

Использование особенностей микроморфологии поверхности семян сорных растений *Securigera varia* (L.) Lassen и *Coronilla scorpioides* (L.) W.D.J. Koch для их идентификации в фитосанитарной практике

* РАЗУМОВА Е.В.¹, ОРЛОВА Ю.В.², КУЛАКОВА Ю.Ю.³

¹ Воронежский филиал ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), г. Воронеж, Россия, 394042

^{2,3} ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия, 140150

¹ ORCID 0000-0003-2485-6439, e-mail: ERazumova18@mail.ru

² ORCID 0000-0002-3330-6976, e-mail: orl-jul@mail.ru

³ ORCID 0000-0002-9973-7584, e-mail: thymus73@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Сорные виды семейства Бобовые (Fabaceae) часто засоряют зерновую продукцию, снижая ее качество. Видовая идентификация семян этой группы сорных растений в испытательных лабораториях проводится по комплексу видимых морфологических макропризнаков методом световой микроскопии. При этом во многих случаях достоверно установить видовую принадлежность семян бобовых затруднительно по причине значительной морфологической схожести диаспор. В современных исследованиях особенности микроморфологии поверхности семян успешно используются для идентификации других таксонов различных рангов. Однако, использование микропризнаков семян в практике фитосанитарной диагностики обычно затруднено из-за долгой пробоподготовки образцов и отсутствия необходимого оборудования высокого разрешения. Эти трудности легко преодолимы с помощью современного сканирующего электронного микроскопа Hitachi TM4000Plus, который позволяет проводить исследование сухих образцов в режиме низкого вакуума без их дополнительной пробоподготовки. В работе методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) проведено исследование микроморфологии и ультраскульптуры поверхности семян сорных видов семейства Fabaceae – *Securigera varia* (L.) Lassen и *Coronilla scorpioides* (L.) W.D.J. Koch – в целях оценки диагностической значимости микропризнаков при их идентификации. Объектами исследования послужили образцы семян из научных гербарных коллекций (МНА, ЛЕ, ВОР), а также собственные карпологические и гербарные материалы,

Using the micromorphology characters of the surface of weed seeds *Securigera varia* (L.) Lassen and *Coronilla scorpioides* (L.) W.D.J. Koch for their identification in phytosanitary practice

* ELENA V. RAZUMOVA¹, YULIA V. ORLOVA², YULIANA YU. KULAKOVA³

¹ Voronezh Branch of FGBU "All-Russian Plant Quarantine Center" (FGBU "VNIICR"), Voronezh, Russia, 394042

^{2,3} FGBU "All-Russian Plant Quarantine Center" (FGBU "VNIICR"), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150

¹ ORCID 0000-0003-2485-6439, e-mail: ERazumova18@mail.ru

² ORCID 0000-0002-3330-6976, e-mail: orl-jul@mail.ru

³ ORCID 0000-0002-9973-7584, e-mail: thymus73@mail.ru

ABSTRACT

Fabaceae weeds often contaminate grain products, reducing its quality. Seed species identification of this weed group in test laboratories is carried out by a complex of visual morphological macrocharacters by light microscopy. However, in many cases it is difficult to identify the species of Fabaceae seeds due to considerable morphological similarity of diaspores. In modern research, micromorphology peculiarities of seed surface are used successfully to identify other taxa of various ranks. Nevertheless, using microcharacters of seeds in phytosanitary diagnosis is usually handicapped by a long sample preparation and lack of necessary equipment of high dimension. These difficulties are easily coped with by a modern scanning electronic microscope Hitachi TM4000Plus, which allows to study dry samples in a low vacuum mode without an additional sample preparation. Using the method of scanning electron microscopy (SEM), there has been studied the micromorphology and ultrasculpture of seed surface of Fabaceae weed species – *Securigera varia* (L.) Lassen and *Coronilla scorpioides* (L.) W.D.J. Koch – to estimate the diagnostic value of macrocharacters while their identification. The objects of the study were seed samples of academic herbarium collections (MHA, LE, VOR), as well as personal carpologic and herbarium materials collected by the authors in different regions of European Russia during

собранные авторами в различных районах европейской части России в ходе экспедиционных выездов 2021–2022 гг. В процессе изучения выявлены основные различия во вторичной ультраструктуре боковой поверхности семени, в первичной, вторичной и третичной ультраструктуре области около рубчика, а также в форме микропили и размере рубчика. Эти различия могут служить новыми достоверными диагностическими микропризнаками при идентификации исследуемых видов. Применимость данных микропризнаков в области фитосанитарной диагностики обсуждается в работе.

Ключевые слова. Бобовые, сорные растения, семя, ультраструктура, СЭМ, фитосанитария.

ВВЕДЕНИЕ

Зерновая продукция, предназначенная для экспорта, должна быть качественной и безопасной, а также должна соответствовать фитосанитарным требованиям страны-импортера. Точная и быстрая идентификация семян сорных растений, которые обнаруживаются в экспортном зерне, является важной задачей современной герботологической экспертизы. В настоящее время испытательные лаборатории проводят видовую идентификацию сорной примеси с помощью метода световой микроскопии, используя морфологические макропризнаки семян и плодов. Вместе с тем при проведении диагностических исследований для уточнения микропризнаков, которые плохо различимы в световой микроскоп, все чаще возникает потребность в привлечении методов высокого разрешения, например сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Использование новых репрезентативных диагностических признаков, в частности структуры поверхности семян, играет большую роль в систематике и филогении растений, так как семенную кожуру (спермодерму, тесту) цветковых растений отличает большое разнообразие (Цингер, 1958). На сегодняшний день опубликовано немало работ, где при исследовании таксономически сложных групп семейства Fabaceae используют признаки ультраструктуры плодов и семян (Ворончихин, 1992; Ekici et al., 2005; Vural et al., 2008; Шеметова, 2014; Крамина, 2014 и др.). Поэтому использование метода СЭМ в поиске дополнительных стабильных микропризнаков на уровне ультраструктуры поверхности плодов и семян является необходимой задачей в разработке современных методов идентификации близких и морфологически схожих видов сорных растений.

Объектами нашего исследования являлись сорные растения семейства Бобовые – секироплодник пестрый *Securigera varia* (L.) Lassen (синоним *Coronilla varia* L.) и близкородственный вид вязель завитой *Coronilla scorpioides* (L.) W.D.J. Koch. Вид *Securigera varia* регулируется фитосанитарными требованиями

the expeditions in 2021–2022. During the research, there have been identified main differences in the second ultrasculpture of lateral seed surface, in primary, secondary and tertiary ultrasculpture near the hilum, as well as the micropyle shape and hilum size. These differences can serve as new trustworthy diagnostic microcharacters while identifying the studied species. Applicability of these microcharacters in phytosanitary diagnosis is discussed in this paper.

Key words. Fabaceae, weeds, seeds, ultrasculpture, SEM, phytosanitary.

