

УДК 58.084.1:58.039/.036.5:631.53.011.2/.3:582.736

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СЕМЯН СОЛОДКИ УРАЛЬСКОЙ

© 2022 г. Н. А. Кругликов¹ *, А. Г. Быструшкин², А. Ю. Беляев³

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физики металлов имени М.Н. Михеева Уральского отделения Российской академии наук,
Екатеринбург, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Ботанический сад Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия
*E-mail: nick@imp.uran.ru

Поступила в редакцию 20.09.2021 г.

После доработки 11.10.2021 г.

Принята к публикации 22.10.2021 г.

При изучении последствий воздействия на образцы семян солодки уральской сверхнизкой температуры (77 К) и высокого гидростатического давления (трехкратное воздействие давлением 100 МПа) установлен хорошо выраженный эффект преодоления твердосемянности, выразившийся в значительном повышении лабораторной всхожести семян.

DOI: 10.31857/S0367676522020144

ВВЕДЕНИЕ

Давление и температура являются важнейшими факторами окружающей среды, оказывающими прямое влияние на состояние живых организмов. Установление закономерностей действия этих факторов откроет новые пути для регуляции морфофункциональных изменений в живых системах, в частности, в семенах растений [1–10].

Крисс А.Е. ([1] и ссылки там) приводит сведения о результатах работ по изучению влияния гидростатического давления в диапазоне от 2 до 400 МПа на прорастание семян различных видов растений. В частности, приводятся данные о повышении всхожести семян бобовых растений после воздействия высоким гидростатическим давлением (до 200 МПа). Возможности экспериментальной физики по исследованию последствий воздействия давления и температуры (в особенности их экстремальных уровней), а также других физических факторов на семена растений в настоящее время значительно расширились [2–4, 10–14]. В связи с этим сохраняется интерес к использованию высоких уровней гидростатического давления и сверхнизких температур (создаваемых с применением жидкого азота) для повышения всхожести.

Для большинства видов бобовых растений характерна твердосемянность – особая форма физического (экзогенного) покоя семян [15, 16]. Се-

мена с таким типом покоя называют твердыми: их семенная кожура состоит из плотных слоев особых клеток и непроницаема для воды. Эти семена не набухают и не прорастают даже при самых благоприятных условиях увлажнения и температурного режима. После нарушения целостности семенной кожуры механическими способами (обработка наждачной бумагой), термическими воздействиями (попеременное погружение семян в кипящую и холодную воду, замораживание семян при низких и сверхнизких температурах) или при обработке серной кислотой твердые семена в большинстве своем нормально прорастают [7–12, 15, 17]. Наряду с положительным эффектом, применение таких методик сопровождается трудоемкими техническими процедурами, потерей жизнеспособности части семян. Требуется дальнейший поиск эффективных способов преодоления твердосемянности.

Большой интерес в этом плане представляет изучение последствий применения ультранизких температур (криообработки). Такие исследования проводились в связи с криохранением семян в жидком азоте (77 К) [7, 8]. Значительного повышения всхожести образцов семян ряда бобовых растений (с высоким содержанием твердых семян) удалось добиться при их замораживании в жидком азоте с последующим быстрым оттаиванием и проверкой на всхожесть [10, 11]. Влияние

экстремально низких температур на всхожесть семян солодки ранее не исследовалось.

Образцы семян солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch. — особо ценного лекарственного и технического растения из семейства бобовых), используемые для создания производственных посевов, характеризуются высоким содержанием твердых семян — от 62 до 90%, которое не снижается в течение многих лет при стандартных условиях хранения [13, 17]. С одной стороны — это механизм защиты зародыша растения от неблагоприятных условий внешней среды (засуха, заморозание почвы и т.п.), с другой — явление, препятствующее воспроизводству солодки в промышленных масштабах.

Наши предварительные исследования по обработке высоким давлением (барообработке) семян солодки уральской также были посвящены поиску новых эффективных способов преодоления твердосемянности [2, 13].

Целью данной работы являлось изучение последствий воздействия на семена солодки уральской криогенных температур и гидростатического давления для разработки новых методов преодоления твердосемянности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для обработки семян давлением от 10 до 100 МПа использовали лабораторный гидростат, заполненный индустриальным маслом, с рабочим объемом 5 л и максимальным рабочим давлением 250 МПа [14].

