

Научная статья

УДК 58.036:58.085

DOI: 10.30901/2658-6266-2024-4-o2



Микроклональное размножение *Cardiocrinum cordatum* var. *glehnii* (Liliaceae) с использованием культуры изолированных зародышей

Е. В. Андропова, О. Г. Бутузова, А. А. Ковалева, Е. Ю. Семенова

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Автор, ответственный за переписку: Елена Валентиновна Андропова, elena_andronova@binran.ru

В статье изложены результаты опытов по введению в культуру *in vitro* *Cardiocrinum cordatum* var. *glehnii* (F. Schmidt) H. Nara с использованием изолированных зародышей. В природе семена этого вида прорастают в течение двух лет, что связано со сложным морфофизиологическим типом покоя, при котором прорастанию семян предшествует период доразвития зародыша внутри семени. Для того, чтобы ускорить получение проростков, использовали метод культивирования изолированных зародышей *in vitro*. Зародыши выделяли как из зрелых семян, без стратификации, так и из семян, прошедших стратификацию при разных температурных режимах. Показано, что использование зародышей, выделенных из семян без стратификации для введения в культуру *in vitro*, не является эффективным. В большинстве случаев рост зародышей или не происходил совсем, или сопровождался различными аномалиями; в конечном итоге проростки подвергались некрозу. Зародыши, прошедшие доразвитие после стратификации, были способны формировать нормальные проростки, которые в дальнейшем использовали для микроклонального размножения. Показано, что наиболее эффективно использовать в качестве эксплантов поперечные сегменты луковицы, располагающиеся выше донца. Закладка дополнительных луковичеподобных структур наблюдалось в основании срезов мясистых оснований листьев. Побег, после переноса на среду Мурасиге и Скуга с половинным содержанием макро и микросолей, формировали адвентивные корни и нормально развитые листья. Дополнительные побеги были успешно использованы для последующего цикла микроклонального размножения.

Ключевые слова: сложный морфофизиологический тип покоя семян, культура изолированных зародышей, микроклональное размножение, стратификация семян

Благодарности: Работа проведена в рамках государственного задания Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН № 124013100862-0 «Поливариантность морфогенетических программ развития репродуктивных структур растений, регуляция морфопроцессов *in vivo* и *in vitro*»

Для цитирования: Андропова Е.В., Бутузова О.Г., Ковалева А.А., Семенова Е.Ю. Микроклональное размножение *Cardiocrinum cordatum* var. *glehnii* (Liliaceae) с использованием культуры изолированных зародышей. *Биотехнология и селекция растений*. 2024;7(4):82-91. DOI: 10.30901/2658-6266-2024-4-o2

Прозрачность финансовой деятельности: Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы.

© Андропова Е.В., Бутузова О.Г., Ковалева А.А., Семенова Е.Ю., 2024

Original article

DOI: 10.30901/2658-6266-2024-4-o2

Microclonal propagation of *Cardiocrinum cordatum* var. *glehnii* (Liliaceae) using the culture of isolated embryos

Elena V. Andronova, Oksana G. Butuzova, Alina A. Kovaleva, Ekaterina Yu. Semenova

Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

Corresponding author: Elena V. Andronova, elena_andronova@binran.ru

The article presents the results of experiments on the introduction of *Cardiocrinum cordatum* var. *glehnii* (F. Schmidt) H. Hara into the *in vitro* culture using isolated embryos. In nature, the seeds of this species germinate within two years, which is associated with a complex morphophysiological type of dormancy, in which seed germination is preceded by a period of further development of the embryo inside the seed. In order to speed up the production of plantlets, a method of culturing isolated embryos *in vitro* was used. Embryos were isolated from both mature seeds without stratification and from seeds that had undergone stratification at different temperature conditions. The use of embryos isolated from the non-stratified seeds for the introduction into *in vitro* culture was shown to be ineffective. In most cases, embryo growth either did not occur at all, or was accompanied by various anomalies; ultimately, the plantlets became necrotic. Embryos that underwent further development after stratification were capable of forming normal plantlets, which were subsequently used for microclonal propagation. The use of transverse segments of the bulb above its stem was found to be most efficient. The development of additional bulb-like structures was observed at the base of sections of the fleshy bases of leaves. After the transfer to the Murashige and Skoog medium with half the content of macro and micro salts, the plantlets formed adventitious roots and normally developed leaves. Additional shoots were successfully used for subsequent micropropagation cycles.

Keywords: complex morphophysiological type of seed dormancy, culture of isolated embryos, microclonal propagation, stratification of seeds

Acknowledgements: The work was carried out within the framework of the State Assignment to the Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences No. 124013100862-0 “Polyvariance of morphogenetic programs for the development of reproductive structures of plants, and regulation of morphoprocesses *in vivo* and *in vitro*”

For citation: Andronova E.V., Butuzova O.G., Kovaleva A.A., Semenova E.Yu. Microclonal propagation of *Cardiocrinum cordatum* var. *glehnii* (Liliaceae) using the culture of isolated embryos. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2024;7(4):82-91. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2024-4-o2

Financial transparency: The authors have no financial interest in the presented materials or methods. The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work. The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employers.