INTRODUCTION

Grain products for export must be of high quality and safe, and must also comply with the phytosanitary requirements of the importing country. Accurate and fast identification of weed seeds that are detected in export grain is an important task of modern herbotological expertise. Currently, testing laboratories carry out species identification of weeds using the method of light microscopy by morphological microcharacters of seeds and fruits. At the same time, when conducting diagnostic studies to clarify microcharacters that are poorly distinguishable in a light microscope, there is an increasing need to involve high-resolution methods, such as scanning electron microscopy (SEM). The use of new representative diagnostic characters, in particular the structure of the seed surface, plays an important role in the taxonomy and phylogeny of plants, since the seed coat (spermoderm, testa) of flowering plants is very diverse (Zinger, 1958). At present, there have been published many works using characters of ultrasculpture of fruits and seeds in the study of taxonomically complex groups of the Fabaceae family (Voronchikhin, 1992; Ekici et al., 2005; Vural et al., 2008; Shemetova, 2014; Kramina, 2014, etc.). Therefore, the use of the SEM method in the search for additional stable microcharacters at the level of ultrasculpture of the surface of fruits and seeds is a necessary task in the development of modern methods for identifying close and morphologically similar species of weeds.

The objects of our research are Fabaceae weed plants – *Securigera varia* (L.) Lassen, synonymous to *Coronilla varia* L., and closely-related *Coronilla scorpioides* (L.) W.D.J. Koch. The species *Securigera varia* is regulated by phytosanitary requirements of some countries importing Russian grain products and technical crops. Egypt only, where *S. varia* is a quarantine pest, imports annually from Russia grain crops of about 6.5 million tons, on average. Today, *S. varia* is quite a topical object

ряда стран – импортеров российской продукции зерновых и технических культур. Только в Египет, где секироплодник пестрый является карантинным организмом, ежегодный экспорт зерновых с территории РФ в среднем составляет порядка 6,5 млн т. Сегодня *S. varia* является весьма актуальным объектом для проведения лабораторных исследований с необходимостью исследования образцов экспортируемой подкарантинной продукции от более чем 9,5 млн т грузов в год.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили зрелые семена *Securigera varia* (L.) Lassen и *Coronilla scorpioides* (L.) W.D.J. Koch, полученные из гербарных коллекций Главного ботанического сада имени Н.В. Цицина Российской академии наук (МНА), Ботанического института имени В.Л. Комарова Российской академии наук (ЛЕ), Гербария имени профессора Б.М. Козо-Полянского Воронежского государственного университета (VOR). Часть материалов для исследования была собрана авторами во время экспедиционных выездов по территории России (Краснодарский край, Воронежская, Липецкая, Тамбовская, Курская, Белгородская, Волгоградская области и др.) в вегетационные периоды 2021–2022 гг. Сведения об образцах семян, вовлеченных в настоящее исследование, представлены в табл. 1. Эти семена были использованы для оценки степени варьирования их линейных размеров в зависимости от разных абиотических факторов. Были измерены длина, ширина, толщина 20 семян из трех популяций каждого вида из разных географических точек.

Для изучения общей морфологии образцы семян фотографировали на стереомикроскопе Zeiss SteReo Discovery V20 с использованием фотоаппарата Canon EOS 5D MkIII. В дальнейшем снимки послойно комбинировались в программе Zerene Stacker. Изучение каждого вида проводили на выборке из 4–5 семян.

Сравнительный анализ ультраскульптуры поверхности выполняли и микроморфологию семян сорных растений изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа модели Hitachi TM4000Plus (СЭМ), Япония. Семена без предварительной пробоподготовки фиксировали на алюминиевые столики с помощью двухсторонней углеродной электропроводящей ленты. Изучение образцов проводили без нанесения токопроводящего покрытия в режиме низкого вакуума, при ускоряющем напряжении 5 или 10 кВ. Результирующие электронно-микроскопические изображения получены с помощью детекторов вторичных и отраженных электронов. Объем выборки семян каждого вида составлял 10–20 шт. Съёмки проводились при различных увеличениях: $\times 250$, $\times 500$ – для изучения микроморфологических признаков, $\times 1000$ – для изучения ультраскульптуры поверхности экзотесты. Для описания ультраскульптуры поверхности семян использовали подход W. Barthlott (1981).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Семена *S. varia* и *C. scorpioides* имеют сходное внешнее строение, что затрудняет их видовую идентификацию в продукции. Сравнение семян с помощью светового стереомикроскопа показало

if laboratory studies with the need to study samples of exported regulated products from more than 9.5 million tons of cargo per year.

MATERIALS AND METHODS

The material for this study was ripe seeds of *Securigera varia* (L.) Lassen and *Coronilla scorpioides* (L.) W.D.J. Koch, obtained from herbarium collection of N.V. Tsitsin Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences (MHA), V.L. Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences (LE), B.M. Kozo-Polyanisky Herbarium of Voronezh State University (VOR). Some of the studied materials were collected by the authors during their expeditions around Russia (Krasnodar Krai, Voronezh Oblast, Lipetsk Oblast, Tambov Oblast, Kursk Oblast, Belgorod Oblast, Volgograd Oblast, etc.) in the vegetation periods of 2021–2022. Data on seed samples involved in this research are presented in Table 1. These seeds were used to estimate the grade of variation in their line sizes depending in different abiotic factors. The length, width and thickness of 20 seeds were measured from three populations of each species from different geographic locations.

To study the general morphology, the seed samples were photographed on Zeiss SteReo Discovery V20 stereomicroscope using Canon EOS 5D MkIII camera. Later, the photos were layered using the software Zerene Stacker. Each species was studied by 4–5 seeds.

The comparative analysis of the surface ultrasculpture was performed, and weed seed micromorphology was studied with a scanning electron microscope Hitachi TM4000Plus (SEM), Japan. Without any previous sample preparation, the seeds were fixed on aluminum plates with double sided carbon conductive tape. The samples were studied without applying conductive coating on low vacuum mode, at accelerating voltage of 5 or 10 kV. The final electron microscopic images were obtained with the detectors of secondary and reflected electrons. The volume of samples of each species were 10–20 seeds. The photoshoots were carried out at different magnification: $\times 250$, $\times 500$ – to study micromorphological characters, $\times 1000$ – to study the exotesta surface ultrasculpture. To describe the ultrasculpture of seed surface, the W. Barthlott (1981) approach was used.

RESULTS AND DISCUSSION

S. varia and *C. scorpioides* seeds have a similar appearance, which makes it difficult to identify them in products. Comparing the seed with the light stereomicroscope showed the lack of trustworthy differences between them, the seeds are very similar morphologically (see Fig. 1). According to different authors (Dobrokhotov, 1961; Maysuryan, Atabekova, 1978; Brouwer, Shetlin, 2010) and our personal observations, the seeds of these species are characterized by a linear elongated or elongated cylindrical shape, rounded at both ends, and feeble longitudinal grooves on lateral surfaces. In the middle of the ventral side, in a small hollow, there is a round light hilum (see Fig. 1).

