

**ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ЛАТЕНТНОГО ПЕРИОДА РАСТЕНИЙ
НА ПРИМЕРЕ ВИДОВ СЕКЦИИ *MIRABILES* РОДА *VIOLA* (*VIOLACEAE*).
II. МОРФОЛОГИЯ СЕМЯН**

Т.В. Елисафенко

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, 630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101, e-mail: tveli@ngs.ru

Разработана методика изучения особенностей латентного периода для видов рода *Viola*. Изучена морфология семян видов секции *Mirabiles* (*V. mirabilis* и *V. subglabra*). Определена изменчивость метрических и аллометрических признаков. При исследовании скульптуры поверхности семян выявлены устьица, кристаллоносный слой и видоспецифичные признаки экзотесты.

Ключевые слова: *Viola*, секция *Mirabiles*, *Viola mirabilis*, *Viola subglabra*, морфология семян, ультраскульптура поверхности семенной кожуры.

**INVESTIGATIONS OF FEATURES OF THE LATENT PERIOD OF PLANT
BY THE EXAMPLE OF SECTION *MIRABILES* OF THE GENUS *VIOLA* (*VIOLACEAE*).
II. THE MORPHOLOGY OF SEEDS**

T.V. Elisafenko

Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, 630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya str., 101, e-mail: tveli@ngs.ru

The method of studying of characteristics of the latent period for the species of the genus *Viola* was developed. The morphology of seeds of species of section *Mirabiles* (*V. mirabilis* and *V. subglabra*) was described. The variability of metric and allometric features were determined. The stomata, crystal layer and specific features in the exotesta were revealed.

Key words: *Viola*, section *Mirabiles*, *Viola mirabilis*, *Viola subglabra*, morphology of the seeds, ultrasculptura of seed surface.

Настоящая статья является продолжением исследований по изучению особенностей латентного периода видов рода *Viola* на примере видов секции *Mirabiles* (*V. mirabilis* и *V. subglabra*). В первой части изложены методика и результаты по определению семенной продуктивности и биологии прорастания

семян (Елисафенко, 2012). Во второй части уточняются методические приемы по изучению морфологии семян и ультраскульптуры их поверхности. Рассмотрены морфология семян видов секции *Mirabiles* и ультраскульптура поверхности семенной кожуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование латентного периода кроме изучения семенной продуктивности и биологии прорастания семян включает описание морфологии семян (массу семян, макроморфологию, ультраскульптуру поверхности семян). Массу 1000 семян определяли путем 10-кратного взвешивания 100 шт., среднее арифметическое пересчитывали на 1000. При изучении макроморфологии семена замачивали на 1 сутки, измеряли под биноклем в 20-кратной повторности. Эндосперм извлекали из семени путем разреза лезвием по семенному шву и помещали в каплю воды. Зародыш освобождали из эндосперма препарировальной иглой. Для исследования использовали оборудование Центра коллективного пользования ЦСБС СО РАН – стереомикроскоп Carl Zeiss Stereo Discovery V12 с цветной цифровой камерой высокого разреше-

ния AxioCam MRc-5 и с программой AxioVision 4.8 для получения, обработки и анализа изображений. При описании применяли терминологию З.М. Артюшенко и Ал.А. Федорова (1986, 1989), Э.С. Терехина (1996), W. Barthlott (1981). Многие семена имеют на поверхности плотную кутикулу, в связи с этим изучение ультраскульптуры поверхности семенной кожуры затруднено. Для ее удаления используют различные приемы. Мы изучали семена без обработки поверхности и с обработкой ее органическими и неорганическими растворителями (бензином, толуолом, хлороформом, смесью кислот (уксусной и серной) разного соотношения – 9:1; 8:2; 7:3; 6:4 соответственно). Кроме этого исследовали семена, которые в течение 5 месяцев находились в опыте по определению лабораторной всхожести. Для исследования ультраскульп-

туры поверхности семенной кожуры сухие семена помещали в разные положения: рафе сбоку, рафе сверху и халазальной областью вверх. Результаты по морфологии семян обрабатывали методом математической статистики. Определяли M – среднее ариф-

