

## Краткие сообщения

УДК 581.3:502 (045)

*Е.Н. Кузнецова, О.Г. Баранова*

### ОСОБЕННОСТИ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН РЕДКОГО РАСТЕНИЯ *ASTER AMELLUS* L. В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Микроклональное размножение позволяет поддерживать в коллекции *in vitro* эксплантаты редких растений. В связи с этим были проведены работы по выявлению особенности ввода в стерильные условия с помощью семян редкого вида в Удмуртской Республике – *Aster amellus* L. Первоначальная проверка жизнеспособности семенного материала, а также ввод в культуру *in vitro* производились по общепринятым методикам. В нестерильных лабораторных условиях наилучший показатель всхожести (60 %) наблюдается при проращивании на свету и температуре 25 °С. Оптимальным вариантом стерилизации семян в условиях *in vitro* является сочетание 70 %-го раствора этилового спирта и 15 %-го раствора перекиси водорода, а также аналогичный комплекс, дополненный 1 %-м раствором нитрата серебра (всхожесть составила 30 % и 26,7 %). Использование многоступенчатой стерилизации семенного материала позволяет снизить степень зараженности первичных эксплантов, но в то же время резко увеличивается процент нежизнеспособных и аномальных эксплантов.

*Ключевые слова:* *Aster amellus* L., микроклональное размножение, проращивание семян, редкие растения, *in vitro*.

Использование биотехнологических методов существенно расширило возможности сохранения редких видов растений за пределами их естественных местообитаний (*ex situ*). Микроклональное размножение позволяет поддерживать в коллекции *in vitro* эксплантаты редких растений. В качестве первичных эксплантов возможно использование различных тканей и органов растений, в том числе и семенного материала. Но применение надземных и подземных частей растений как первичных эксплантов сильно ограничено ввиду небольшого объема и сильной степени загрязненности подобного материала. Использование семян на этапе ввода редкого вида в культуру *in vitro* позволяет получить относительно большое количество стерильных эксплантов и тем самым повысить вероятность успешности дальнейших этапов микроклонального размножения. Однако в настоящий момент не существует унифицированной методики ввода с помощью семян в стерильные условия для многих редких видов, поэтому целью данной работы было выявление особенности проращивания семян редкого вида *Aster amellus* в условиях *in vitro*.

### Материалы и методы исследований

Объектом исследования послужил вид *Aster amellus* L. (сем. *Asteraceae*), занесенный в Красную книгу Удмуртской Республики и имеющий 3 статус редкости [1]. Семена для экспериментов были собраны с растений, произрастающих в природной популяции в Малопургинском районе Удмуртии. Во всех экспериментах в каждом варианте опыта использовалось по 20 полновесных семян в трехкратной повторности. Первоначально был осуществлен подбор оптимального режима температуры и освещенности для проращивания семян, а также проверка жизнеспособности собранного семенного материала. Семена проращивались в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге по общепринятой методике [2]. Для подбора оптимальных условий проращивания были выбраны четыре варианта условий, отличающиеся как по температурному режиму, так и по режиму освещенности:

- 1) 25 °С, 16-часовой фотопериод;
- 2) стратификация (4 недели при 5 °С), после окончания стратификации проращивание при 16-часовом фотопериоде и температуре 25 °С;
- 3) 25 °С, отсутствие освещения;
- 4) стратификация (4 недели при 5 °С), после окончания стратификации проращивание при отсутствии освещения и температуре 25 °С.

