока. – Владивосток: БПИ АН СССР, 1970. – Вып. 1. – С. 59–86.
6. Каршибаев Ж.Х. Особенности репродукции однолетних видов рода *Astragalus* (*Fabaceae*) в полупустынной зоне Узбекистана // Растительные ресурсы. – 2013. – Т. 49. – Вып. 1. – С. 10–20.
7. Botanic gardens and the world conservation strategy. – London: Acad. Press, 1987. – 367 р.
8. Gene banks and the world's food. – Princeton, New Jersey: Princeton Univ. Press, 1987. – 247 р.
9. Николаева М.Г., Тихонова В.Л., Далецкая Т.В. Долговременное хранение семян дикорастущих видов растений. Биологические свойства семян // Консервация генетических ресурсов. Информационный материал. – Пущино: Пущинский научный центр РАН, 1992. – 36 с.
10. Попцов А.В. Биология твердосемянности. – М.: Наука, 1976. – 157 с.
11. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. – Л.: Наука, 1985. – 348 с.
12. Kholina A.B., Voronkova N.M. Seed cryopreservation of some medicinal legumes. Article ID 186891 // Journal of Botany. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–7.
13. Ruter J.M., Ingram D.L. Germination and morphology of *Sophora secundiflora* seeds following scarification // Hort Science. – 1991. – Vol. 26. – P. 236–257.
14. Baskin J.M., Nan X., Baskin C.C. A comparative study of seed dormancy and germination in an annual and perennial species of *Senna* (*Fabaceae*) // Seed Res. – 1998. – Vol. 8. – P. 501–512.
15. Воронкова Н.М., Холина А.Б. Влияние температурного фактора и скарификации на прорастание семян и рост сеянцев *Sophora flavescens* Soland. // Растительные ресурсы. – 2003. – Т. 39. – Вып. 1. – С. 43–49.
16. Воронкова Н.М., Холина А.Б. Сохранение эндемичных видов Дальнего Востока России с помощью глубокого замораживания семян // Изв. РАН. Сер. биол. – 2010. – Т. 37. – № 5. – С. 581–586.
17. Effect of cryopreservation on seed germination of different *Leguminosae* species /E. Gonzales-Benito, J.M. Pita, C. Perez [et al.] // Basic and Applied Aspects of Seed Biology. – Dordrecht, 1997. – P. 797–802.
18. 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. – Vol. 147. – P. 127–131.