метическое, m – его ошибку, V – коэффициент вариации, t_{05} – критерий Стьюдента при 95%-м уровне вероятности (Лакин, 1973). Поверхность семян исследовали с использованием сканирующего микроскопа Hitachi TM-1000 при увеличении от 60 до 3000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Важный аспект изучения латентного периода – морфология семян. Для изучаемых видов необходимо было выявить причину трехэтапного прорастания семян и межпопуляционные и межвидовые отличительные признаки. Нами исследована морфология семян

у двух популяций *V. mirabilis* и у одной – *V. subglabra* урожая 2009 и 2010 гг. У всех видов семена коричневого цвета, обратнойцевидные длиной более 2 мм (рис. 1, а; табл. 1). Общий облик семян един для всех популяций. Масса 1000 семян варьирует от 1.9 г

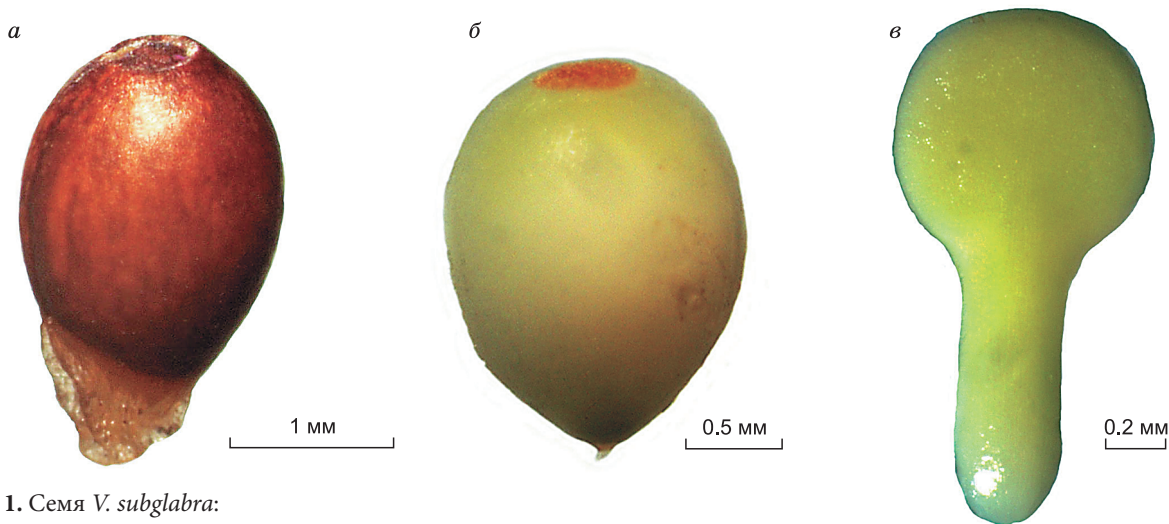


Рис. 1. Семя *V. subglabra*:

а – общий вид; б – эндосперм; в – зародыш.

Таблица 1

Морфологическая характеристика семян видов секции *Mirabiles* (сбор семян 2009 г.)