Далее производился ввод *A. amellus* в культуру *in vitro* по общепринятым методикам [3; 4]. Посев семян осуществлялся на питательную среду Мурасиге-Скуга (MS) по стандартной прописи без добавления фитогормонов. Данная среда считается универсальной для культивирования большинства

видов растений [4]. Основной задачей на этапе ввода в культуру *in vitro* был подбор сочетаний стерилизующих агентов, незначительно влияющих на жизнеспособность семян и проростков, но одновременно обеспечивающих высокую степень освобождения семенной поверхности от различных патогенов. Для стерилизации материала были использованы различные химические вещества с разным временем экспозиции в них: 70 %-й раствор этилового спирта (время экспозиции семян в растворе составляет 1 мин), 15 %-й раствор перекиси водорода (10 мин), 1 %-й раствор нитрата серебра (1 мин), 10 %-й раствор препарата «Белизна» (5 мин). В ходе экспериментов была проведена ступенчатая стерилизация с использованием различных сочетаний указанных выше дезинфектантов.

Во всех экспериментах оценка проростков производилась по следующим параметрам, указанным в литературе [5]:

- 1) проросток обладает хорошо развитой корневой системой, включая главный корень;
- 2) у проростка хорошо развитое и целое подсемядольное колено;
- 3) проросток обладает неповрежденной почечкой с хорошо развитыми зелеными листьями;
- 4) у проростков двудольных две семядоли;
- 5) проростки двудольных с одной семядолью или незначительным повреждением верхних частей обеих семядолей без повреждения верхушечной почечки.

Статистическая обработка полученных экспериментальных данных производилась с использованием базового пакета анализа данных программы Microsoft Excel. Сравнение статистической достоверности различий при обработке результатов проводилось с помощью t-критерия Стьюдента, различия считали статистически значимыми при  $P < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Перед началом экспериментов была проведена оценка собранных семян по морфометрическим параметрам. Семена *A. amellus* темно-коричневые, яйцевидные, уплощенные. Семенная поверхность опушена короткими волосками, что может затруднить ее освобождение от инфекции при помощи комплекса стерилизующих агентов. Данные по количественным параметрам приведены в табл. 1.

Таблица 1

#### Морфометрические характеристики семян *Aster amellus*

Длина семян (без хохолка), мм	Ширина семян, мм	Масса 1000 семян, г
2,43±0,05	1,04±0,02	0,71±0,01

Исходя из полученных данных по морфометрическим характеристикам, семена *A. amellus* легковесные, небольшие. Имеются незначительные расхождения выявленных параметров семян с указанными в литературе [6; 7], что может быть связано с жизнеспособностью особей данного лесостепного вида на северном пределе распространения.

Согласно данным М.Г. Николаевой [8], для большинства видов семейства *Asteraceae* характерны светочувствительность, а также неглубокий физиологический тип покоя семян, преодолеваемый кратковременным воздействием низких положительных температур. При проращивании в нестерильных условиях (табл. 2) наилучший показатель всхожести был выявлен у семян, проращиваемых на свету при температуре 25 °С (60 %, различия статистически достоверны), что подтверждает литературные данные о светочувствительности семян. При стратификации всхожесть снижается, что может быть связано с продолжительным воздействием низких положительных температур на зародыш. В дальнейшем для данного вида предпосевная подготовка в виде стратификации не использовалась, семена проращивались на свету при 25 °С. Прорастание *A. amellus* начинается на 4-6 день от закладки опыта, аномалий в развитии проростков не наблюдалось.

Таблица 2

#### Всхожесть семян *Aster amellus* в нестерильных условиях

Без стратификации		Стратификация	
16-часовой фотопериод, %	Освещение отсутствует, %	16-часовой фотопериод, %	Освещение отсутствует, %
60,0±5,8	6,7±3,0	35,0±2,9	10,0±1,2

Для ввода семян в культуру *in vitro* были использованы четыре сочетания указанных выше стерилизующих агентов. Соотношение нормально проросших семян, инфицированных семян, аномалий в развитии проростков показано в табл. 3.

