



ИЗСЛЕДВАНЕ ВЪРХУ ПОКЪЛВАНЕТО НА БАБИНИ ЗЪБИ (TRIBULUS TERRESTRIS L.)

АННА НИКОЛОВА

STUDY ON PUNCTURE VINE (TRIBULUS TERRESTRIS L.) GERMINATION REQUIREMENTS

ANNA NIKOLOVA

Abstract

Tribulus terrestris is a valuable medicinal plant. The plant's high and steady demand for the needs of the pharmaceutical industry has fostered the need for its cultivation. One of the major problems in puncture vine cultivation is its low rate of germination. Studies on seed viability, burrs' anatomical structure and seed germination requirements were conducted in laboratory and field experiments. The test for imbibition of water and the study of burrs anatomical structure showed that despite the fact that the burr walls are very hard and woody, they do not cause mechanical dormancy. The burr's pericarp does not have continuous layers of sclereids to make it impermeable to water. Field experiments showed that the *Tribulus terrestris* germinated and emerged after a series of heavy rains which provided 25-72 mm (minimum 25 mm) of precipitation, soil temperatures of 24-26°C and maximum daily air temperatures of 25-31°C. Even though for the region of Plovdiv the plants' soil and air temperature requirements were met as early as the end of May, the germination did not occur until the necessary soil moisture conditions were met – beginning of July in 2009 and middle of June 2010 respectively.

Key words: puncture vine, germination, water imbibition, burrs structure, seed viability

ВЪВЕДЕНИЕ

Екстракти от надземната част на *Tribulus terrestris* влизат в състава на редица лекарствени препарати и хранителни добавки за натрупване на мускулна маса и увеличаване на либидото и физическата издръжливост (Kostova and Dinchev, 2005; Tomova et al, 1978). Осигуряването на необходимите количества от бабини зъби с нужния химичен състав за нуждите на фармацевтичната промишленост налага въвеждането на вида в култура или полукултура. Един от главните проблеми за разрешаване при

разработването на технология на отглеждане на бабините зъби е преодоляването на неравномерната и ниска кълняемост на семената.

Tribulus terrestris е размножаващо се със семена растение, развиващо се като плевел основно в райони с горещо лято, сухи почви и годишни валежи в границите на 28 – 38 cm (Rice 2002; Holm et al. 1991). Плодовете му са шизокарпи разпадащи се на пет бодливи, много твърди, не отварящи се плодни дяла (орехчета), всеки съдържащ 2-5 семена. Според Squires (1979) веднага след съзряване на плодовете, повечето от семената навлизат в период на покой, продължаващ през есента и зимните месеци (приблизително 6-12 месеца). Заровените в почвата семена запазват жизнеността си до 4-5 години. Семената на бабините зъби покълват неравномерно, независимо дали опитите са проведени със семена извадени от плодните дялове или за засяване са ползвани целите орехчета, като процентите на покълване не са високи - 67 и 37% съответно (Ernst and Tolsma, 1988)

Литературните данни за биологията и екологичните изисквания на растението с които разполагаме се отнасят основно за условията на Австралия и САЩ. В Австралия покълването на бабините зъби започва когато максималните дневни температури на въздуха достигнат 24-27°C (Squires, 1979), а средните почвени температури - 20°C (Boydston, 1990). Първите масови пониквания обикновено настъпват на вълни след серия от обилни валежи. Минималните количества валежи осигуряващи поникване трябва да надвишават 10 mm (Ernst and Tolsma, 1988).

За изясняване на причините за ниската кълняемост на семената на бабините зъби са необходими проучвания, включващи определяне на екологичните фактори контролиращи покълването, влиянието на морфологичните и анатомичните особености на плодните дялове върху процеса, както и взаимодействието между посочените фактори от момента на съзряване на семената до покълването им. Целта на проведените изследвания беше да изяснят екологичните и биологични фактори, които контролират покълването на семената на бабините зъби.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

За изясняване проблемите при покълването на семената на бабините зъби бяха заложи лабораторни и полски опити. В експериментите използвахме плодни дялове събрани в пълна зрелост от естествени находища в района на Пазарджик през лятото на 2008 година и съхранявани при складови условия. Изпитвахме кълняемостта на не накиснати и предварително накиснати във вода плодни дялове. С накисването на орехчетата във вода целяхме отстраняване на евентуални инхибиращи покълването вещества от перикарпа (Nikolaeva, 1969). Всички опити бяха залагани в три повторения, всяко повторение от по 50 орехчета.