Признак		<i>V. subglabra</i>			<i>V. mirabilis</i> , Республика Алтай			<i>V. mirabilis</i> , Новосибирская область		
		$M \pm m$	$V, \%$	Диапазон значений	$M \pm m$	$V, \%$	Диапазон значений	$M \pm m$	$V, \%$	Диапазон значений
Семя	длина, мм	2.27 ± 0.03	5.70	2.05–2.50	2.34 ± 0.04	8.35	2.05–2.90	2.67 ± 0.04	7.25	2.00–3.00
	ширина, мм	1.52 ± 0.01	3.57	1.40–1.60	1.42 ± 0.02	4.74	1.30–1.50	1.56 ± 0.02	4.87	1.40–1.70
	ширина/длина	0.67 ± 0.01	6.43	0.60–0.74	0.61 ± 0.01	7.88	0.48–0.71	0.59 ± 0.01	7.06	0.54–0.70
Присемянник	длина, мм	0.93 ± 0.04	17.55	0.55–1.10	1.01 ± 0.02	9.72	0.80–1.25	1.30 ± 0.02	8.75	1.10–1.50
	диаметр, мм	0.66 ± 0.03	14.58	0.45–0.80	0.62 ± 0.01	10.51	0.45–0.70	0.83 ± 0.01	8.23	0.65–0.90
Длина присемянника/длина семени		0.40±0.02	19.54	0.22–0.49	0.43 ± 0.01	13.09	0.33–0.54	0.49 ± 0.01	9.47	0.42–0.58
Эндосперм	длина, мм	1.97 ± 0.02	5.10	1.80–2.15	1.90 ± 0.03	7.15	1.63–2.20	2.20 ± 0.02	4.69	1.95–2.35
	ширина, мм	1.50 ± 0.03	8.47	1.30–1.95	1.37 ± 0.04	11.59	1.00–1.85	1.49 ± 0.02	5.74	1.35–1.65
Длина эндосперма/длина семени		0.87±0.01	6.43	0.78–0.98	0.81 ± 0.01	6.16	0.67–0.9	0.83 ± 0.02	8.75	0.68–1.08
Длина зародыша, мм		1.87±0.02	4.97	1.70–2.05	1.81 ± 0.03	8.14	1.55–2.10	2.13 ± 0.02	5.26	1.95–2.35
Зародышевый корешок	длина, мм	0.93 ± 0.01	6.62	0.83–1.05	0.90 ± 0.02	9.92	0.75–1.10	1.03 ± 0.01	6.35	0.90–1.15
	ширина, мм	0.38 ± 0.01	5.97	0.35–0.40	0.37 ± 0.01	9.39	0.30–0.40	0.43 ± 0.01	5.86	0.40–0.45
Семядоли	длина, мм	0.94 ± 0.01	5.43	0.85–1.05	0.91 ± 0.02	8.44	0.78–1.05	1.10 ± 0.02	6.66	0.95–1.30
	ширина, мм	0.92 ± 0.02	8.87	0.75–1.05	0.88 ± 0.02	10.20	0.70–1.10	1.05 ± 0.02	7.97	0.88–1.15
	ширина/длина	0.97 ± 0.01	6.35	0.83–1.05	0.97 ± 0.01	4.83	0.88–1.05	0.96 ± 0.01	6.11	0.82–1.05
Длина зародыша/длина семени		0.83±0.01	6.37	0.73–0.93	0.77 ± 0.01	8.18	0.63–0.93	0.80 ± 0.01	6.80	0.72–0.98
Длина зародыша/длина эндосперма		0.95±0.01	5.28	0.85–1.06	0.95 ± 0.00	5.52	0.86–1.11	0.97 ± 0.02	6.97	0.87–1.15
Длина семядоли/длина зародыша		0.51±0.00	3.36	0.47–0.53	0.50 ± 0.00	4.14	0.45–0.54	0.52 ± 0.00	3.68	0.49–0.56
Длина семядоли/длина корешка		1.02±0.02	6.75	0.90–1.12	1.01 ± 0.02	8.16	0.82–1.19	1.07 ± 0.02	7.83	0.95–1.28

Критерий Стьюдента для популяций видов секции *Mirabiles*

Вид, год	Семя			Длина присемянника/длина семени	Длина эндосперма	Длина эндосперма/длина семени	Длина зародыша	Корешок		Семядоли			Длина зародыша/длина эндосперма	Длина зародыша/длина семени	Длина зародыша/длина эндосперма	Длина семидоли/длина корешка
	длина, мм	ширина, мм	ширина/длина					длина, мм	ширина, мм	длина, мм	ширина, мм	длина/ширина				
2010: <i>V. mirabilis</i> (НСО) – <i>V. subglabra</i>	5.85*	2.60*	4.83*	0.16	8.97*	0.04	7.41*	6.42*	0.99	6.04*	2.19*	2.28*	0.12	0.23	0.12	1.18*
2009: <i>V. mirabilis</i> (НСО) – <i>V. subglabra</i>	8.15*	2.45*	6.51*	3.86*	7.22*	2.12*	7.89*	5.07*	5.96*	7.76*	5.12*	0.76	0.89	1.71	0.89	2.07*
2009: <i>V. mirabilis</i> (Алтай) – <i>V. subglabra</i>	1.42	5.40*	4.51*	1.40	1.79	3.40*	1.54	0.98	1.49	1.76	1.34	0.06	0.09	2.83*	0.09	0.49
2009: <i>V. mirabilis</i> (НСО) – <i>V. mirabilis</i> (Алтай)	5.47*	6.77*	1.38	3.41*	7.86*	0.70	7.65*	5.05*	6.17*	8.07*	6.18*	0.80	0.80	1.24	0.80	2.36*
<i>V. subglabra</i> : 2009–2010 гг.	2.17*	3.61*	0.69	3.79*	4.80*	2.41*	5.01*	5.50*	0.00	2.13*	1.89	0.74	0.37	2.55*	0.37	2.73*
<i>V. mirabilis</i> (НСО): 2009–2010 гг.	0.99	2.03	0.08	1.15	1.31	0.29	2.39*	1.81	4.14*	2.35*	3.47*	2.87*	1.34	0.66	1.34	0.19