Таблица 3

**Сравнение комплексов стерилизующих агентов по эффективности и тератогенному воздействию на семена *Aster amellus* в условиях *in vitro***

Вариант стерилизации	Нормально проросшие семена, %	Аномалии развития, %	Непроросшие семена, %	Инфицированные семена, %
70 % спирт +10 % «Белизна»	6,7±3,3	13,3±1,7	33,3±6,7	31,7±1,1
70 % спирт +15 % перекись	30,0±5,8	20,0±2,9	45,0±2,9	5,0±0
70 % спирт +1 % нитрат серебра	20,0±5,0	11,7±1,7	40,0±2,9	28,3±1,7
70 % спирт +15 % перекись + 1 % нитрат серебра	26,7±1,7	15,0±5,0	55,0±2,9	3,3±1,7

При проращивании в условиях *in vitro* доля нормально проросших семян во всех вариантах опыта достоверно ниже по сравнению с аналогичным показателем в нестерильных условиях. При использовании любого из указанных сочетаний стерилизующих агентов возникают аномалии в развитии проростков: выявлены проростки либо без хорошо развитой корневой системы, либо с отклонениями в цвете вегетативных органов. Вероятно, снижение всхожести и появление аномалий может быть связано с высокой степенью токсичности использованных веществ и их негативным влиянием на зародыш семени. Наблюдались незначительные задержки в прорастании семян в условиях *in vitro* по сравнению с проращиванием в нестерильных условиях, прорастание *A. amellus* в условиях *in vitro* начинается на 8-10 день от закладки опыта.

Наиболее эффективными сочетаниями стерилизующих агентов оказались комплексы, состоящие из 70 %-го этилового спирта и 15 %-ой перекиси водорода, а также аналогичное сочетание с добавлением 1 %-го раствора нитрата серебра (всхожесть составила 30 % и 26,7 % соответственно), при этом доля контаминированных семян в данных вариантах обработки достоверно низкая (от 3,3 % до 5,0 %). Высокий процент инфицированных семян наблюдается при обработке комплексами веществ, состоящих из 70 %-го спирта и 10 %-го раствора препарата «Белизна» или 1 %-го раствора нитрата серебра. Данные комплексы дезинфектантов неэффективно освобождают поверхность семени от патогенов, вероятно, вследствие наличия опушения на семенной поверхности.

### Заключение

В результате проведенных экспериментов выявлены особенности прорастания семян редкого вида *Aster amellus* в стерильных условиях. Оптимальным режимом температуры и освещенности для проращивания семян данного вида является 16-часовой фотопериод и температура 25 °С, всхожесть в нестерильных условиях составила около 60 %. При использовании стерилизующих агентов для ввода семян как первичных эксплантов в культуру *in vitro* следует учитывать влияние дезинфектантов на зародыш семени. Многоступенчатая стерилизация значительно снижает жизнеспособность семян и проростков *Aster amellus*, ведет к увеличению аномалий развития, но одновременно способствует устранению патогенов с семенной поверхности. Наиболее эффективными сочетаниями стерилизующих агентов для стерилизации семян *A. amellus* явились сочетания этилового спирта, перекиси водорода и нитрата серебра (всхожесть составила 26,7 % и 30 % соответственно).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Красная книга Удмуртской Республики. 2-е изд. / отв. ред. О.Г. Баранова. Чебоксары: Перфектум, 2012. 458 с.
2. Николаева М.Г., Лянгузова И.В., Поздова Л.М. Биология семян. СПб.: НИИ химии СПбГУ, 1999. 233 с.
3. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
4. Smith R.H. Plant tissue culture. Techniques and experiments. San Diego: Academic press, 2013. 188 p.

5. Международные правила анализа семян / Пер. с англ. Н.Н. Антошкиной. М.: Колос, 1984. 310 с.
6. Броувер В., Штелин А. Справочник по семеноведению сельскохозяйственных, лесных и декоративных культур с ключом для определения важнейших семян / Пер. с нем. В.И. Леунова. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2010. 694 с.
7. Münzbergová Z., Raabová J., Castro S., Pánková H. Biological flora of Central Europe: *Aster amellus* L. (Asteraceae) // *Perspectives in plant ecology, evolution and systematics*. 2011. Vol. 13, iss. 2. P. 151-162.
8. Николаева М.Г. Особенности прорастания семян растений из подклассов Dilleniidae, Rosidae, Lamiidae и Asteridae // *Бот. журн.* 1989. Т. 74, № 5. С. 651-668.