© Andronova E.V., Butuzova O.G., Kovaleva A.A., Semenova E.Yu., 2024

Введение

Дикорастущие виды растений относятся к биологическим ресурсам и представляют собой важную часть сырьевого потенциала России. Многие из них являются редкими исчезающими растениями, и это ограничивает возможности их использования в качестве новых нетрадиционных растений с хозяйственно-ценными признаками. Одной из задач для сохранения и расширения биоресурсной базы нашей страны является развитие технологий создания биокультур ресурсных видов и искусственных экосистем для перехода от изъятия биологических объектов из природных популяций к их культивированию (Biological resources of the Russian Federation..., 2024). Эти технологии дополняют существующие традиционные методы сохранения биоразнообразия *ex situ* современными биотехнологическими инструментами, обеспечивающими возможность устойчивого управления генетическими ресурсами (Benson, 2002).

Cardiocrinum cordatum var. *glehnii* (F. Schmidt) Н. Нара является эндемиком Сахалинской области, относится к редким растениям, занесен в Красную книгу РФ (On approval of the List of flora species..., 2023), является растением декоративным, пищевым и лекарственным (Vorontkova et al., 2023). В качестве сырья могут быть использованы луковицы и листья для получения комплексов полезных вторичных метаболитов (Hori et al., 2021; Momotomi et al., 2022). Размножение семенное и вегетативное с помощью луковиц деток. В природных условиях прорастание семян происходит через два года после их опадения.

Введение *C. cordatum* var. *glehnii* в культуру ограничивается биологическими особенностями вида. Это монокарпическое растение, семена характеризуются затрудненным прорастанием, обусловленным наличием покоя, который по классификации Николаевой (Nikolaeva, 1983), относится к сложному морфофизиологическому типу (МФП). Этот тип покоя обусловлен недоразвитием зародыша в зрелом семени и наличием физиологического механизма торможения прорастания (ФМТ). Более того, при сложном МФП имеет место не только ФМТ прорастания семян, но и ФМТ доразвития зародыша (Nikolaeva, 1983). В работах, посвященных покою семян у *C. cordatum* var. *glehnii*, обнаружено, что действуют не два, а три механизма, тормозящие прорастание: ФМТ доразвития зародыша и два механизма торможения собственно прорастания (роста зародышевого корня через покровы семени), один из которых действует в зародыше, а другой – в окружающих его структурах семени (Andronova et al., 2019; Butuzova et al., 2019).

Для видов, семенное возобновление которых ослаблено или затруднено, использование культуры *in vitro* более эффективно по сравнению с традиционными методами размножения (Vetchinkina, 2010). В последнее время активизировались исследования по разработке био-

технологических приёмов сохранения редких видов растений и имеются протоколы по их эффективно-му введению в культуру *in vitro*. Однако по отношению к *C. cordatum* var. *glehnii* такие работы не проводились. Сведения о биотехнологических методах размножения этого вида в литературе отсутствуют. В ряде работ высказана точка зрения, что недоразвитие зародыша в покоящихся семенах можно преодолеть при культивировании изолированных зародышей *in vitro* (Vetchinkina, 2010; Zheleznichenko et al., 2016; Prasanth et al., 2023).

В исследовании представлены результаты по введению *C. cordatum* var. *glehnii* в культуру *in vitro* с использованием изолированных зародышей. Настоящая статья продолжает серию публикаций (Andronova et al., 2019; Butuzova et al., 2019, Butuzova et al., 2023) по исследованию особенностей прорастания семян *C. cordatum* var. *glehnii* и влияния стратификации семян на способность изолированных зародышей развиваться в культуре *in vitro*.

Материалы и методы

Семена *Cardiocrinum cordatum* var. *glehnii* (кардиокринум Глена, лилия Глена) были собраны в октябре 2021 года в местах естественного произрастания вида (остров Сахалин).

Перед постановкой всех опытов семена замачивали в воде в чашках Петри на фильтровальной бумаге для набухания, выдерживали в течение двух суток при температуре 20°C, другие обработки к ним не применялись. Из семян выделяли зародыши и помещали их на питательную среду.

В опытах использовали нестратифицированные свежесобранные выполненные и жизнеспособные семена через один месяц после сбора, а также через шесть месяцев и один год сухого хранения в холодильнике при 2°C. Результаты всех экспериментов суммированы и представлены как вариант 0 (то есть нестратифицированные семена).

Использовали также зародыши, извлеченные из семян, прошедших разные режимы стратификации:

Вариант 1: (20°C – 3 мес.);

Вариант 2: (20°C – 2 мес.) – (9-10°C – 1 мес.);

Вариант 3: (9-10°C – 3 мес.);

Вариант 4: (20°C – 2,5 мес.) – (9-10°C – 2,5 мес.);

Вариант 5: (0-2°C – 1 мес.) – (9-10°C – 1 мес.) – (0-2°C – 1 мес.) – (20°C – 1 мес.) – (0-2°C – 1 мес.) – (9-10°C – 1 мес.) – (0-2°C – 1 мес.) – (20°C – 1 мес.);

Вариант 6: (0-2°C – 3 мес.) – (10°C – 3 мес.) – (20°C – 3 мес.).