* Данные достоверно отличаются при $t_{0.05} = 2.03$ при 95%-м уровне вероятности ($n = 35$).

(*V. subglabra*) до 2.1 г (*V. mirabilis*, НСО). У последней популяции в 2010 г. были самые крупные семена длиной до 3.5 мм. Ширина семени составляла 2/3 его длины. На семенах имеется крупный присемянник типа ариллоида (ложный ариллус), карункула. Присемянник является элайосомой, т. е. образован структурой, которая служит для привлечения муравьев и способствует мирмикохории. Длина карункулы составляет от 20 до 50 % длины семени. У *V. subglabra* в 2009 г. почти 50 % семян оказались без присемянника, возможно, он был съеден личинками долгоносиков, которые встречаются в плодах фиалок. Спермодерма (семенная кожура) плотная, на поверхности выделяется халазальная область (напротив микропиле) и отчетливо выражено рафе (семенной шов). Семя белковое, эндосперм белый, рыхлый. Эндосперм составлял 80 % длины семени. Зародыш зеленый, лопатовидный, занимал более 80 % длины эндосперма. Семядоли округлые, четко ограничены от гипокотилия. Ясной границы разделения гипокотилия и радикулы (зародышевого корня) не наблюдалось, далее эти структуры обозначаем как зародышевый корешок. Его длина равна или немного больше длины семядолей (см. рис. 1, б, в). На эндосперме в халазальной области наблюдалась группа пигментированных клеток, образующих гипостазу.

Ю.А. Злобин (1989) отмечал, что разные морфологические признаки отличаются диапазоном изменчивости, имеют собственные границы изменчивости, причем амплитуда варьирования признаков специфична. Она выше у вегетативных структур и более стабилизирована у генеративных органов. У последних межпопуляционная изменчивость выше, чем внутривидовая. Однако Ю.А. Злобин подчеркивал, что разделение генетической и эколого-ценотической компоненты при полевых исследованиях непростое, наиболее надежный метод оценки компоненты – выращивание в ботаническом саду. Поскольку нами исследовались семена от растений из интродукционных популяций, то можно выделить признаки, которые зависят от погодных условий, и можно предположить о влиянии генетической компоненты на уровень изменчивости. Наиболее вариабильные признаки, как метрические, так и аллометрические, связаны с присемянником, однако значения коэффициента вариации не превышают 20 %. Причем эти показатели максимальны у *V. subglabra*, у *V. mirabilis* они были менее 13 %. Остальные 16 признаков оказались менее изменчивыми (коэффициент вариации меньше 10 %). Наблюдалась изменчивость морфологических признаков семян в зависимости от погодных условий года, причем при сравнении 2009 и 2010 г. у образцов популяции *V. subglabra* больше признаков достоверно различались, чем у *V. mirabilis* (НСО) (табл. 2). Следовательно, на формирование семян первого вида погодные условия оказывают большее влияние, чем у *V. mirabilis*. Но у обоих видов форма семян (отноше-

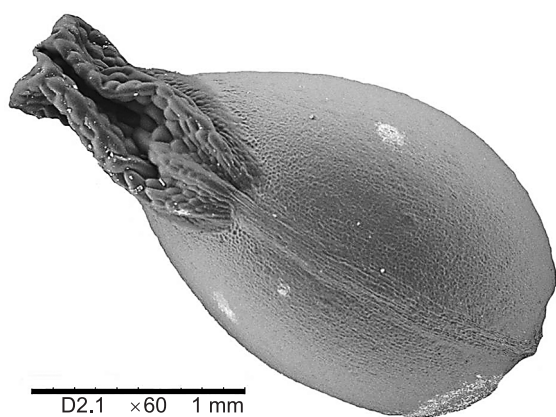


Рис. 2. Общий вид семени *V. mirabilis* под сканирующим микроскопом.