Поступила в редакцию 18.07.17

***E.N. Kuznetsova, O.G. Baranova***

**FEATURES OF SEED GERMINATION OF RARE PLANT *ASTER AMELLUS* L. IN CULTURE *IN VITRO***

Microclonal reproduction allows to maintain in the collection *in vitro* explants of rare plants. In this connection, work was carried out to identify the peculiarities of entering into sterile conditions with the help of seeds of a rare species in the Udmurt Republic – *Aster amellus* L. Initial check of the viability of seeds, as well as introduction to culture *in vitro* were performed according to standard techniques. In non-sterile laboratory conditions the best index of germination (60 %) is observed at germinating in the light and temperature of 25 °C. The best option of seeds sterilization is a combination of 70 % ethanol and 15 % hydrogen peroxide solution and a similar set supplemented with 1% silver nitrate solution (germination was 30 % and 26,7 % respectively). The use of multistage sterilization of seed can reduce the degree of contamination of initial explants, but at the same time the percentage of non-viable and abnormal explants abruptly increases.

*Keywords:* *Aster amellus* L., microclonal reproduction, seed germination, rare plants, *in vitro*.

REFERENCE

1. *Krasnaya kniga Udmurtskoj Respubliki*. 2-e izd. [The Red Book of the Udmurt Republic. 2-d edition], O.G. Baranova (ed.), Cheboksary: Perfectum, 2012, 458 p. (in Russ.).
2. Nikolaeva M.G., Layanguzova I.V. and Pozdova L.M. *Biologiya semyan* [Biology of seeds], Saint Petersburg.: RI of chemistry SPBU, 1999, 233 p. (in Russ.).
3. Butenko R.G. *Biologiya kletok vysshikh rasteniy in vitro I bioteknologiya na ikh osnove* [Cell biology of higher plants in vitro and biotechnology based on them], M.: FBK-PRESS, 1999, 160 p. (in Russ.).
4. Smith R.H. Plant tissue culture. Techniques and experiments, San Diego: Academic press, 2013, 188 p.
5. *Mezhdunarodnyye pravila analiza semyan* [International rules of seed analysis], M.: Kolos, 1984, 310 p. (in Russ.).
6. Brower B. and Shtelin A. *Spravochnik po semenovedeniyu selskokhozyaystvennykh, lesnykh i dekorativnykh kultur s klyuchom dlya opredeleniya vazhneyshikh semyan* [Reference book on study of seeds of agricultural, forest and decorative growth with a key for identifying the most important seeds], M.: Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK, 2010, 694 p. (in Russ.).
7. Münzbergová Z., Raabová J., Castro S. and Pánková H. *Biological flora of Central Europe: Aster amellus* L. (Asteraceae), in *Perspectives in plant ecology, evolution and systematic*, vol. 13, iss. 2, 2011, pp. 151-162.
8. Nikolaeva M.G. [Features of seed germination of plants of subclass Dilleniidae. Rosidae. Lamiidae and Asteridae], in *Botanical journal*, 1989, vol. 74, no 5, pp. 651-668 (in Russ.).

Кузнецова Екатерина Николаевна, аспирант  
E-mail: pteris-2008@mail.ru

Баранова Ольга Германовна,  
доктор биологических наук, профессор,  
заведующая кафедрой ботаники и экологии растений  
E-mail: ob@uni.udm.ru

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»  
426034, Россия, г. Ижевск, ул. Университетская, 1 (корп. 1)

Kuznetsova E.N., postgraduate student  
E-mail: pteris-2008@mail.ru

Baranova O.G.,  
Doctor of Biology, Professor, Head of Department  
of botany and plant ecology  
E-mail: ob@uni.udm.ru

Udmurt State University  
Universitetskaya st., 1/1, Izhevsk, Russia, 426034