Studying linear cuts of the seeds showed that their length, width and thickness overlap and are

Табл. 1. Список образцов, использованных для карпологического анализа

№ п/п	Шифр	Вид	Русское название	Происхождение (этикетка)
1	VOR 0010598	<i>Securigera varia</i> (L.) Lassen (= <i>Coronilla varia</i> L.)	секиро- плодник пестрый	VOR. Гербарный образец: Тамбовская обл. , окр. г. Тамбова, у канавы, 10.08.1962, Ползикова. Местообитание/растительное сообщество сбора: у канавы. Координаты: 52° 43' 43.95" N, 41° 26' 12.2" E ± 7000 m
2	VOR 0010608	«тот же»	«то же»	VOR. Гербарный образец: Воронежская обл. , Ботсад ВГУ, дубрава, 13.07.1962, Грачева. Местообитание/растительное сообщество сбора: дубрава. Координаты: 51° 42' 40.57" N, 39° 12' 33.57" E ± 2000 m
3	б/н	«»	«»	Воронежская обл. , Петропавловский район, с. Замостье, по краю полев, 15.07.2022, сбор С.Н. Селявкина
4	VOR 0010623	«»	«»	VOR. Гербарный образец: Липецкая обл. , с. Яблоново. Место сбора образца: урочище Плющань. Группы образцов: основной фонд. Текст оригинальной этикетки: Плющань 4 в, 22.06.1948, Голицын. Координаты: 52° 49' 35.1" N, 38° 58' 11.06" E ± 2000 m
5	VOR 0010609	«»	«»	VOR. Гербарный образец: Луганская обл. , Кадиевский р-н, с-з «Ильича», в посеве ржи, август 1959 г., Розувайло. Местообитание/растительное сообщество сбора: в посеве ржи. Координаты: 48° 33' 27.15" N, 38° 38' 16.04" E ± 10 000 m. Создание записи: 15.01.2021, Анна Беденко
6	MHA 182 536	«»	«»	MHA. Гербарный образец: Тамбовская обл. , Мичуринский р-н, между селами Маноуицы и Дубки, по южному склону к дороге, 18.08.1966, В.В. Макаров
7	MHA 182 547	«»	«»	MHA. Гербарный образец: Оренбургская обл. , Губерлинские горы возле г. Новотроицка, 03.09.1984, Е.Е. Голина, И.Р. Волковская
8	MHA 182 568	«»	«»	MHA. Гербарный образец: Ростовская обл. , Сальский р-н, 10 км западнее с. Красный Маныч, Сладкая Балка, береговой склон, разнотравно-ковыльное сообщество, 30.09.2011, Степанова Н.
9	MHA 182 593	«»	«»	MHA. Гербарный образец: Саратовская обл. , Хвалынский р-н, окр. г. Хвалынска, меловые холмы, 19.07.1980., Е.Е. Голина, А.Е. Маценко, опр. В.Д. Бочкин, 26.06.2015
10	MHA 182 589	«»	«»	MHA. Гербарный образец: Волгоградская обл. , Фроловский р-н, между дер. Падок и леснич. Пильня, Арчединско-Донские пески, луга и березовые колки, 25.07.1993, И. Шанцер, М. Полонская, опр. В.Д. Бочкин
11	б/н	«»	«»	Краснодарский край , Темрюкский р-н, Таманское сельское поселение. Растительное сообщество на склоне рядом с обочиной автодороги. 23.06.2022. Орлова Ю.В.
12	б/н	«»	«»	Кабардино-Балкарская Республика , Эльбрусский р-н. Дорога вдоль реки Адыл (Адылсу) на правом берегу, 4,4 км юго-восточнее трассы А-158. Луговое сообщество. 12.07.2022. Кулаков В.Г., Кулакова Ю.Ю.
13	б/н	«»	«»	Воронежская обл. , окр. г. Борисоглебска, по краю полев. 07.07.2022, сбор Е.В. Разумовой
14	б/н	«»	«»	Воронежская обл. , Поворинский район, с. Октябрьское, обочина дороги, 03.07.2022, по краю полев, сбор Е.В. Разумовой
15	S-01628	<i>Coronilla scorpioides</i> (L.) W.D.J. Koch	вязель завитой	Л.Е. Гербарный образец: (Евр. сектор) № 336. Гербарий Спрыгина И.И., Республика Крым , г. Алушка. <i>Coronilla scorpioides</i> (L.) W.D.J. Koch
16	S-01629	«тот же»	«то же»	Л.Е. Гербарный образец: гербарий Дзевановского С.А. Республика Крым , Дзевановский С.А., 15.06.1920

отсутствие достоверных различий между ними, морфологически семена очень схожи (см. рис. 1). По данным разных авторов (Доброхотов, 1961; Майсурия, Атабекова, 1978; Броувер, Штелин, 2010) и нашим собственным наблюдениям, семена этих видов характеризуются линейной продолговатой или продолговато-цилиндрической формой, закругленной с обоих концов, и слабыми продольными желобками на боковых поверхностях. Посередине брюшной стороны, в маленьком углублении, расположен круглый светлый рубчик (см. рис. 1).

of 3–4.5 x 1–1.2 x 0.8–1 mm and 4–5 x 0.8–1.2 x 0.5–0.7 mm for *S. varia* and *C. scorpioides* respectively. Besides, the seed size variation depends abiotic factors, i. e., it has an adaptive character depending on ecological conditions of habitat. It is known that with insufficient humidity, low temperature and