ние длины и ширины семени) не зависела от условий года. Значения этого признака не имели достоверных отличий при сравнении двух популяций *V. mirabilis*, но различались между видами *V. subglabra* и *V. mirabilis*. У первого вида семена оказались более округлыми, хотя длина семян у алтайских популяций двух видов достоверно не различалась. Семена *V. mirabilis* (НСО) были значительно крупнее. В результате статистического анализа не было выявлено достоверных различий почти по всем признакам между алтайскими популяциями *V. mirabilis* и *V. subglabra* в 2009 г. При этом 12 признаков семян *V. mirabilis* этой популяции оказались самыми изменчивыми. Возможно, условия произрастания новосибирской популяции более близки к оптимальным, а *V. subglabra* – результат симпатрического видообразования. Показатели ряда признаков семян всех популяций не имели

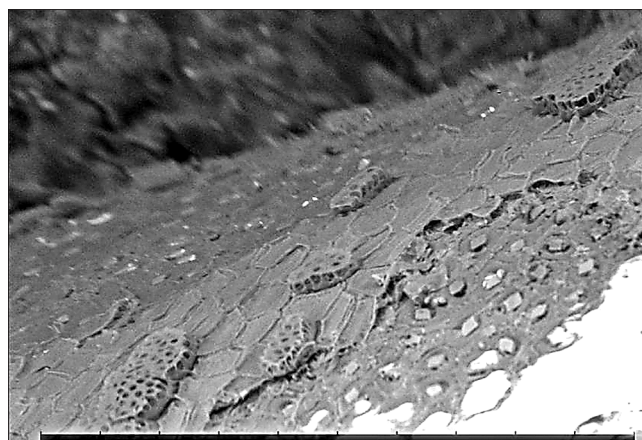


Рис. 3. *V. mirabilis*, разрушение кутикулы и верхнего слоя экзотесты у семян из опыта по прорастанию.

достоверных отличий: отношение длины зародыша к длине семени и эндосперму, а также диаметр гипостазы (пигментированные клетки эндосперма в халазальной области семени). Таким образом, исследования морфологии семян показывают хорошо сформированный, дифференцированный зародыш, что могло бы обуславливать быстрое прорастание семян, без периода покоя, так же как и у ряда видов этого подрода (Елисафенко, 2001).

Для выяснения причин глубокого физиологического покоя, выявленного у видов секции *Mirabiles* (Елисафенко, 2012), была исследована скульптура поверхности семян этих видов (рис. 2). Поверхность семян покрыта слоем кутикулы, которая разрушается при длительной стратификации (рис. 3). Было выяв-