Зародыши изолировали из семян, стерилизованных в «Белизне» (100 мл отбеливателя + 150 мл стерильной дистиллированной воды). Культивирование изолированных зародышей и проростков проводили на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962) с половинной концентрацией макро- и микроэлементов

с добавлением витаминов В₁, В₂ и РР (в концентрации 1 мг/л каждого), 2% сахарозы и 0,7% агар.

Выращенные растения использовали для микроклонального размножения. В качестве эксплантов выступали части семядоли, сегменты поперечных срезов основания луковицы (донце) и выше донца. Экспланты высаживали на среду МС с добавлением витаминов В₁, В₂ и РР (в концентрации 1 мг/л каждого), 2 мг/л 6-БАП, 1 мг/л НУК и дополненной сахарозой (3%) и агаром (0,7%).

Полученные адвентивные побеги укореняли на среде МС с половинной концентрацией макро и микроэлементов без гормонов, 2% сахарозой и 0,7% агаром.

Съемку и документацию изображений проводили с использованием стереоскопического микроскопа Stemy 2010 (Zeiss, Германия) и программного пакета Image-Pro Insight 8.0 (Media Cybernetics, США), а также цифрового фотоаппарата Nikon (Nikon, Япония). Статистический анализ данных проводили в приложении Microsoft Office

Excel 2016.

Результаты

Культура зародышей, изолированных из семян без стратификации. Зародыши *Cardiocrinum cordatum* var. *glehnii* на момент опадения семени с материнского растения являются недоразвитыми (Рис.1 а, б). Их средняя длина составляла 0,68±0,02 мм, они занимали 1/6-1/7 длины семени. После посадки на питательную среду никаких изменений в зародышах, изолированных из семян как свежесобранных, так и после разного срока хранения, которые бы свидетельствовали о начале ростовых процессов, не наблюдалось. Лишь единичные зародыши трогались в рост и спустя четыре месяца достигали в длину 1,09 мм и 1,38 мм (Таблица), но через некоторое время они претерпевали некроз.

Таблица. Характеристика зародышей, изолированных из семян без стратификации или при разных ее режимах, в культуре *in vitro*
Table. Characterization of *in vitro* embryos isolated from seeds without stratification or under different stratification conditions

Вариант опыта, состояние семян и режим стратификации/ Experimental variant, seed condition and stratification regime	Длительность стратификации/ Duration of stratification	Число изолированных зародышей/ Number of isolated embryos	Длина изолированных зародышей, мм/ Length of isolated embryos, mm	Длительность культивирования зародышей <i>in vitro</i> / Duration of <i>in vitro</i> embryo cultivation	Характеристика зародышей после культивирования <i>in vitro</i> / Characteristics of embryos after <i>in vitro</i> cultivation		
					Число растущих зародышей/ No. of growing embryos	Длина зародышей (мм)/ Embryo length (mm)	Состояние развития, успешность введения в культуру <i>in vitro</i> / Development status, success of introduction into <i>in vitro</i> culture
0:свежесобранные или после сухого хранения	0	20	0,68±0,02	4 мес.	2	1,09; 1,38	Некроз
1: 20°C – 3мес.	3	10	0,71±0,01	1 мес.	3	1,37; 2,68; 3,61	Некроз
2: (20°C – 2мес.) – (9-10°C – 1 мес.)	3	10	0,99±0,03	1 мес.	10	5,11±0,17	Аномальное развитие, некроз
3. (9-10°C – 3 мес.)	3	10	0,81±0,07	1 мес.	6	от 0,95 до 5,69 мм	Аномальные, гетерогенность по размерам, некроз
4: (20°C – 2,5 мес.) – (9-10°C – 2,5 мес.)	5	10	4,84±0,25	2 дня	10	7,12±0,31	Нормальные, без роста зародышевого корня
5: (0-2°C – 1 мес.) – (9-10°C – 1 мес.) – (0-2°C – 1 мес.) – (20°C – 1 мес.) – (0-2°C – 1 мес.) – (9-10°C – 1 мес.) – (0-2°C – 1 мес.) – (20°C – 1 мес.)	8	10	>4,5	12 дней	10	~50,0	Нормальные
6: (0-2°C – 3 мес.) – (10°C – 3 мес.) – (20°C – 3 мес.)	9	10	>4,5	12 дней	10	~50,0	Нормальные

Культура зародышей, изолированных из семян после стратификации при разных условиях. Скорость роста зародышей, изолированных из стратифицированных семян, различалась в зависимости от варианта температурной обработки семян (см. Таблица). Как видно из таблицы, в вариантах 1-4 использовали только теплую стратификацию при постоянной температуре или с чередованием температурных режимов общей продолжительностью 3 месяца или 5 месяцев. В вариантах 5 и 6 проращивание семян проводили при смене теплой и холодной стратификации, длительность холодного периода составила 4 и 3 месяца, теплого – 4 и 6 месяцев, соответственно.