Гидростат состоит из нескольких основных структурных элементов: корпуса, рабочего контейнера (сосуда высокого давления), резервуара подкачки, плунжерного насоса с электродвигателем, трубопроводов высокого и низкого давления, емкости с запасом рабочей жидкости и панели управления. Панель управления содержит приборы для включения и выключения установки, рукоятки плавного набора давления, вентиль для сброса давления, манометр высокого давления и щуп для контроля уровня рабочей жидкости в емкости. Стальной полый цилиндрический толстостенный пятилитровый сосуд из высокопрочной стали выполняет роль камеры высокого давления. Он запирается крышкой из того же материала при помощи резьбового соединения и фторопластовой уплотняющей прокладки. Камера высокого давления снабжена штуцерами для слива избытка рабочей жидкости и для подвода в канал рабочей жидкости под давлением. Канал для нагнетания рабочей жидкости оборудован предохранительным клапаном, через который рабочая жидкость перетекает обратно в емкость при превышении максимального давления. Рабочую жидкость заливают в емкость через горловину и

фильтр. Для создания высокого давления в камере установку подключают к сети переменного тока и регулируют скорость набора давления и его уровень рукоятками. Такая конструкция гидростата позволяет развить давление в рабочем контейнере до 250 МПа и поддерживать его на заданном уровне в течение необходимого времени. Давление в камере можно контролировать при помощи манометра с точностью ± 5 МПа. Время достижения необходимого уровня давления зависит от объема и сжимаемости образца. В нашем случае оно составило 60 с. В качестве передающей среды могут применяться вода, спирт, машинное масло, этиленгликоль, смеси этих веществ и т.д. Мы использовали индустриальное масло И-40.

Перед проведением эксперимента семена помещали в специальную упругую оболочку, заполненную водой так, чтобы объем воды существенно превышал объем образца семян. Оболочка исключает контакт рабочей жидкости гидростата и семян. Вода передает давление семенам. Материал оболочки должен обладать достаточной упругостью, поскольку в ходе барообработки происходит существенное сжатие материала (на несколько десятков процентов) а при сбросе давления его размеры восстанавливаются до исходных. Поэтому в качестве материала упругой оболочки использовали герметичные силиконовые чехлы. Изотропность и однородность передачи давления осуществляется благодаря жидкой передающей среде, что позволяет избавиться от одноосных деформаций характерных для большинства методов механической скарификации [15]. Скорость снижения давления в камере гидростата можно регулировать. Минимальное время сброса давления может составлять менее одной секунды, при этом максимальное можно продлить до нескольких десятков секунд.

При равномерном всестороннем сжатии полнотельный выпуклый образец без пор не может разрушиться, поскольку нет условий для развития трещин и деформация однородна. Разрушение может возникнуть при снятии давления. Прорастание семени возможно если зародыш сохранит жизнеспособность, и вода проникнет в ткани зародыша, преодолев внешние покровы. При барообработке семян солодки мы старались снижать давление в течение двух-трех секунд, предполагая, что зародыш успеет реализовать запас своей пластичности, но семенная оболочка, обладающая меньшей пластичностью, получит повреждение. Проведенные нами ранее эксперименты по барообработке семян различных растений показали, что эти семена, не обладая свойством твердосемянности, после воздействия давлением более 50 МПа показывали снижение всхожести, проростки развивались хуже. В экспериментах с семенами солодки при однократном воздействии давлением 10 МПа не удалось добиться четко вы-

Таблица 1. Влияние трехкратной обработки гидростатическим давлением (набор давления 300 с; 100 МПа, 300 с; сброс давления 1 с) на характеристики семян. В столбцах таблиц с данными о набухании и прорастании семян указаны соответствующие средние значения доли в процентах и лимиты отклонений (в скобках) среди повторностей опыта. По набуханию приведена суммарная доля набухших семян, включая проросшие. Лимиты отклонений – предельные значения (минимальное и максимальное) наблюдаемого (вычисленного) показателя среди всех (в данном случае трех) повторностей опыта

Физическое воздействие	Количество семян, шт.	Доля набухших семян, %	Доля проросших семян, %
Трехкратная обработка давлением 100 МПа	150	62.7 (46–68)	47.3 (32–58)
Контроль (без барообработки)	99	7.1 (3–9.1)	2.0 (0–3)