При лабораторните опити използвахме стъклени петриеве блюда със субстрат филтърна хартия и пясък. С цел осигуряване на еднакъв контакт със субстрата орехчетата бяха разполагани равномерно и ориентирани по един и

същи начин – с двата големи шипа нагоре в субстрат пясък и странично върху филтърната хартия. Лабораторните опити бяха изведени в термостат при постоянна температура от 35°C и осигуряване на достъп на светлина и периодично проветряване. В петритата със субстрат пясък, орехчетата бяха разположени повърхностно или покрити с 0.2-0.3 mm пясък.

Полският опит бе заложен на 18.06.2009 като плодните дялове бяха засети на дълбочина 0.5 cm. След засяването вариантите бяха полети обилно.

За определяне на жизнеността на семената орехчетата бяха разрязани напречно на равни половинки и половината от плодните дялове бяха третирани с 0.1% разтвор от 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC), останалата половина – с 0.05% индигокармин. Резултатите бяха отчетени след два часа.

За определяне на пропускливостта на околоплодника бе направен тест за поглъщане на вода. За целта сухите орехчета се изтеглят и се поставят в петрита върху навлажнена филтърна хартия при стайна температура. След това на всеки час, за период от 8 часа орехчетата се претеглят. Липсата на промяна в теглото показва, че перикарпът им не е пропусклив за вода (Bansal et al., 1980).

За микроскопските анализи използвахме новообразувани зелени плодни дялове, които бяха фиксирани в FAA за 24 часа и съхранени в 70% етилов алкохол. Изготвени бяха трайни парафинови препарати, като пререзите бяха оцветени със сафранин и анилин (aniline blue). Наблюденията и снимките на препаратите са направени с дигитален светлинен микроскоп Motic DMBA210. Статистическите анализи на данните бяха извършени със статистически пакет SPSS.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Жизненост на семената

Жизнеността на семената е от решаващо значение, както за оцеляването и разпространението на видовете в природата, така и за определянето на необходимата сеитбена норма при въвеждането им в култура. Използваните от нас тестове за жизненост с TTC и индигокармин са приложими за определяне на жизнеността на семената, независимо дали се намират в покой или не. Живите зародиши отделят H⁺ йони при дишане, които взаимодействат с TTC и променят цвета му в розов или червен и съответно живите тъкани се оцветяват в розово или червено. Тестването с индигокармин се налага за да потвърди резултатите от TTC теста, защото съществува възможност H⁺ да се отделят от не ензимни процеси от мъртви тъкани. Индигокарминът оцветява мъртвите тъкани в синьо, но се променя до безцветна субстанция в живите.

Резултатите от теста с TTC показаха 82% жизненост на семената, и бяха потвърдени от теста с индигокармин. Високият потенциал за формиране на семена при бабините зъби съчетан с висока жизненост и несинхронно

покълване гарантират стабилност на вида и го правят много конкурентен и устойчив на неблагоприятни екологични условия.

2. Поглъщане на вода

С оглед на това, че орехчетата на бабините зъби са изключително твърди беше необходимо да се потвърди или отхвърли наличието на механичен покой при семената. Механичният покой се дължи на присъствието на непрекъснати слоеве от склереиди в перикарпа на плода, които действат като механично препятствие за поглъщане на вода (Nikolaeva, 1969). Фактът, че перикарпът на плодовете е твърд не означава задължително, че е непроницаем за вода. Резултатите от изследването показват, че поглъщането на вода от плодните дялове започва от самото начало на теста и е най-интензивно през първите три часа на опита, след което погълнатите количества вода значително намаляват (Таблица 1).