Table 1. Samples list used for carpological analysis

Nº	Code	Species	Common name	Origin (label)
1	VOR 0010598	<i>Securigera varia</i> (L.) Lassen (= <i>Coronilla varia</i> L.)	crownvetch	VOR. Herbarium sample: Tambov Oblast , Tambov city district, by the gutter, 10.08.1962, Polzikova. Habitat/plant collection community: by the gutter. Coordinates: 52° 43' 43.95" N, 41° 26' 12.2" E ± 7000 m
2	VOR 0010608	the same	the same	VOR. Herbarium sample: Voronezh Oblast , Botanical Garden of Voronezh State University, oak wood, 13.07.1962, Gracheva. Habitat/plant collection community: oak wood. Coordinates: 51° 42' 40.57" N, 39° 12' 33.57" E ± 2000 m
3	without number	«»	«»	Voronezh Oblast , Petropavlovsky District, Zamostye, along the plantations, 15.07.2022, collected by S.N. Selyavkina
4	VOR 0010623	«»	«»	VOR. Herbarium sample: Lipetsk Oblast , Yablonovo. Place of sample collection: Plyushan natural boundary. Sample groups: main fund. Original label text: Plyushan 4 v, 22.06.1948, Golitsyn. Coordinated: 52° 49' 35.1" N, 38° 58' 11.06" E ± 2000 m
5	VOR 0010609	«»	«»	VOR. Herbarium sample: Lugansk Oblast , Kadievsky District, Ilyicha state farm, in rye plantations, August 1959, Rozuvailo. Habitat/plant collection community: in rye plantations. Coordinates: 48° 33' 27.15" N, 38° 38' 16.04" E ± 10 000 m. Date of register: 15.01.2021, Anna Bedenko
6	MHA 182 536	«»	«»	MHA. Herbarium sample: Tambov Oblast , Michurinsky District, between the villages Manovitsy and Dubki, along the southern slope towards the road, 18.08.1966, V.V. Makarov
7	MHA 182 547	«»	«»	MHA. Herbarium sample: Orenburg Oblast , Guberlinskiye mountains near Novotroitsk, 03.09.1984, E.E. Gogina, I.R. Volkovskaya
8	MHA 182 568	«»	«»	MHA. Herbarium sample: Rostov Oblast , Salsky District, 10 km to the west of Krasny Manych, Sladkaya Balka, bank slope, association of mixed grasses and stipa, 30.09.2011, N. Stepanova
9	MHA 182 593	«»	«»	MHA. Herbarium sample: Saratov Oblast , Khvalynsky District. Khvalynska, chalk hills, 19.07.1980., E.E. Gogina, A.E. Matsenko, identified by V.D. Bochkin, 26.06.2015
10	MHA 182 589	«»	«»	MHA. Herbarium sample: Volgograd Oblast , Frolovsky District, between Padok village and Pilnya forestry, Archedinsko-Donskiye sands, meadows and birch woods, 25.07.1993, I. Shantser, M. Polonskaya, identified by V.D. Bochkin
11	without number	«»	«»	Krasnodar Krai , Temryuksky District, Taman village. Plant community on the slope near the roadside. 23.06.2022. Orlova Yu.V.
12	without number	«»	«»	Kabardino-Balkarskaya Republic , Elbrussky District. Road along the river Adyl (Adylsu) on the right bank, 4.4 km to the south-east of A-158 highway. Meadow community. 12.07.2022. Kulakov V.G., Kulakova Yu.Yu.
13	without number	«»	«»	Voronezh Oblast , Borisoglebsk District, along the plantations. 07.07.2022, collected by E.V. Razumova
14	without number	«»	«»	Voronezh Oblast , Povorinsky District, Oktyabrskoye, roadside, 03.07.2022, along the plantations, collected by E.V. Razumova
15	S-01628	<i>Coronilla scorpioides</i> (L.) W.D.J. Koch	yellow crownvetch	LE. Herbarium sample: (Europ. sector) № 336. Herbarium of Sprygin I.I., Republic of Crimea , Alupka. <i>Coronilla scorpioides</i> (L.) W.D.J. Koch
16	S-01629	the same	the same	LE. Herbarium sample: herbarium of Dzevanovsky S.A., Republic of Crimea , Dzevanovsky S.A., 15.06.1920

Изучение линейных размеров семян показало, что значения длины, ширины, толщины перекрываются и равны 3–4,5 x 1–1,2 x 0,8–1 мм и 4–5 x 0,8–1,2 x 0,5–0,7 мм для *S. varia* и *C. scorpioides* соответственно. Кроме того, степень варьирования размера семян зависит от абиотических факторов, то есть имеет адаптивный характер в зависимости от экологических условий обитания. Известно, что в условиях недостатка влаги, пониженных температур и недостатка минерального питания семена мельче (Кузнецов, Дмитриева, 2005).

poor mineral consumption, the seeds are smaller (Kuznetsov, Dmitrieva, 2005).

The color of the seed surface of the studied species is mainly brown or red and brown (see Fig. 1). However, the detected colors of *S. varia* seed surface, probably, mean that the studied seed included those on different germination stages, and dark brown spots prove it (see Fig. 2).



Рис. 1. Внешний вид семян *Securigera varia* и *Coronilla scorpioides*: а – латеральная сторона; б – вентральная сторона; с – зона рубчика (фото авторов)

Fig. 1. Appearance of seeds *Securigera varia* and *Coronilla scorpioides*: а – laterally; б – ventrally; с – hilum area (photos by the authors)

Окраска поверхности семян изучаемых видов преимущественно коричневая или красно-коричневая (см. рис. 1). Однако, выявленные окраски поверхности семян *S. varia*, вероятно, свидетельствуют о том, что исследованные выборки включали семена, находящиеся на разных стадиях созревания, и наличие темно-коричневых пятен является тому доказательством (см. рис. 2).

Таким образом, использование только макропризнаков для выявления различий между семенами не позволяет провести их достоверную видовую идентификацию. Вместе с тем использование микропризнаков семян в практике фитосанитарной диагностики обычно затруднено из-за длительной пробоподготовки образцов и отсутствия необходимого оборудования высокого разрешения. Эти трудности легко преодолимы с помощью современного сканирующего электронного микроскопа Hitachi TM4000Plus, который позволяет быстро исследовать сухие непроводящие образцы в режиме низкого вакуума без дополнительной пробоподготовки и напыления металла.

Микроструктуры области рубчика

Для описания микроструктуры области рубчика *S. varia* и *C. scorpioides*, вслед за Т.Е. Краминой (2014), были использованы следующие признаки:

а) размер и форма рубчика (округлый, обратный, сердцевидный, широкосердцевидный, овальный, округло-сердцевидный, округло-обратный);

б) ширина ободкового ариллуса в процентах от диаметра внешнего края ободкового ариллуса рубчика (узкий – ширина менее 20% от диаметра рубчика; широкий – ширина 20% и более от диаметра рубчика);

в) форма микропиле (треугольное, узко-треугольное, широко-треугольное, вильчатое (Y-образное), треугольно-вильчатое).

Microstructures of the hilum area

To describe the microstructure hilum area of *S. varia* and *C. scorpioides*, according to T.E. Kramina (2014), the following characters were used:

- the size and shape of the hilum (round obovate, heart-shaped, wide-heart-shaped, oval, round-heart-shaped, round-obovate);

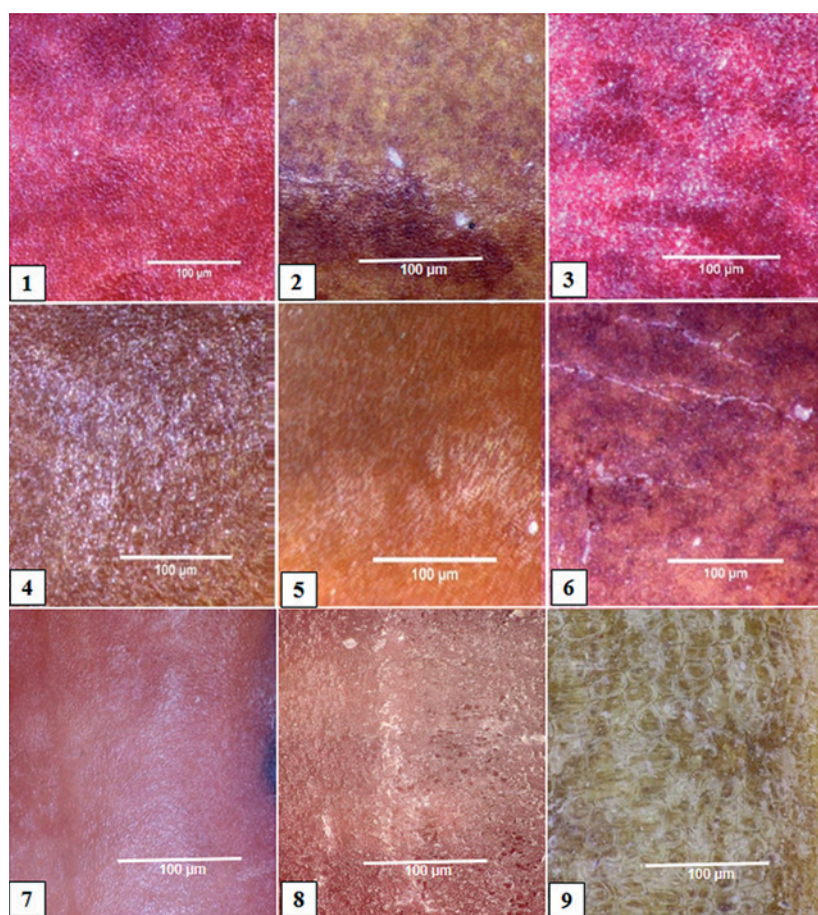


Рис. 2. Разнообразие поверхности семян *S. varia* (1–6) и *C. scorpioides* (7–9) (фото авторов)