При культивировании зародышей, изолированных из

семян после стратификации в вариантах 1 и 3 (стратификация три месяца при постоянной температуре 20°C или 9-10°C, соответственно), длина большинства из них не менялась. Отмечен рост лишь у единичных зародышей, их максимальная длина составила 3,61 мм (вариант 1) и 5,69 мм (вариант 3) (см. Таблица). Однако, развитие их сопровождалось аномалиями, и в конечном счете такие зародыши претерпевали некроз.

Спустя месяц культивирования зародышей, извлеченных из семян после стратификации по варианту 2, их средняя длина увеличилась до $5,11 \pm 0,17$ мм. Однако зародыши также имели аномальное строение (Рис. 1g, h) и со временем гибли вследствие некроза.



Рис. 1. Семена, изолированные зародыши и проростки *Cardiocrinum cordatum* var. *glehnii*

a, b – семя после диссеминации и изолированный из него зародыш;
c, d – семя после доразвития зародыша и изолированный из него зародыш; e – растущие на питательной среде проростки;
f – проросток нормального строения; g, h – проростки аномального строения.
Масштабные линейки. a, c – 1,5 мм; b – 0,6 мм; d – 1,2 мм; g – 2,5 мм; h – 2 мм

Fig. 1. Seeds, isolated embryos and plantlets of *C. cordatum* var. *glehnii*

a, b – seed after dissemination and embryo isolated from it; c, d – seed after embryo post-development and embryo isolated from it;
e – plantlets on the nutrient medium; f – normal plantlet; g, h – abnormal plantlets.
Scale bars. a, c – 1.5 mm; b – 0.6 mm; d – 1.2 mm; g – 2.5 mm; h – 2 mm

В варианте 4, при котором длительность теплой обработки семян составила 5 месяцев (2,5 мес. при 20°C и 2,5 мес. при 9-10°C), на момент высадки длина зародышей была сопоставима с длиной зародышей, прошедших полное доразвитие в семенах при стратификации (Рис. 1с, d). После посадки на питательную среду зародыши быстро трогались в рост; из них формировались проростки нормального строения, однако, не наблюдался рост зародышевого корня. После формирования луковички образовывались адвентивные корни, а зачаток зародышевого корня отмирал.

В вариантах стратификации 5 и 6 с чередованием периодов холода и тепла рост зародышей происходил лишь в тепле. По окончании периода стратификации длина зародышей в обоих вариантах составляла более 4,5 мм. После высадки зародышей на питательную среду отмечался их интенсивный рост – за 12 дней культивирования *in vitro* длина зародышей увеличилась почти в 10 раз, главным образом за счет роста семядоли. Зародышевый корень также развивался, но значительно медленнее (Рис. 1 е, f).



Рис. 2. Растения и экспланты, культивируемые на питательной среде в культуре *in vitro*
 а, b – растения, использованные для микроклонального размножения; с-f и g-j – два экспланта (поперечные срезы выше донца луковичы) на разных стадиях инициации и регенерации побегов.
 Масштабная линейка. с – 4 мм

Fig. 2. Plants and explants cultivated on the nutrient medium in the *in vitro* culture
 а, b – the plants used for microclonal propagation; c-f and g-j – two explants (cross-sections above the stem of the bulb) at different stages of initiation and regeneration of shoots.
 Scale bar. с – 4 mm

Микроклональное размножение растений, выращенных в культуре изолированных зародышей. Для клонирования использовали растения из вариантов 5 и 6. Растения на момент клонирования имели луковицу, листовидную семядолю, несколько листьев с утолщенными основаниями и несколько адвентивных корней (Рис. 2 а, б). В качестве эксплантов использовали все указанные в методике части растений.

Фрагменты пластинок семядоли не проявили регенерационной способности. Наблюдалось только увеличение их размеров без последующей пролиферации. В течение нескольких месяцев они сохраняли зеленую окраску, впоследствии дегенерировали.

Поперечные срезы луковицы в районе донца также не дали регенерационного ответа. Тогда как регенерационная способность поперечных срезов выше донца луковицы в районе мясистых оснований семядоли, листьев, а также мясистой центральной части стебля, оказались эффективными эксплантами для микроклонального размножения (Рис. 2 с-ж). После помещения их на поверхность питательной среды через неделю наблюдалось разрастание оснований листовых органов, экспланты увеличивались в размерах. Появление морфогенных структур отмечалось через 1,5 месяца культивирования. В основании листьев, снаружи экспланта, а также внутри экспланта в основании влагалищ внутренних листьев и центральной части стебля, закладывались почки. Если процесс их инициации длился 1,5-2 месяца, то дальнейшее развитие происходило сравнительно быстро, и спустя месяц они приобретали вид луковичеподобных структур с листовидными органами.

Полученные культуры использовали для нового цикла микроклонального размножения, а также для укоренения и получения нормальных растений.