Таблица 1.

Поглъщане на вода от плодните дялове на *Tribulus terrestris*

Време h	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Средно тегло на пл. дялове g	10.12	12.98	14.58*	15.68	16.47	16.87*	17.33*	17.53*	17.83*
Погълната вода g	0	2.86	1.6	1.1	0.79	0.4	0.46	0.2	0.3
Погълната вода на всеки час %	0	37.09	20.75	14.26	10.24	5.18	5.97	2.6	3.9

Стойностите обозначени с (*) са статистически доказани при $P \leq 0.05$

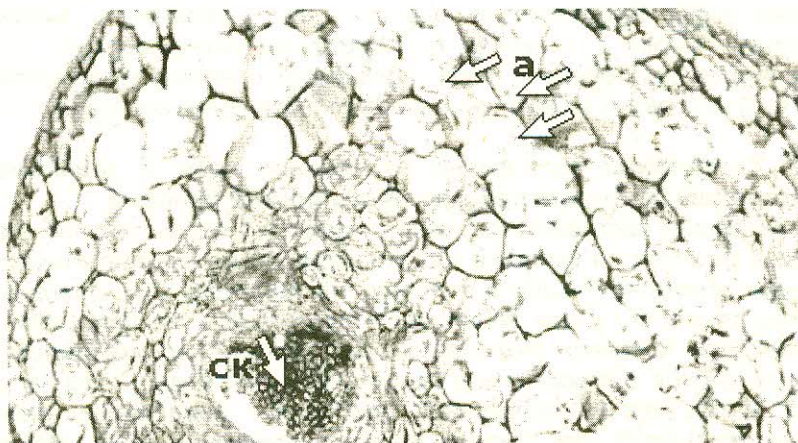
На практика за първите три часа орехчетата поглъщат 72% от водата погълната през целия експеримент, като най-много вода - 37% се поема през първия час (Фиг. 1). Плодните дялове поглъщат значително количество вода и за осем часа увеличават теглото си със 76%. След третия час на опита настъпваше ослизяване на орехчетата. В растенията слизестите вещества обикновено или са форма на запасяване на въглехидрати или се образуват с цел поглъщане и задържане на вода (Clifford et al., 2002). Данните убедително сочат, че изключително твърдият перикарп на орехчетата изобщо не ограничава поглъщането на вода и по този начин не се явява лимитиращ за покълването фактор. Това изключва наличието на механичен покой при бабините зъби с което отпада и необходимостта в евентуално производство да се прилага скарификация на посевния материал.



Фигура 1. Поглъщане на вода от плодни дялове на *Tribulus terrestris*

3. Проучвания на анатомичния строеж на перикарпа

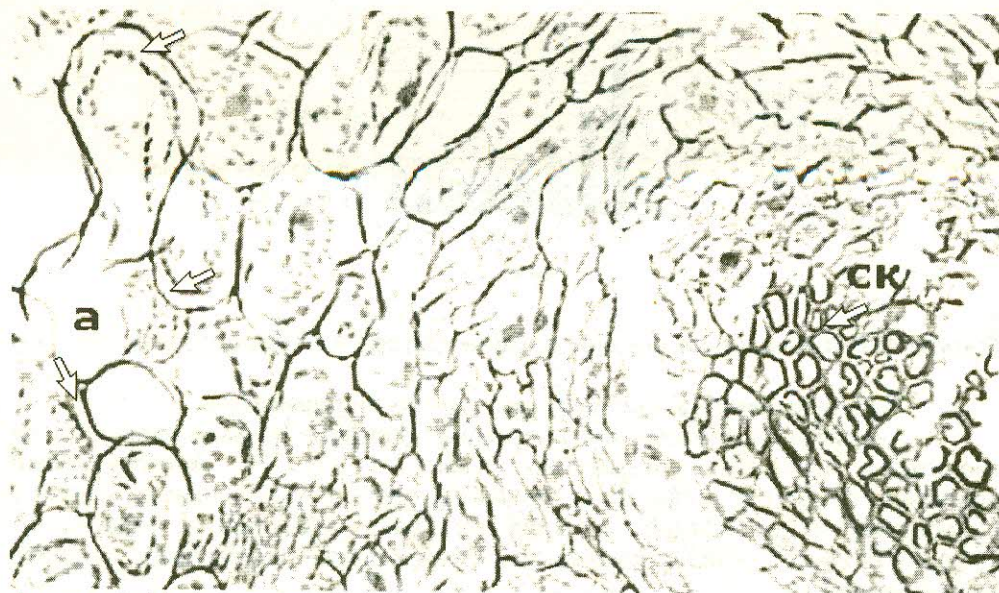
Анализът на анатомичния строеж на перикарпа показва наличието на значителни количества механични тъкани в тях. На микроскопските препарати се виждат добре диференцирани групи от склеренхимни клетки с наддебелени и лигнифицирани клетъчни стени оцветени в червено от сафранина (Фиг.2). Това са склеренхимните тъкани които изграждат бодлите на орехчетата.