Fig. 2. Different seed surfaces of *S. varia* (1–6) and *C. scorpioides* (7–9) (photos by the authors)

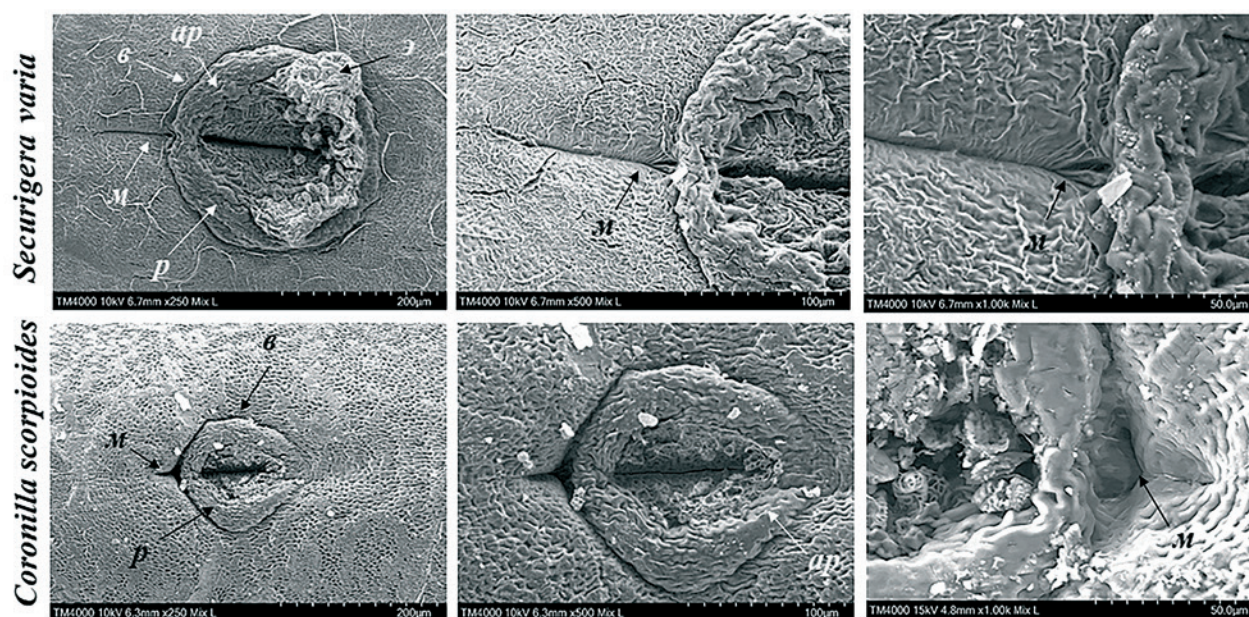


Рис. 3. Форма рубчика и микропиле семян *S. varia* и *C. scorpioides*: ар – ариллус; в – рубчиковый валик (ободок); м – микропиле; р – рубчик; э – эпихилум (фото авторов)

Fig. 3. The shape of the hilum and micropyle of seeds *S. varia* and *C. scorpioides*: “ap” – arillus; “b” – hilum wall; “m” – micropyle; “p” – hilum; “э” – epichilum (photos by the authors)

На рис. 3 показаны характерные микроструктуры семени изучаемых видов растений. Рубчик *S. varia* в очертании округлый, иногда овальный. Важной характеристикой рубчика являются его линейные размеры. У секироплодника рубчик крупный, а длина и ширина составляют 260,2 и 253,6 мкм соответственно. Ободковый ариллус широкий (25–27%), в области микропиле несколько суживается. Микропиле узкотреугольно-вильчатое. На поверхности рубчика имеется рыхлый, достаточно мощный наружный палисадный слой клеток, оставшихся от фуникулуса, – эпихилум (на рисунке представлен остаток, большая часть удалена). Кольцевое возвышение вокруг рубчика (рубчиковый валик) хорошо заметно.

Рубчик *C. scorpioides* округлый, иногда обратно-яйцевидный, с достаточно широким (25–28%) ободковым ариллусом (см. рис. 3). Рубчик более мелкий, длина и ширина составляют 155,4 и 129,7 мкм соответственно. Микропиле широкотреугольное. Поверхность рубчика также покрыта эпихилумом (на рис. 3 удален). Кольцевое возвышение вокруг рубчика также хорошо выражено. Следует отметить, что область тесты в рубчиковой зоне у обоих видов более темная, по сравнению с боковыми поверхностями семени, и имеет разнообразный рисунок (см. рис. 1с).

Ультраскульптура поверхности семени

Для описания ультраскульптуры поверхности семян использовали подход Бартлотта (Barthlott, 1981), основанный на выделении трех уровней ультраскульптуры:

- первичная скульптура, определяемая формой клеток экзотесты и степенью кривизны их наружной периклинальной стенки;
- вторичная скульптура – тонкий рельеф клеточных стенок, определяемый кутикулярными отложениями либо специфическими типами утолщений;
- третичная скульптура – эпикуткулярные выделения.

- the width of the arillus as a percentage of the diameter of the outer edge of the arillus of the hilum (narrow – the width is less than 20% of the hilum diameter; wide – the width is 20% or more of the hilum diameter);
- micropyle shape (triangular, narrow-triangular, wide-triangular, forked (Y-shaped), triangular-forked).

Fig. 3 shows typical seed microstructures of the studied plant species. The hilum of *S. varia* is rounded, sometimes oval. An important characteristic of the hilum is its linear dimensions. *S. varia* has a large hilum, and the length and width are 260.2 and 253.6 microns, respectively. Arillus is wide (25–27%), narrowing slightly in the micropyle area. The micropyle is narrowly triangular-forked. On the surface of the hilum there is a loose, rather powerful outer palisade layer of cells left from the funiculus, the epichilum (the figure shows the remainder, most of it has been removed). Ring-shaped prominence around the hilum (hilum wall) is clearly visible.