Для микроклонального размножения проводили деление на фрагменты эксплантов с заложившимися побегами, которые пересаживали на питательную среду; это приводило к образованию новых дополнительных побегов.

Для укоренения и дальнейшего роста растений побеги отделяли от тканей первичного экспланта и высаживали на питательную среду (1/2 МС) без физиологически активных веществ. Через несколько месяцев культивирования из них вырастали нормально сформированные растения, которые имели луковицу, несколько листьев с утолщенными основаниями и адвентивные корни.

Обсуждение

Опыты по проращиванию стратифицированных семян *Cardiocrinum cordatum* var. *glehnii* на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри показали, что семена жизнеспособные: в 100% случаев происходило доразвитие зародыша, 86-100% проросли (Butuzova et al., 2023). Поскольку в настоящем эксперименте была использована только часть семян из вышеуказанного опыта, то можно

сделать вывод, что на его начальный момент все зародыши были живые. В ходе проведения опыта оказалось, что способность зародышей развиваться в культуре *in vitro* зависит от температурных режимов при стратификации семян (см. Таблица). Так, зародыши, изолированные из семян, не прошедших стратификацию, зародыши, изолированные после 3 месяцев стратификации семян при 20°C (вариант 1) или после 3 месяцев старатификации при постоянной температуре 9-10°C (вариант 3), либо не росли совсем, либо развивались с аномалиями, а в дальнейшем погибали в результате некроза.

В варианте 2 (стратификация при 20°C в течение 3 мес. + 9-10°C – 1 мес.) из семян были выделены зародыши, достигшие примерно 1 мм в длину (см. Таблица), то есть начавшие расти. Это свидетельствует о том, что при введении зародышей в культуру *in vitro* у них, по-видимому, был выключен ФМТ доразвития (Andronova et al., 2019; Butuzova et al., 2019) и стимулирован рост. В процессе культивирования рост зародышей продолжался, через месяц их средняя длина составила $5,11 \pm 0,17$ мм, но их дальнейшее развитие сопровождалось аномалиями, через некоторое время они все претерпевали некроз.

Только в вариантах 4, 5 и 6 были получены проростки нормального строения; в этих вариантах для посадки на культуральную среду в условиях *in vitro* использовали зародыши длиной 4,5 мм, завершившие доразвитие внутри семени. Однако только теплая стратификация в варианте 4 не выключала у доразвившегося зародыша ФМТ роста зародышевого корня. Он оставался в виде зачатка и в процессе культивирования зародыша *in vitro* отмирал, а его функцию выполняли адвентивные корни, сформировавшиеся в основании луковицы.

По результатам, полученным в вариантах 1-4, можно заключить, что для нормального морфогенеза зародыша недостаточно блокировать ФМТ доразвития (как например, в вариантах 1-3), равно как и стимулировать начало роста зародыша (варианты 2 и 3). Необходимо полное завершение процесса доразвития, и только после этого можно использовать зародыши в качестве эксплантов для культивирования *in vitro*. Вероятно, на протяжении всего процесса доразвития внутри семени у зародыша сохраняется связь с окружающими его структурами, которые контролируют этот процесс от начала до конца. В ранних работах мы указывали на существование одного механизма торможения доразвития, локализованного в самом зародыше (Andronova et al., 2019; Butuzova et al., 2019). Результаты настоящего исследования позволяют сделать вывод о существовании еще одного механизма торможения развития зародыша, который реализуется в окружающих его структурах семени.

В вариантах 5 и 6, где семена стратифицировали 8-9 месяцев не только в тепле, но и под воздействием периодов холода при 0-2°C разной продолжительности, зародыши проходили доразвитие, а также у них был выключен ФМТ развития зародышевого корня. Из таких зародышей в культуре *in vitro* быстро развивались морфо-

логически нормальные проростки, а затем растения. При этом не имело значения, в какой момент и какой длительности была обработка холодом. Важным оказалась только суммарная протяженность холодного периода – четыре месяца в варианте 5 и три месяца в варианте 6.

Таким образом, для введения в культуру *in vitro* изолированных зародышей кардиокринума требуется проводить длительную стратификацию семян. Необходимо блокировать ФМТ доразвития зародыша, что происходит при теплой стратификации в течение не менее 5 месяцев (2,5 мес. при 20°C и 2,5 мес. при 9-10°C). Если для стратификации использовать обработку холодом (не менее 3 мес.), то это позволит отключить ФМТ развития зародышевого корня, но при этом сроки обработки семян увеличиваются.

В опытах по проращиванию семян на влажной фильтровальной бумаге чередование периодов теплой и холодной стратификации до и в процессе доразвития зародыша не приводило к проклевыванию корешком покровов семени сразу после окончания доразвития зародыша. Необходимо был еще один период длительной холодной стратификации семян для отмены ФМТ роста зародышевого корня (Andronova et al., 2019; Butuzova et al., 2019; 2023). В настоящем исследовании у изолированных зародышей, прошедших доразвитие в семенах при чередовании теплой и холодной стратификации, и затем высаженных на культуральную среду, корень развивался нормально (варианты 5 и 6). Это указывает на то, что ФМТ прорастания, работающий в зародыше, был блокирован в период доразвития зародыша. В лабораторных условиях вторую дополнительную обработку семян низкими температурами после доразвития зародыша можно исключить.