Фигура 2. Напречен пререз на перикарп на плоден дял на *Tribulus terrestris*, увеличение X100. Препаратът е оцветен със сафранин и анилин. (СК) склеренхимни клетки с оцветени със сафранин лигнифицирани клетъчни стени. (а) клетки с наддебелени клетъчни стени. Със стрелки са посочени наддебелените им клетъчни стени.

Останалите клетки на плодната стена макар и все още живи, вече имат значително наддебелени нелигнифицирани клетъчни стени. В перикарпа

обаче не се наблюдават обособени, непрекъснати слоеве от склереиди, които да възпрепятстват поглъщането на вода и да обусловят механичен покой при бабините зъби.



Фигура 3. Напречен пререз на перикарп на плоден дял от *Tribulus terrestris*, увеличение X400. Пререзите са оцветени със сафранин и анилин. (СК) склеренхимни клетки с оцветени със сафранин лигнифицирани клетъчни стени. (а) клетки с наддебелени нелигнифицирани клетъчни стени изграждащи перикарпа. Със стрелки са посочени наддебелените клетъчни стени

4. Кълняемост на семена от бабини зъби в зависимост от различни фактори в лабораторни и полски условия

Лабораторните тестове за кълняемост показаха, че филтърната хартия е неподходящ субстрат за тестване на кълняемостта на семената на бабините зъби, а на кисването на плодните дялове и при полските и при лабораторните опити даде драстично ниски резултати в сравнение с не киснатите. При всички варианти заложи на върху филтърна хартия плодните дялове много бързо мухлясваха и даваха нулево поникване – до 3-4 часа след залагането на опита орехчетата се ослизяха, постепенно придобиваха неприятна миризма и до третия ден биваха напълно покрити с гъби. Причина за мухлясането на орехчетата по всяка вероятност се дължи на ослизването на плодните дялове. Както е известно слизестите вещества са полизахариди по природа и като такива са добър субстрат за развитието на гъби.

Използването на пясък като субстрат даде добри резултати при разполагане на плодните дялове повърхностно. В този вариант получихме 32% покълване на семената. Очевидно пясъкът задържа достатъчно количество вода и поема и разрежда евентуални отделени от перикарпа

инхибиращи покълването вещества. В тестовите в които плодните дялове бяха покрити с 0.3-0.5 mm пясък процента на покълналите семена беше много нисък, в границите на 1-2%. Вероятно при покритите орехчета или се нарушава достъпа на кислород или интензитета на светлината е недостатъчен. Тези резултати потвърждават данните на Pathak (1970) който съобщава, че покълването на *Tribulus terrestris* се подтиска от ниски температури, нисък интензитет на светлина и преовлажнени почви.