The hilum of *C. scorpioides* is rounded, sometimes obovate, with rather wide (25–28%) arillus (see Fig. 3). The hilum is smaller, length and width are 155.4 and 129.7 microns, respectively. The micropyle is wide triangular. The surface of the scar is also covered with epichilum (deleted in Fig. 3). Ring-shaped prominence around the hilum is also clearly visible. It should be noted that the testa area in the hilum area in both species is darker compared to the lateral surfaces of the seed and has a varied pattern (see Fig. 1c).

Seed surface ultrastructure

Barthlott's approach (Barthlott, 1981), based on three ultrastructure levels differentiation, was used to describe the seed surface ultrastructure:

- primary sculpture structure, defined by the shape of exotesta cells and the degree of curvature of their outer periclinal wall;

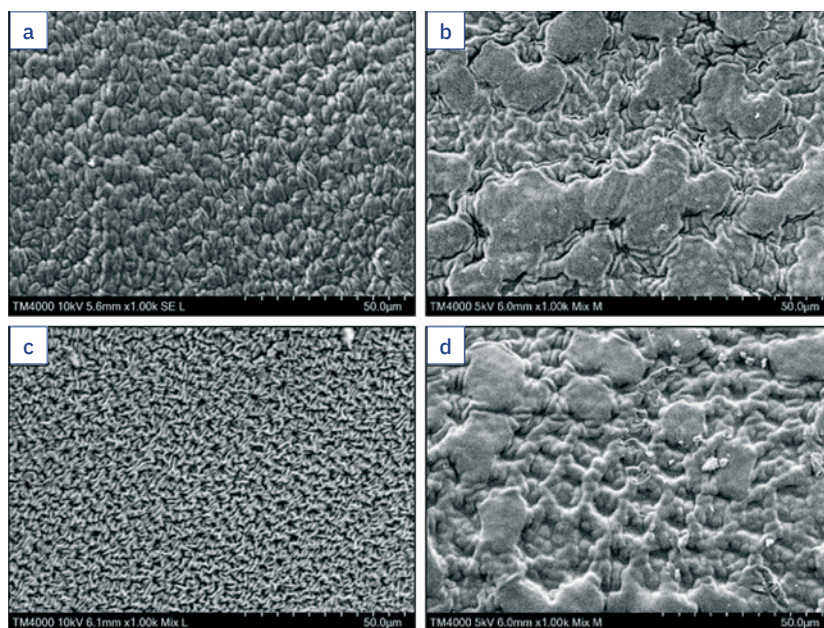


Рис. 4. Ультраскульптура поверхности семени на боковой стороне: а, с – *S. varia*; б, д – *C. scorpioides* (фото авторов)

Fig. 4. Ultrasculpture of the seed surface on the lateral side: а, с – *S. varia*; б, д – *C. scorpioides* (photos by the authors)

А. Ультраскульптура поверхности боковой стороны семени

***Securigera varia*.** Первичная скульптура семян *S. varia*, как и большинства представителей подсемейства Papilionoideae (Мотыльковые), бугорчато-ямчатая: поверхность тесты покрыта невысокими, более или менее усеченными на вершухе бугорками, каждый бугорок соответствует вершухе одной клетки экзотесты (см. рис. 4 а, с). Расстояния между отдельными бугорками неодинаковы, бугорки собраны группами (розетками) по 5–8, в центре розетки образуется ямка, более глубокая и широкая, чем углубление между соседними бугорками одной розетки. Вторичную скульптуру В.В. Ворончихин (1992) определяет как сетчато-струйчатую, формирующуюся за счет кутикулярных валиков, образующихся на месте стыка эпидермальных клеток. На наш взгляд, вторичная скульптура *S. varia* имеет более сложную организацию и может характеризоваться как радиально-складчато-сетчатая с явными элементами струистости или гребнистости. Складки направлены к центру розетки, а ячейки сетки соответствуют розеткам (см. рис. 4 а, с). Третичная скульптура не развита или представлена единичными незначительными фрагментами воска.

***Coronilla scorpioides*.** Экзотеста на поперечном срезе представлена удлиненными в радиальном направлении узкими тонкостенными клетками. Вершухи клеток экзотесты несколько сглажены. Первичная скульптура семян *C. scorpioides* бугорчато-ямчатая, где бугорок соответствует одной клетке экзотесты с ямкой в центре розетки (см. рис. 4 б, д). Вторичная скульптура поверхности семени радиально-складчато-сетчатая, складки направлены к центру розетки, а ячейки сетки соответствуют розеткам; вдоль границ соседних розеток образуются невысокие кутикулярные ребра, формирующие подобие невысокой сети с ячейками; каждая ячейка соответствует розетке, то есть группе клеток эпидермы. Третичная скульптура представлена фрагментарными наплывами воска,

- secondary sculpture – thin relief of cell walls, determined by cuticular deposits or specific types of thickenings;
- tertiary sculpture – epicuticular discharge.

А. Lateral seed surface ultrastructure

***Securigera varia*.** Primary seed sculpture of *S. varia*, like most representatives of the subfamily Papilionoideae, tuberculate-pitted: the surface of the testa is covered with low tubercles, more or less truncated at the apex, each tubercle corresponds to the apex of one cell of the exotesta (see Fig. 4 а, с). The distances between the individual tubercles are not the same, the tubercles are collected in groups (rosettes) of 5–8, a hole is formed in the center of the rosette, deeper and wider than the depression between adjacent tubercles of one rosette. Secondary sculpture by V.V. Voronchikhin (1992) defines it as reticulate-striate, formed due to cuticular ridges formed at the junction of epidermal cells. In our opinion, the

secondary sculpture of *S. varia* has a more complex organization and can be characterized as a radially folded-reticulate with obvious elements of striation or ridgeness. The folds are directed towards the center of the rosette, and the mesh cells correspond to the rosettes (see Fig. 4 а, с). Tertiary sculpture is not developed or is represented by single insignificant fragments of wax.

***Coronilla scorpioides*.** The exotesta on a transverse section is represented by narrow thin-walled cells elongated in the radial direction. The tops of the cells of the exotesta are somewhat smoothed. Primary seed sculpture of *C. scorpioides* is tuberculate-pitted, where the tubercle corresponds to one exotesta cell with a hole in the center of the rosette (see Fig. 4 б, д). The secondary sculpture of the seed surface is radially folded-reticulate, the folds are directed towards the center of the rosette, and the mesh cells correspond to the rosettes; along the borders of neighboring rosettes, low cuticular ribs are developed, forming a kind of low network with cells; each cell corresponds to a rosette, that is, a group of epidermal cells. The tertiary sculpture is represented by fragmentary influxes of wax, randomly scattered and covering a different number of rosettes, due to which the tuberosity of the spermoderm is formed (see Fig. 4 б, д).

В. Ultrasculpture of the seed surface in the area around the hilum

***Securigera varia*.** The primary ultrasculpture on the ridge around the hilum is rather deeply pitted, while the secondary ultrasculpture is pronounced radially folded with a transition to reticulate sculpture (mesh cells correspond to rosettes of exotesta cells). The micropyle area is characterized by a weak development of radial cuticle folds with a partial transition to an irregularly folded type (see Fig. 5а). Tertiary sculpture is practically not expressed.