раженного увеличения всхожести [2]. По всей видимости, такой уровень гидростатического давления не позволяет повредить внешние покровы семян солодки. Вероятность их разрушения должна зависеть от скорости деформирования и количества циклов нагружения. Поэтому были проведены эксперименты по многократному воздействию на семена солодки тем же уровнем давления с резким его сбросом, чтобы добиться большей скорости деформирования и усталостного разрушения семенных оболочек. При трехкратном воздействии давлением 10 МПа удалось зарегистрировать слабый эффект скарификации (преодоления твердосемянности) [2]. В настоящем исследовании было решено увеличить уровень давления до 100 МПа, что допустимо для семян бобовых [1], и трехкратно нагружать семена со сбросом давления в течение 1 с.

Эксперименты по воздействию высоким гидростатическим давлением были проведены с использованием семян, собранных в 2012 г. в одной природной популяции солодки уральской в Карагандинской области Республики Казахстан. До обработки семена находились в условиях сухого хранения в лаборатории при комнатной температуре в течение семи лет. Они были получены при ручной обработке зрелых плодов, собранных со многих побегов солодки. В опытах использовали хорошо очищенные от механических примесей выполненные (по внешним признакам вполне зрелые) неповрежденные семена [18, 19]. Из полученных семян отбирали фракцию с оливковой окраской семенной кожуры. Доля твердых семян в этой фракции составляет более 90%, что позволяет более четко оценить эффект скарификации от воздействия высоким давлением [2]. Ввиду ограниченного количества выполненных (полноценных) семян, полученных при очистке исходных образцов, количество семян в каждой из трех повторностей опытных вариантов не превышало 25–50 шт. После барообработки семена просушивали, чтобы не допустить преждевременного впитывания влаги. По ранее апробированной методике [13] исследовали динамику набухания и прорастания семян в климатической камере Binder при температуре 303 К в темноте согласно реко-

мендациям ГОСТ [18]. Долю набухших и проросших семян учитывали через 1, 3 и 10 сут после посева в чашки Петри. При окончательном подсчете количества набухших и проросших семян через 10 сут оценивали долю твердых семян. Результаты приведены в табл. 1.

Обработку жидким азотом другого образца семян солодки (из окрестностей города Алматы) проводили по методике, описанной в [10] для бобовых растений. Семена пробами по 25 шт. помещали в марлевые контейнеры и охлаждали со скоростью 20 К/с погружением в сосуд Дьюара с жидким азотом, выдерживали 30 с, затем вынимали из сосуда и нагревали до комнатной температуры со скоростью 1 К/с (скорости нагрева и охлаждения при таком методе обработки приводятся в работе [10] по результатам измерения платиновым термистором). Половину семян прекращали обрабатывать (М1), а вторую обрабатывали тем же способом еще раз (М2) чтобы исследовать возможность усиления эффекта при повторном воздействии (как и в случае барообработки). В контрольном варианте (К) семена оставались без обработки. В вариантах опыта были использованы по три повторности семян (по 25 шт. в каждой) для проведения статистического анализа. Определение всхожести (и проверки на твердосемянность) проводили через 13 сут при проращивании в чашках Петри в соответствии с ранее опубликованной методикой [9] и международными правилами [19].

В предварительном опыте проводили проращивание этих семян сразу после обработки жидким азотом. Скарифицирующего эффекта (преодоления твердосемянности) при этом не было выявлено. После механической скарификации наждачной бумагой контрольные и подвергшиеся воздействию жидкого азота семена одинаково быстро прорастали.

В повторном опыте семена солодки, обработанные жидким азотом (в двух вариантах, как описано выше), проращивали с соответствующим контролем через 11 мес. их хранения в бумажных пакетах при комнатной температуре в лаборатории. Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2. Влияние криообработки в жидком азоте (охлаждение до 77 К со скоростью 20 К/с [10], выдержка 5 с, нагрев со скоростью 1 К/с [10]) на характеристики семян. В столбцах таблиц с данными о набухании и прорастании семян указаны соответствующие средние значения доли в процентах и лимиты отклонений (в скобках) среди повторностей опыта. По набуханию приведена суммарная доля набухших семян, включая проросшие. Лимиты отклонений – предельные значения (минимальное и максимальное) наблюдаемого (вычисленного) показателя среди всех (в данном случае трех) повторностей опыта