Сформированные изолированные зародыши широко используются в технологиях *in vitro*, поскольку способны к росту на искусственной питательной среде вне материнского организма. Из этого следует, что у семян, имеющих стадию покоя, процедура изолирования зародыша и культивирование его на питательной среде *in vitro* позволяет не учитывать ФМТ прорастания. Однако это утверждение справедливо не для всех растений. Например, в культуре *in vitro* зародышей, изолированных из зрелых нестратифицированных семян *C. cordatum* var. *glehnii*, ФМТ прорастания продолжает работать.

Сходный тип покоя (сложный МФП) наблюдается у видов рода *Fritillaria*. Так, установлено, что у *Fritillaria pallidiflora* Schrenk ex Fisch. & C.A. Mey. ФМТ доразвития зародыша и прорастания семян выключается при длительной (более 5 мес.) холодной стратификации (Pozdova et al., 2008). В связи с вышеуказанными особенностями, использование зародышей, выделенных из зрелых семян представителей рода *Fritillaria*, как и *C. cordatum* var. *glehnii*, является проблемным. Успешным для *Fritillaria* оказалось введение в культуру *in vitro* изолированных зародышей незрелых семян, в которых стадия покоя еще не наступила (Muraseva, Novikova, 2018) или зародышей, завершивших доразвитие в семени

(Vetchinkina, 2010).

В целом для введения в культуру *in vitro* изолированных зародышей *C. cordatum* var. *glehnii* требуется больше времени, чем для большинства других растений. Однако применение данного метода дает возможность для более быстрого получения растений кардиокринума по сравнению с обычными приемами проращивания его семян в лабораторных условиях и по сравнению с семенным размножением в природных условиях.

В большинстве работ по микроклональному размножению представителей рода *Lilium* и других лилейных основным типом эксплантов считаются сегменты луковичных чешуй (Churikova, 2000; Lian et al., 2003; Joshi, Dhar, 2009; Uranbey et al., 2010; Liu, Yang, 2012; Rahimi et al., 2013; Muraseva, 2016; Shibanova, Popkova, 2020). Отмечено, что регенерация луковичек происходит преимущественно в их базальной части (Marinangeli et al., 2003; Khawar et al., 2005).

Наши исследования согласуются с данными литературы о том, что основание листьев (луковичных чешуй) у представителей рода *Lilium* обладают высокой регенерационной способностью. Как было показано, закладка дополнительных луковичеподобных структур наблюдалась на поперечных срезах луковицы *C. cordatum* var. *glehnii* выше донца в основании мясистых оснований семядоли и листьев. После переноса на среду ½ МС у побегов формировались адвентивные корни и нормально развитые листья. Дополнительные побеги были успешно использованы для последующего цикла микроклонального размножения. Нами показано, что размножение этого редкого вида в культуре *in vitro* с использованием выращенных из зародышей стерильных растений является высоко эффективным методом.

Заключение

Для успешного введения в культуру изолированных зародышей *C. cordatum* var. *glehnii* необходимо использовать для посадки уже доразвившиеся зародыши, длиной 4-5 мм. Для этого необходимо провести предварительную длительную, в течение не менее семи месяцев, теплую и холодную стратификацию семян. В течение этой обработки необходимо последовательно отключить три механизма торможения прорастания из четырех, требуемых для нормального хода морфогенеза проростков. Первые два – это механизмы торможения доразвития зародыша и запуска его роста внутри семени, которые выключаются только в тепле с перепадом температур (с 20°C на 9-10°C), третий и четвертый – это механизмы торможения прорастания, которые блокируются при длительной (3-4 месяца) обработке холодом (0-2°C). Один из них функционирует в самом зародыше, и его можно отключить воздействием холода во время доразвития. При изолировании зародышей нет необходимости выключать четвертый ФМТ прорастания, который действует в окружающих зародыш структурах семени.

Выращенные из зародышей растения можно использовать для дальнейшего микроклонального размножения. Если первый этап – введение в культуру *in vitro* и получение стерильных растений – длительный, и требует знаний об особенностях покоя семян данного вида, то после введения в культуру массовое размножение этого редкого вида с использованием выращенных из зародышей стерильных растений имеет высокую эффективность и не представляет особых проблем, как и в случае многих других представителей лилейных.