хаотично разбросанными и покрывающими различное число розеток, благодаря чему и создается бугристость спермодермы (см. рис. 4 b, d).

Б. Ультраскульптура поверхности семени в области вокруг рубчика

***Securigera varia*.** Первичная ультраскульптура на валике вокруг рубчика довольно глубокоямчатая, а вторичная – выраженная радиально-складчатая с переходом к сетчатой скульптуре (ячейки сетки соответствуют розеткам клеток экзотесты). В области микропиле характерно слабое развитие радиальных складок кутикулы с частичным переходом к неправильно-складчатому типу (см. рис. 5a). Третичная скульптура практически не выражена.

***Coronilla scorpioides*.** Первичная ультраскульптура на валике вокруг рубчика щелевая, слегка сглаженная: промежутки в центре розетки и между ее клетками узкие, верхушки клеток экзотесты несколько сглажены, за счет чего рельефность в розетках выражена слабо, местами наблюдается переход к бугорчато-ямчатой скульптуре (см. рис. 5b).

Вторичная скульптура поверхности радиально-складчатая, несколько сглаженная, образуется за счет отложения кутикулы в виде радиальных складок и морщин. В отдельных местах, не закрытых наплывами воска, наблюдается переход к радиально-неправильно-складчатой скульптуре. Третичная скульптура присутствует в виде слабых наплывов воска, прикрывающих меньшее число розеток, чем на боковой поверхности (см. рис. 5b).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наиболее полное и точное представление о строении семени можно получить только при комплексном его изучении. Сканирующая электронная микроскопия расширяет возможности при идентификации близкородственных, морфологически схожих и трудноразличимых видов, в частности семейства Бобовые. Так, на основе изучения с помощью СЭМ семенной кожуры близкородственных сорных видов *S. varia* и *C. scorpioides* нам удалось выявить новые дополнительные признаки, на основании которых более четко и достоверно могут

***Coronilla scorpioides*.** The primary ultrasculpture on the ridge around the scar is slit, slightly smoothed: the gaps in the center of the rosette and between its cells are narrow, the tops of the cells of the exotesta are somewhat smoothed, due to which the relief in the rosettes is weakly expressed, in some places there is a transition to tuberculate-pitted sculpture (see Fig. 5b).

The secondary sculpture of the surface is radially folded, somewhat smoothed, formed due to the deposition of the cuticle in the form of radial folds and wrinkles. In some places, not covered by wax influxes, there is a transition to a radially irregularly folded sculpture. Tertiary sculpture is present in the form of weak wax deposits covering a smaller number of rosettes than on the side surface (see Fig. 5b).

CONCLUSION

The most comprehensive and precise knowledge about the seed structure can be obtained by its complex study. Scanning electron microscopy gives more possibilities to identify closely-related morphologically similar and easily-confused species, in particular, of Fabaceae family. Thus, based on SEM study of the seed skin of the closely-related weed species *S. varia* and *C. scorpioides*, we managed to identify additional characters which could serve as a base to a more precise and trustworthy characterization of the species differences (see Table 2).

Key differences in the third spermoderm sculpture of the lateral seed surface, which include *C. scorpioides* having fragmented sporadically dispersed wax pieces, with *S. varia* having none of them (see Fig. 4), are a considerable diagnostic character for their identification. This structure peculiarity can be sufficient for the seed diagnosis of the stated species with SEM in the conditions of the test laboratory. Considering this, additional SEM equipment for test laboratories is of great importance, as it helps to considerably facilitate the procedure of pest identification.

REFERENCES

1. Brouver V., Shtelin A. Handbook of seed science of agricultural, forestry and ornamental crops



Рис. 5. Ультраскульптура области рубчика: а – *S. varia*; б – *C. scorpioides* (фото авторов)

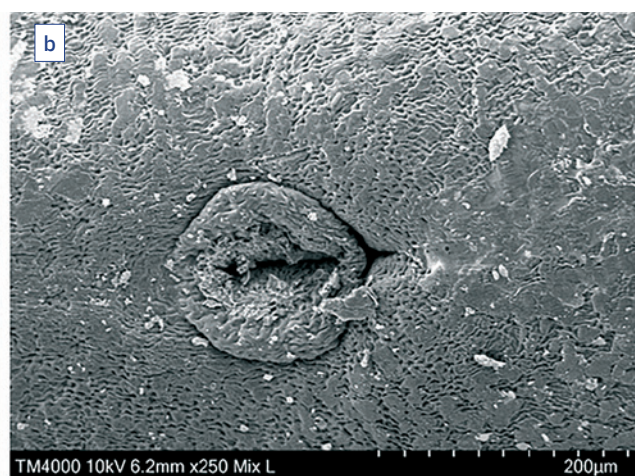


Fig. 5. Hilum area ultrasculpture: а – *S. varia*; б – *C. scorpioides* (photos by the authors)

Табл. 2. Диагностические признаки спермодермы *S. varia* и *C. scorpioides*

Виды	Ультраскульптура боковой поверхности семени	Ультраскульптура области около рубчика	Ультраструктура области рубчика	
			Форма рубчика	Микропиле
<i>Securigera varia</i>	Первичная		округлый, овальный	узко-треугольно-вильчатое
	бугорчато-ямчатая	глубокоямчатая		
	Вторичная			
	радиально-складчато-сетчатая с явными элементами струистости или гребнистости	радиально-складчатая с переходом к сетчатой скульптуре		
	Третичная			
	практически не выражена	практически не выражена		
<i>Coronilla scorpioides</i>	Первичная		округлый, обратнотройцевидный	широко-треугольно-вильчатое
	бугорчато-ямчатая	щелевая, слегка сглаженная		
	Вторичная			
	радиально-складчато-сетчатая	радиально-складчатая, несколько сглаженная		
	Третичная			
	наплывы воска, прикрывающие различное число розеток	слабые наплывы воска, прикрывающие меньшее число розеток		

быть охарактеризованы межвидовые различия (см. табл. 2).

Существенные различия в третичной скульптуре спермодермы боковой поверхности семени, заключающиеся в наличии у *C. scorpioides* фрагментарных, хаотично разбросанных наплывов воска, отсутствующих у *S. varia* (см. рис. 4), являются значимым диагностическим признаком при их идентификации. Данной особенности строения может быть вполне достаточно для диагностики семян указанных видов с помощью СЭМ в условиях испытательной лаборатории. В связи с этим дополнительное оснащение испытательных лабораторий сканирующим электронным микроскопом является весьма актуальным, так как позволяет значительно упростить процедуру идентификации вредных организмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Броувер В., Штелин А. Справочник по семеноведению сельскохозяйственных, лесных и декоративных культур с ключом для определения важнейших семян. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2010, 694 с.
2. Ворончихин В.В. Сравнительная анатомия и ультраструктура семян представителей некоторых родов семейства Leguminosae Juss.: автореф. дис. ... канд. биол. наук. 03.00.05 / В.В. Ворончихин. М., 1992, 23 с.
3. Доброхотов В.Н. Семена сорных растений. М.: Сельхозиздат, 1961, 464 с.