Физическое воздействие	Количество семян, шт	Доля набухших семян, %	Доля проросших семян, %
Однократное замораживание (М1)	75	45.3 (36–52)	42.7 (36–48)
Двукратное замораживание (М2)	75	48.0 (36–60)	36.0 (28–48)
Контроль (К, без замораживания)	75	10.7 (4–20)	2.7 (0–8)

Для статистической обработки данных использовался дисперсионный анализ. Уровень значимости статистических критериев – общепринятый для биологических объектов ($p = 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на разницу физической сути использованных процессов обе схемы (с использованием высокого давления и криогенной температуры) позволяют воздействовать на семенную оболочку при помощи всестороннего и равномерного нагружения. В случае резкого изменения температуры механические напряжения возникают за счет разницы коэффициентов термического расширения зародыша и семенной кожуры. Интенсивность напряжений и скорость деформации обеспечиваются большими скоростями изменения температуры за счет низкой теплоемкости и относительно небольшой теплопроводности органического материала. Такая комбинация теплофизических свойств семян приводит к значительным радиальным градиентам температуры. Наиболее уязвимым местом семенной оболочки солодки в таком случае оказывается так называемый рубчик. Он играет роль клапана и позволяет отсекал сообщение зародыша с внешней средой. Как показывает электронно-микроскопическое исследование этот элемент оболочки обычно повреждается первым при химическом воздействии [12].

В табл. 1 представлены результаты проращивания семян солодки уральской после барообработки давлением 100 МПа. Выявлены значимые отличия по набуханию и прорастанию семян после барообработки от контрольного варианта. Дисперсионный анализ показал следующее. Доля дисперсии числа набухших семян, объясняемая фактором предварительной барообработки, составляет 91.8%. Влияние данного фактора на набухание семян является статистически значимым $F(1; 0.029) = 11.17$, 8.2% дисперсии приходится на не контролируемые в эксперименте случайные факторы.

Доля дисперсии числа проросших семян, объясняемая фактором предварительной барообработки, составляет 97.1%. Влияние этого фактора на прорастание семян статистически значимо $F(1; 0.004) = 34.01$, 2.9% дисперсии приходится на случайные факторы.

В табл. 2 представлены результаты проращивания семян после их кратковременного замораживания в жидком азоте и последующего сухого хранения в комнатных условиях в течение 11 мес.

Набухание семян началось в течение первых суток после начала проращивания. Через 10 сут основная часть набухших семян (кроме загнивших) проросла, и на 13-й день достигнут максимум прорастания. Не набухшие и не проросшие за 13 сут семена рассматривали как твердые. Их доля в контроле составила в среднем около 89%. После механической скарификации все твердые семена быстро проросли, что подтвердило их жизнеспособность [19]. В обоих опытных вариантах (М1 и М2, через 11 мес. после криообработки) от 37 до 45% твердых семян проросло.

Дисперсионный анализ данных эксперимента по криообработке семян солодки показал следующее. Доля дисперсии числа набухших семян, объясняемая фактором предварительной криообработки, составляет 76.9%. Влияние данного фактора на набухание семян является статистически значимым $F(2; 0.001) = 26.53$, 23.1% дисперсии приходится на не контролируемые в эксперименте случайные факторы. Доля дисперсии числа проросших семян, объясняемая фактором предварительной криообработки, составляет 96%. Влияние данного фактора на прорастание семян статистически значимо $F(2; 0.001) = 24.22$, 4% дисперсии приходится на не контролируемые в эксперименте случайные факторы.

Всхожесть семян в вариантах М1 и М2 оказалась сходной (по t -критерию Стьюдента различия статистически не значимо), примененный режим двукратной криообработки не усилил эффект скарификации. Хранение обработанных семян в течение 11 мес. могло усилить изменения в семенной коже и сделать ее проницаемой для воды,

что подтверждается данными работы [11]. Воздействие криогенной температуры (жидкого азота) на семена солодки уральской может стать вполне перспективным методом термической скарификации, если планировать посев обработанных семян через год. При этом семена солодки, не проявлявшие твердосемянность до обработки, сохраняют свои посевные качества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследованных образцах семян солодки уральской зарегистрировано существенное снижение доли твердых семян и значительное повышение лабораторной всхожести как сразу после барообработки, так и после криообработки с последующим сухим хранением в течение 11 мес. Предполагается схожесть механизмов действия этих экстремальных физических факторов на прорастание семян солодки уральской.