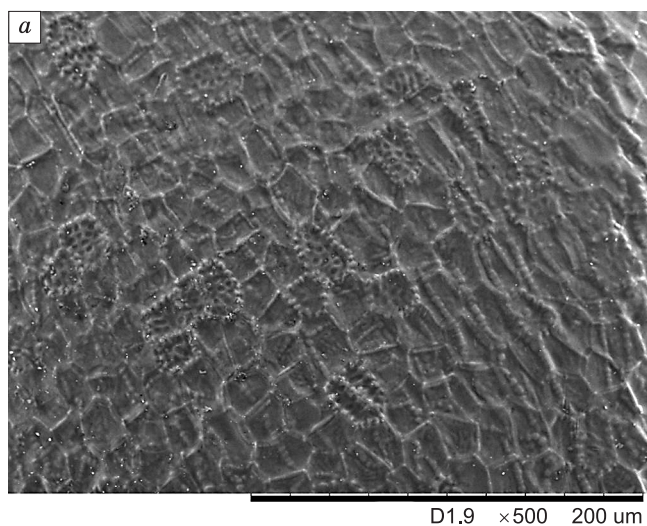
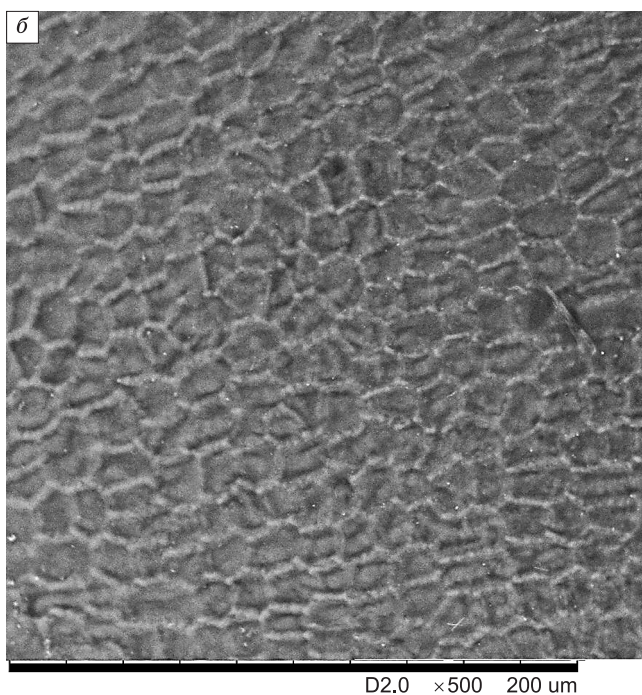


Рис. 4. Ячеистая поверхность семени:
а – *V. mirabilis*; б – *V. subglabra*.



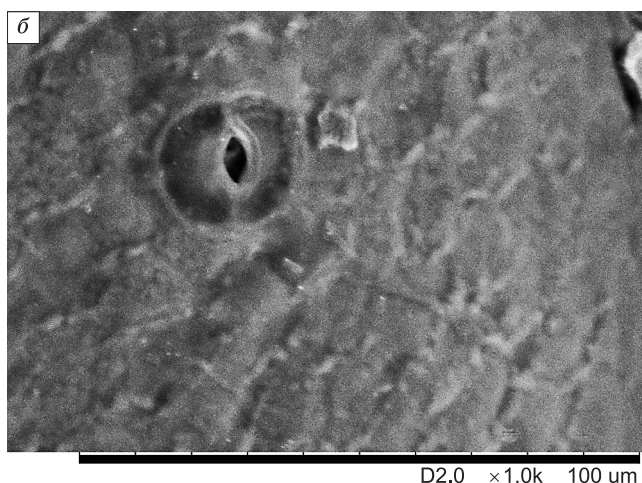
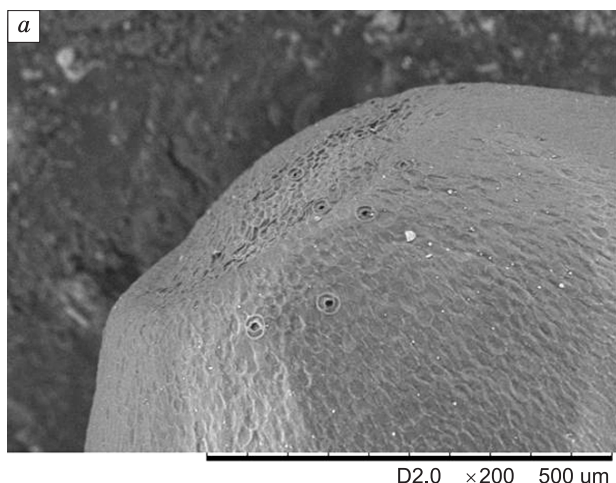


Рис. 5. Устьице:

а – *V. mirabilis*, расположение устьиц в районе халазы; *б* – *V. subglabra*, общий вид.