Table 2. Spermoderm diagnostic characters of *S. varia* and *C. scorpioides*

Species	Ultrasculpture of the lateral surface of the seed	Ultrasculpture of the area near the hilum	Hilum area ultrastructure	
			Hilum shape	Micro-pyle
<i>Securigera varia</i>	Primary		round, oval	narrow triangular forked
	tuberculate-pitted	deep-pitted		
	Secondary			
	radially folded-reticulate with obvious elements of striation or ridge	radially folded with a transition to mesh sculpture		
<i>Coronilla scorpioides</i>	Tertiary		rounded, obovate	wide-triangular-forked
	practically not expressed	practically not expressed		
	Primary			
	tuberculate-pitted	slit, slightly smoothed		
<i>Coronilla scorpioides</i>	Secondary		rounded, obovate	wide-triangular-forked
	radially folded mesh	radially folded, somewhat smoothed		
	Tertiary			
	influxes of wax covering a different number of rosettes	weak streaks of wax covering a smaller number of rosettes		

with a key to identify the most important seeds [Spravochnik po semenovedeniyu selskokhozyaystvennykh, lesnykh i dekorativnykh kultur s klyuchom dlya opredeleniya vazhneyshikh semyan]. M.: Partnership scientific. ed. KMK, 2010, 694 p. (In Russ.)

2. Voronchikhin V.V. Comparative anatomy and ultrastructure of seeds of representatives of some genera of the family Leguminosae Juss. [Sravnitelnaya anatomiya i ultrastruktura semyan predstaviteley nekotorykh rodov semeystva Leguminosae Juss] dis. ... cand. biol. sciences. 03.00.05 / V.V. Voronchikhin. M., 1992, 23 p. (In Russ.)

3. Dobrokhoto V.N. Weed seeds [Semena sornykh rasteniy]. Moscow: Selkhozizdat, 1961, 464 p. (In Russ.)

4. Kramina T.E. Ultrasculpture and spermoderm ultrastructure of the representatives of the genera *Lotus*, *Kebirita* and *Antoppetitia* (Leguminosae – Loteae) in a systematic and ecological-geographical context [Ultrasculptura i ultrastruktura spermodermy predstaviteley rodov *Lotus*, *Kebirita* i *Antoppetitia* (Leguminosae – Loteae) v sistematicheskom i ekologo-geograficheskom kontekste] // Memorial Kadensky collection / L.I. Lotova, A.K. Timonin. M., 2014; 129–157. (In Russ.)

4. Крамина Т.Е. Ультраскульптура и ультра-структура спермодермы представителей родов *Lotus*, *Kebirita* и *Antoppetitia* (Leguminosae – Loteae) в систематическом и эколого-географическом контексте // Мемориальный каденский сборник / Л.И. Лотова, А.К. Тимонин. М., 2014. С. 129–157.

5. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений: учебник для вузов. М.: Высшая школа, 2005, 736 с.

6. Майсурян Н.А., Атабекова А.И. Определитель семян и плодов сорных растений. М.: Колос, 1978, 288 с.

7. Цингер Н.В. Семя, его развитие и физиологические свойства. М.: Изд-во АН СССР, 1958, 285 с.

8. Шеметова Т.А. Ультраскульптура поверхности семян некоторых видов секции *Xiphidium* Bunge рода *Astragalus* L. (Fabaceae) // Turczaninowia. 2014. Т. 17. № 4. С. 154–164.

9. Barthlott W. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspect // Nord. J. Bot. 1981. 1 (3): 345–355.

10. Ekici M., Yüzbaşıoğlu D., Aytaç Z. Morphology, pollen, seed structure and karyological study on *Astragalus ovalis* Boiss. and Balansa (sect. *Ammodendron*) in Turkey // International Journal of Botany. 2005. 1 (1): 74–78.

11. Vural C., Ekici M., Akan H., Aytaç Z. Seed morphology and its systematic implications for genus *Astragalus* L. sections *Onobrychoidei* DC., *Uliginosi* Gray and *Ornithopodium* Bunge (Fabaceae) // Plant. Syst. Evol. 2008. 274 (3–4): 255–263.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Разумова Елена Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, начальник научно-методического отдела Воронежского филиала ФГБУ «ВНИИКР», г. Воронеж, Россия; ORCID 0000-0003-2485-6439, ERazumova18@mail.ru.

Орлова Юлия Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-методического отдела инвазивных видов растений ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0002-3330-6976, e-mail: orl-jul@mail.ru.

Кулакова Юлиана Юрьевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник – начальник научно-методического отдела инвазивных видов растений ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0002-9973-7584; e-mail: thymus73@mail.ru.

5. Kuznetsov V.V., Dmitrieva G.A. Plant Physiology: textbook for universities [Fiziologiya rasteniy: ucheb-nik dlya vuzov]. M.: Vysshaya shkola, 2005, 736 p. (In Russ.)

6. Maysuryan N.A., Atabekova A.I. Identification key to weed seeds and fruits [Opredelitel semyan i plodov sornykh rasteniy]. Moscow: Kolos, 1978, 288 p. (In Russ.)

7. Tsinger N.V. Seed, its development and physiological properties [Semya, yego razvitiye i fiziologicheskiye svoystva]. M.: Publishing House of the Academy of Sciences of the USSR, 1958, 285 p. (In Russ.)

8. Shemetova T.A. Surface ultrasculpture of seeds of some species of the section *Xiphidium* Bunge of the genus *Astragalus* L. (Fabaceae) [Ultraskulptura poverkhnosti semyan nekotorykh vidov sektsii *Xiphidium* Bunge roda *Astragalus* L. (Fabaceae)] // Turczaninowia. 2014; 17: 4: 154–164. (In Russ.)

9. Barthlott W. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspect // Nord. J. Bot. 1981. 1 (3): 345–355.

10. Ekici M., Yüzbaşıoğlu D., Aytaç Z. Morphology, pollen, seed structure and karyological study on *Astragalus ovalis* Boiss. and Balansa (sect. *Ammodendron*) in Turkey // International Journal of Botany. 2005. 1 (1): 74–78.

11. Vural C., Ekici M., Akan H., Aytaç Z. Seed morphology and its systematic implications for genus *Astragalus* L. sections *Onobrychoidei* DC., *Uliginosi* Gray and *Ornithopodium* Bunge (Fabaceae) // Plant. Syst. Evol. 2008. 274 (3–4): 255–263.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Elena Razumova, PhD in Biology, Senior Researcher, Head of Research and Methodology Department, Voronezh Branch of FGBU “VNIKR”, Voronezh, Russia; ORCID 0000-0003-2485-6439, ERazumova18@mail.ru.

Yulia Orlova, PhD in Biology, Senior Researcher, Research and Methodology Department of Invasive Plant Species, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0002-3330-6976, e-mail: orl-jul@mail.ru.

Yuliana Kulakova, PhD in Biology, Leading Researcher, Head of Research and Methodology Department of Invasive Plant Species, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0002-9973-7584; e-mail: thymus73@mail.ru.