Полученные данные следует рассматривать как предварительные, но они могут служить основой для разработки эффективных методов предпосевной подготовки образцов семян солодки уральской с высоким содержанием фракции твердых семян.

Работа выполнена в соответствии с темами государственных заданий Института физики металлов УрО РАН (“Давление”; № АААА-А18-118020190104-3), Ботанического сада УрО РАН и Института экологии растений и животных УрО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kruss A.E.* Жизненные процессы и гидростатическое давление. М.: Наука. 1973. 272 с.
2. *Kruglikov N.A., Bystrushkin A.V., Belyaev A.Yu.* // E3S Web Conf. 2020. V. 222. Art. No. 03025.
3. *Голованчиков А.Б., Нефедьева Е.Э., Лысак В.И.* Устройства для предпосевной обработки семян ударным давлением. Волгоград: ВолГТУ. 2015. 132 с.
4. *Лебедев В.М., Платова Н.Г., Спасский А.В. и др.* // Изв. РАН. Сер. физ. 2020. Т. 84. № 4. С. 487; *Lebedev V.M., Platova N.G., Spassky A.V. et al.* // Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. 2020. V. 84. No. 4. P. 373.
5. *Лебедев В.М., Платова Н.Г., Спасский А.В. и др.* // Изв. РАН. Сер. физ. 2016. Т. 80. № 3. С. 378; *Lebedev V.M., Platova N.G., Spassky A.V. et al.* // Bull. Russ. Acad. Sci. Phys. 2016. V. 80. No. 3. P. 343.
6. *Одум Ю.* Экология. Т. 1. М.: Мир, 1986. 328 с.
7. *Холина А.Б., Воронкова Н.М.* // Растит. ресурсы. 2001. № 2. С. 39.
8. *Холина А.Б., Воронкова Н.М., Наконечная О.В. и др.* // Turczaninowia. 2015. Т. 18. № 1. P. 99.
9. *Худайбергенев Э.Б., Михайлова В.П.* // Растит. ресурсы. 1972. Т. 8. № 2. С. 225.
10. *Молодкин В.Ю.* // Науч.-техн. бюл. Пробл. семеноведения. ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова. 1985. Т. 152. С. 60.
11. *Shibata T., Sakai E., Shimomura K.* // J. Plant Physiol. 1995. V. 147. P. 127.
12. *Yousif M.A.I., Wang Ya.R., Hu X.W.* // Seed Sci. Technol. 2019. V. 47. No. 2. P. 131.
13. *Быструшкин А.Г., Кругликов Н.А., Беляев А.Ю.* // Бюлл. бот. сада Саратов. гос. ун-та. 2019. Т. 17. № 4. С. 185.
14. *Логонов Ю.Н., Каменецкий Б.И., Бульчев Д.К.* Гидростат. Пат. СССР № 95992. 1982.
15. *Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н.* Справочник по проращиванию покоящихся семян. Л.: Наука, 1985. 348 с.
16. *Baskin J.M., Baskin C.C., Li X.* // Plant Species Biol. 2000. V. 15. No. 2. P. 139.
17. *Гранкина В.П., Надежина Т.П.* Солодка уральская. Новосибирск: Наука. Сибирское отд., 1991. 152 с.
18. ГОСТ Р 55330–2012. Семена аридных кормовых культур. Посевные качества. Технические условия.
19. Международные правила анализа семян. М.: Колос, 1984. 310 с.

Effect of extreme physical factors on biological properties of licorice seeds

N. A. Kruglikov^{a, *}, A. G. Bystrushkin^b, A. Yu. Belyaev^c

^a *Mikheev Institute of Metal Physics of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620108 Russia*

^b *Botanic Garden of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620144 Russia*

^c *Institute of Plant and Animal Ecology of the Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620144 Russia*

*e-mail: nick@imp.uran.ru

During studying the effects of exposure to samples of licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) seeds by ultra-low temperature (liquid nitrogen at 77 K) and high hydrostatic pressure (three-fold exposure by a pressure of 100 MPa), a well-expressed effect of overcoming hard seededness was established, that was expressed in a significant increase of seed germination percentage.