лено, что обработка семян в течение 1 часа смесью кислот (уксусной и серной) приводит к лизису кутикулы, причем наилучшее соотношение 8:2 соответственно. По-видимому, именно наличие кутикулы обуславливает необходимость комбинированного режима для прорастания семян. Несмотря на наличие кутикулы, поверхность семян достаточно четко видна и без какой-либо обработки. Первичная скульптура спермодермы определяется расположением клеток экзотесты, их контуром, типом анти- и периклиальных стенок, рельефом клеточных границ. У семян исследованных популяций поверхность экзотесты ячеистая, клетки изодиаметрические, антиклинальные стенки значительно приподняты над поверхностью, образуя четкую полигональную структуру ячеек поверхности (рис. 4). Антиклинальные стенки двух типов складчатые и гладкие. Периклиальные стенки также двух типов – гладкие и с сетчатой (ретикулярной) поверхностью, именно у последнего типа наблюдались складчатые антиклинальные стенки. У *V. subglabra* периклиальные стенки с сетчатой поверхностью отсутствуют (рис. 5, б). На поверхности семян обнаружены в незначительном числе устьица, которые располагаются в основном в области халазы (рис. 6). К 1990 г. было известно около 30 семейств, у которых есть устьица в спермодерме (Эмбриология растений, 1990; Терёхин, 1996). Отмечено, что они часто слабее развиты по сравнению с устьицами вегетативных органов. Обычно они без вспомогательных клеток, с искривлением пограничных клеток или закрытым отверстием в устьичную камеру. Вопросы о способности большинства таких устьиц открывать и закрывать устьичную щель остаются открытыми. Известно, что некоторые из них могут обеспечивать газообмен к зеленому зародышу. Однако устьица обнаруживали и в семенах с бесхлорофилльными покровами и зародышем. Вероятно, устьица принимают участие в выводе воды из развивающихся семян и в ее абсорбции во время прорастания. Во многих семей-

ствах роль устьиц остается неясной. Возможно, они являются реликтами (Безевинкель, Боумэн, 1990). По предварительным исследованиям ряда видов рода *Viola* нами отмечено различное расположение устьиц в спермодерме. Этот вопрос, несомненно, требует дальнейшего исследования. Размеры устьиц измерены у образцов *V. mirabilis* (Республика Алтай) и составляют 19.6–20.4 мкм длины и 17.4–30.2 мкм ширины. Литературных сведений о наличии устьиц в семенной коже рода *Viola* нами не найдено, и их значение для функций семени не ясно. Необходимо дальнейшие исследования в этом направлении по другим видам рода *Viola*. По литературным сводкам (Вылцан, 1988; Плиско, 1992) у ряда видов этого рода в спермодерме находится кристаллоносный слой с оксалатами кальция (секции *Arosulatae*, *Rosulantes*, *Viola*). Нами у видов секции *Mirabiles* также были обнаружены кристаллы оксалата кальция с ромбовидной поверхностью (см. рис. 3, 6), которые плотно располагались, образуя кристаллоносный слой.

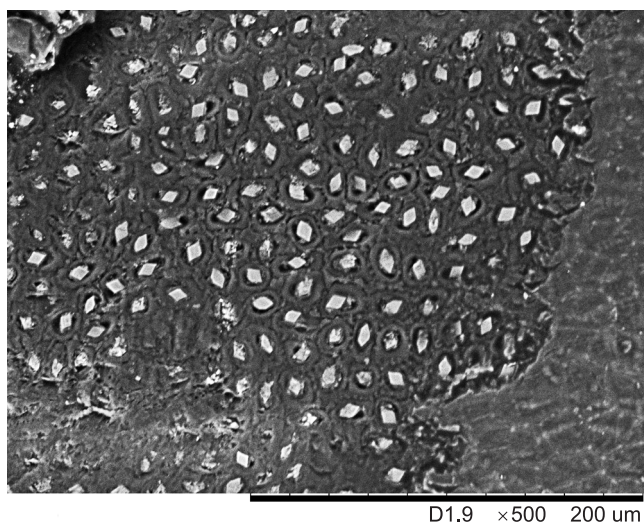


Рис. 6. Кристаллы оксалата кальция у *V. subglabra*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Масса 1000 семян видов секции *Mirabiles* около 2 г, семена длиной более 2 мм. Обильный эндосперм составляет 80 % длины семени. Лопатовидный хлорофильный дифференцированный зародыш занимает 80 % длины эндосперма. Выявлены признаки, малоизменчивые на межпопуляционном и межвидовом уровне – отношение длины зародыша к длине семени и эндосперму и диаметр гипостазы. Их показатели не имеют достоверных отличий. Форма семени и клетки с сетчатой поверхностью периклиналильных стенок – видоспецифичные признаки.