При полския опит след паднали валежи от 25 mm и средни максимални дневни температури за периода от 28°C две седмици след залагането му имахме 25% поникване при варианта с не наакиснатите орехчета и 5% - при наакиснатите. Обилният дъжд на 02.07.2009 от 26 mm предизвика допълнително поникване на нови растения и в края на третата седмица отчетохме 51% поникване при варианта с не наакиснатите орехчета и 22% при този с наакиснатите. Сумарно периода предшествващ поникването (18.06-05.07.2009) се характеризираше със максимални дневни температури от 28-31°C, средни температури на повърхността на почвата от 24-26°C и валежи от 51 mm. През 2010 масовото поникване на бабините зъби настъпи в средата на юни и бе предшествано от максимални дневни температури от 25-31°C, средни температури на повърхността на почвата от 22-25°C и валежи от 47 mm.

ИЗВОДИ

Орехчетете на бабините зъби поглъщат 72% от общото количество погълната вода за първите три часа на експеримента, като най-много вода - 37% е погълната през първия час. Микроскопският анализ на анатомичният строеж на плодната стена показва, че независимо от наличието на висок процент механични тъкани, в перикарпа не се наблюдават обособени, непрекъснати слоеве от склереиди, които да възпрепятстват поглъщането на вода и да обусловят механичен покой на семената. Резултатите от двата теста изключват наличието на механичен покой на семената на *Tribulus terrestris* с което отпада и необходимостта в евентуално производство да се прилага скарификация на посевния материал.

При тестовите в лабораторни условия най-висок процент кълняемост от 32% получихме върху субстрат пясък, при повърхностно разполагане на орехчетата в термостат при постоянна температура от 35°C, с осигуряване на достъп на светлина и периодично проветряване. Предварителното наакисване на плодните дялове силно намалява процента на покълване на семената както в лабораторни така и в полски условия.

Най-висок процент на поникване от 51% бе получен при полския опит заложен с не наакиснати във вода плодни дялове. Поникването беше предшествано от максимални дневни температури в границите на 25-31°C, средни температури на повърхността на почвата от 24-26°C и обилни валежи от 51 mm. Независимо че за района на Пловдив необходимите температурни условия за поникване на бабините зъби бяха налице още от края на май, масови пониквания настъпиха едва след като изискванията на растението за

влага бяха покрити – в началото на юли през 2009 г. и средата на юни през 2010 година.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bansal, R.P., P.R.Bhati, D.N.Sen., 1980. Different specificity in water imbibition of Indian zone seeds. *Biol. Plant.* 22, 327-331
2. Boydston, R.A., 1990. Time of emergence and seed production of Longspine sandbur (*Cenchrus longispinus*) and Puncturevine (*Tribulus terrestris*). *Weed Science* 38(1):16-21
3. Clifford, S.C., S.K. Arndt, M. Popp, H.G. Jones, 2002. Mucilages and polysaccharides in Ziziphus species (Rhamnaceae): localization, composition and physiological roles during drought-stress. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 53, No. 366, pp. 131-138.
4. Ernst, W.H., and D.J. Tolsma. 1988. Dormancy and germination of semi-arid annual plan species, *Tragus berteronianus* and *Tribulus terrestris*. *Flora* 181(3/4):243-251.
5. Holm, L.G., D.L. Plunknett, J.V. Pancho, and J.P. Herberger, 1991. The world's worst weeds. *Distribution and biology*. Krieger Publishing Company, Malabar, Florida. 609 pp.
6. Kostova, I., D. Dinchev, 2005. Saponins in *Tribulus terrestris* – chemistry and bioactivity. *Phytochemistry reviews*, 4, 111-116.
7. Nilolaeva, M.G. 1969. Physiology of deep dormancy in seeds. Izdatelstvo "Nauka", Leningrad.
8. Pathak, P.S., 1970. Contributions to the ecology of *Tribulus terrestris* L. II. Habitat studies. *Agra University Journal of Research Science* 19(2):149-166.
9. Rice, P.M. 2002. Invaders Database System, University of Montana, Division of Biological Sciences, Missoula, Montana 59812-4824. Website: <http://invader.dbs.umt.edu>
10. Squires, V.R., 1979. The biology of Australian weeds. 1. *Tribulus terrestris* L. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* 45(2):75-82.
11. Tomova M., R. Gyulemetova, S. Zarkova, 1978. An agent for stimulation of sexual function. *Bulg. patent* (11) 27584A61K35/1978.