Семена *V. subglabra* были более округлые, чем у *V. mirabilis*, а в экзотесте семенной кожуры отсутствовали клетки с сетчатой поверхностью. Образцы популяций двух видов Республики Алтай (*V. mirabilis* и *V. subglabra*) имели больше сходства по морфологии семян и динамичности всхожести, чем в популяциях *V. mirabilis* (НСО и Республика Алтай). Трехэтапный режим прорастания, вероятно, объясняется наличием кутикулы, которая лизируется при холодной стратификации и обработке смесью кислот (уксусной и

серной). На поверхности семян видов секции отмечены устьица. Выявлен кристаллоносный слой с оксалатами кальция у видов секции *Mirabiles*.

Таким образом, нами обозначены необходимые приемы для изучения латентного периода видов рода *Viola*. Уточнены время сбора и способ хранения плодов для определения семенной продуктивности, условия прорастания семян (режимы, ложе, длительность этапов). Исследована грунтовая и лабораторная всхожесть семян видов секции *Mirabiles*, интенсивность энергии прорастания, которая не зависела от срока хранения семян. Выявлены отличительные морфологические признаки семян для *V. mirabilis* и *V. subglabra*. Установленные малоизменчивые признаки – отношение длины зародыша к длине семени и эндосперму и диаметр гипостазы. При изучении ультраскульптуры семенной кожуры необходимо, помимо общего характера структуры поверхности, описывать тип периклиналильных стенок, наличие устьиц и их расположение на поверхности, наличие и обилие кристаллоносных клеток.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен руководителю Центра коллективного пользования ЦСБС СО РАН Александру Анатольевичу Красникову за помощь в исследованиях.

Исследования выполнены при финансовой поддержке в рамках программ РФФИ, № 13-04-00351 и президиума РАН “Живая природа: современное состояние и проблемы развития”, № 30 и Интеграционного проекта СО РАН, № 20.

ЛИТЕРАТУРА

- Артюшенко З.М., Федоров Ал.А. Атлас по описательной морфологии высших растений. Плод. Л., 1986. 392 с.
- Артюшенко З.М., Федоров Ал.А. Атлас по описательной морфологии высших растений. Семя. Л., 1989. 360 с.
- Безвинкель Ф.Д., Боумэн Ф. Семя: структура // Эмбриология растений: использование в генетике, селекции, биотехнологии: в 2-х томах. М., 1990. Т. 2. С. 150–198.
- Вылцан Н.Ф. Сравнительно-анатомическая характеристика семенной кожуры представителей рода *Viola* L. Сибири // Актуальные вопросы ботаники в СССР. Алма-Ата, 1988. С. 379–380.
- Елисафенко Т.В. Морфология и биология прорастания семян редких сибирских видов рода *Viola* (*V. alexandrowiana*, *V. dactyloides*, *V. incisa*, *V. irtutiana*) // Растительные ресурсы. 2001. Т. 37, вып. 1. С. 40–46.
- Елисафенко Т.В. Изучение особенностей латентного периода растений на примере видов секции *Mirabiles* рода *Viola* (*Violaceae*). I. Семенная продуктивность и биология прорастания семян // Раст. мир Азиатской России. 2012. № 2 (10). С. 66–72.
- Злобин Ю.А. Принципы и методы изучения ценологических популяций растений. Казань, 1989. 146 с.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М., 1973. 342 с.
- Плиско М.А. Семейство *Violaceae* // Сравнительная анатомия семян. СПб., 1992. С. 99–109.
- Терёхин Э.С. Семя и семенное размножение. СПб., 1996. 377 с.
- Эмбриология растений: использование в генетике, селекции, биотехнологии. М., 1990. Т. 2. 463 с.
- Barthlott W. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects // Nordic J. Bot. 1981. V. 1, No. 3. P. 345–355.