References/Литература

- Andronova E., Butuzova O., Torshilova A. Mechanisms of seed dormancy in *Cardiocrinum cordatum* var. *glehnii* (Liliaceae). *Botanica Pacifica. A journal of plant science and conservation*. 2019;8(2):19-24. DOI: 10.17581/bp.2019.08206
- Benson E.E. *Plant Conservation Biotechnology*. London, Philadelphia, PA: Taylor & Francis; 2002.
- Biological resources of the Russian Federation (Biologicheskiye resursy Rossiyskoy Federatsii): [web portal]. [in Russian] (Биологические ресурсы Российской Федерации: [web-портал]). URL: <http://www.sevin.ru/bioresrus/> [дата обращения: 24.10.2024].
- Butuzova O., Torshilova A., Andronova E. Seed dormancy in *Cardiocrinum cordatum* var. *glehnii* (Liliaceae) and ways of its overcoming. *International Journal of Plant Reproductive Biology*. 2019;11(1):51-57. DOI: 10.14787/ijprb.2019.11.1
- Butuzova O.G., Kovaleva A.A., Andronova E.V. The effect of cold treatment on seed germination of *Cardiocrinum cordatum* var. *glehnii* (Liliaceae). *Botanicheskiy zhurnal = Botanical Journal*. 2023;108(12):85-93. [in Russian] (Бутузова О.Г., Ковалева А.А., Андропова Е.В. Влияние холода на прорастание семян *Cardiocrinum cordatum* var. *glehnii* (Liliaceae). *Ботанический журнал*. 2023;108(12):85-93). DOI: 10.31857/S0006813623120037
- Churikova O.A. Some features of morphogenesis of lilies and hyacinths during clonal *in vitro* micropropagation (Nekotoriye osobennosti morfogeneza liliy i giatsintov pri klonalnom mikrorazmnozhении *in vitro*). In: *Morfofiziologiya of specialized runaways of long-term grassy plants: the Program and theses of reports of the All-Russia meeting (Morfofiziologiya spetsializirovannykh pobegov mnogoletnikh travyanistykh rastenii: Programma i tezisy dokladov Vserossiiskogo soveshchaniya); 2000 October 3-5; Syktyvkar, Russia*. Syktyvkar; 2000. p.171-172. [in Russian] (Чурикова О.А. Некоторые особенности морфогенеза лилий и гиацинтов при клональном микроразмножении *in vitro*. В кн.: *Морфофизиология специализированных побегов многолетних травянистых растений: программа и тезисы докладов Всероссийского совещания; 3-5 октября 2000 г.; Сыктывкар, Россия*. Сыктывкар; 2000. С.171-172).
- Hori K., Watanabe T., Devkota H.P. Phenolic acid derivatives, flavonoids and other bioactive compounds from the leaves of *Cardiocrinum cordatum* (Thunb.) Makino (Liliaceae). *Plants*. 2021;10(2):320. DOI: 10.3390/plants10020320
- Joshi S.K., Dhar U. *In vitro* propagation from axenic explants of *Lilium oxypetalum* (D. Don) Baker, an endemic bulbous plant of high altitude Himalaya. *Acta physiologiae plantarum*. 2009;31:833-838. DOI: 10.1007/s11738-009-0299-y
- Khawar K.M., Cocu S., Parmaksiz I., Sarihan E.O., Ozcan S. Mass proliferation of Madonna lily (*Lilium candidum* L.) under *in vitro* conditions. *Pakistan Journal of Botany*. 2005;37(2):23-248.
- Lian M.L., Chakrabarty D., Paek K.Y. Bulblet formation from bulb scale segment of *Lilium* using bioreactor system. *Biologia plantarum*. 2003;46(2):199-203. DOI: 10.1023/A:1022890208500
- Liu X., Yang G. Adventitious shoot regeneration of oriental lily (*Lilium orientalis*) and genetic stability evaluation based on ISSR marker variation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*. 2012;48(2):172-179. DOI: 10.1007/s11627-012-9429-0
- Marinangeli P.A., Hernandez L.F., Pellegrini C.P., Curvetto N.R. Bulblet differentiation after scale propagation of *Lilium longiflorum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2003;128(3):324-329. DOI: 10.21273/JASHS.128.3.0324
- Momotomi F., Raju A., Wang D., Alsaadi D.H.M., Watanabe T. Phytochemical analysis and habitat suitability mapping of *Cardiocrinum cordatum* (Thunb.) Makino collected at Chiburijima, Oki Islands, Japan. *Molecules*. 2022;27(23):8126. DOI: 10.3390/molecules27238126
- Muraseva D.S. Propagation and conservation *in vitro* of rare and endemic species of *Fritillaria* L. genus (Razmnozheniye i sokhraneniye redkikh i endemichnykh vidov roda *Fritillaria* L.) [dissertation]. Novosibirsk; 2016. [in Russian] (Мурасева Д.С. Размножение и сохранение редких и эндемичных видов рода *Fritillaria* L.): дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск; 2016).
- Muraseva D.S., Novikova T.I. *In vitro* culture initiation using immature seeds of a rare species *Fritillaria meleagroides* Patrin ex Schult. et Schult. fil. (Liliaceae). *Tomsk State University Journal of Biology*. 2018;44:172-187. [in Russian] (Мурасева Д.С., Новикова Т.И. Индукция культуры *in vitro* редкого вида *Fritillaria meleagroides* Patrin ex Schult. et Schult. fil. (Liliaceae) с использованием незрелых семян. *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2018;44:172-187).
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(13):473-479. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nikolaeva M.G. Seed dormancy and ways of its overcoming. *Russian Journal of Developmental Biology*. 1983;24(4):79-86. [in Russian] (Николаева М.Г. Покой семян и способы его преодоления. *Онтогенез*. 1983;24(4):79-86).
- On approval of the List of flora species listed in the Red Book of the Russian Federation: order of the Ministry of Natural Resources and Environment of the Russian Federation dated 23.05.2023 No. 320 (Ob utverzhdenii Perechnya ob"yektov rastitel'nogo mira, занесенных в Красную книгу Rossiyskoy Federatsii: prikaz Ministerstva prirodnykh resursov i ekologii Rossiyskoy Federatsii ot 23.05.2023 № 320). Moscow; 2023. [in Russian] (Об утверждении Перечня объектов растительного мира, занесенных в Красную книгу Российской Федерации: приказ Министерства природных ресурсов и экологии Российской Федерации от 23.05.2023 № 320. Москва; 2023). URL: <https://minjust.consultant.ru/documents/48550> [дата опубликования: 21.07.2023].
- Pozdova L.M., Titova G.E., Butuzova O.G. Seed germination in *Fritillaria pallidiflora* (Liliaceae) under gibberellin and kinetin influence. *Plant resources*. 2008;4:30-42. [in Russian] (Поздова Л.М., Титова Г.Е., Бутузова О.Г. Прорастание семян *Fritillaria pallidiflora* (Liliaceae) под действием гиббереллина и кинетина. *Растительные ресурсы*. 2008;4:30-42).
- Prasanth C., Baddigam K.R., Kailas K.A. Embryo Culture and its Application in Biotechnology. *Plant Sciences at a Glance*. 2023;14:269-280.
- Rahimi M., Daneshvar M.H., Heidari M., Yari F. *In vitro* micropropagation of *Fritillaria imperialis* L. through induction of indirect organogenesis. *International Journal of Agronomy and Plant Production*. 2013;4(3):418-424.
- Shibanova N.L., Popkova A.S. Micropropagation of some sort groups of lilies. *Vestnik Permskogo universiteta. Biologiya*. 2020;4:280-285. [in Russian] (Шибанова Н.Л., Попкова А.С. Микроклональное размножение некоторых сортогрупп лилий. *Вестник Пермского университета. Биология*. 2020;4:280-285). DOI: 10.17072/1994-9952-2020-4-280-285
- Uranbey S., Ipek A., Caliskan M., Dundar E., Cocu S., Basalma D., Guneylioglu H. *In vitro* bulblet induction from bulb scales of endangered ornamental plant *Muscari azureum*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2010;24:2:1843-1848. DOI: 10.2478/V10133-010-0024-4
- Vetchinkina E.M. Biological features of *in vitro* cultivation of seeds and embryos of rare plant species (Biologicheskiye osobennosti kultivirovaniya *in vitro* semayn i zarodyshey redkikh vidov rasteniy) [dissertation]. Moscow: Main Botanical Garden named after N.V. Tsitsin of the Russian Academy of Sciences; 2010. [in Russian] (Ветчинкина Е.М. Биологические особенности культивирования *in vitro* семян и зародышей редких видов растений): дис. ... канд. биол. наук. Москва: Главный

ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук; 2010).
Voronkova N.M., Kholina A.B., Zhuravlev Yu.N., Sundukova E.V. Reproduction of the Russian Far East Plants. 2023. [in Russian] (Воронкова Н.М., Холина А.Б., Журавлев Ю.Н., Сундукова Е.В. Размножение растений российского Дальнего Востока; 2023). DOI: 10.25221/seeds
Zhelezniichenko T.V., Novikova T.I., Banaev E.V. Efficiency of

application of embryo cultural method for breaking dormancy in *Nitraria sibirica* (Nitrariaceae) seeds. *Rastitel'nyj mir Aziatskoj Rossii = Flora and vegetation of Asian Russia*. 2016;4(24):56-62. [in Russian] (Железниченко Т.В., Новикова Т.И., Банаев Е.В. Эффективность использования метода эмбриокультуры для преодоления покоя семян *Nitraria sibirica* (Nitrariaceae). *Растительный мир Азиатской России*. 2016;4(24):56-62). DOI: 10.21782/RMAR1995-2449-2016-4(56-62)

Информация об авторах

Елена Валентиновна Андропова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория эмбриологии и репродуктивной биологии, Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН), 197022 Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 2, elena_andronova@binran.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3918-2094>

Оксана Геннадьевна Бутузова, научный сотрудник, лаборатория эмбриологии и репродуктивной биологии, Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН), 197022 Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 2, obutuzova@binran.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3526-7453>

Алина Александровна Ковалева, младший научный сотрудник, лаборатория эмбриологии и репродуктивной биологии, Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН), 197022 Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 2, akovaleva@binran.ru

Екатерина Юрьевна Семенова, младший научный сотрудник, лаборатория эмбриологии и репродуктивной биологии, Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН), 197022 Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 2, esemenova@binran.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3121-2458>

Information about the authors

Elena V. Andronova, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Embryology and Reproductive Biology, Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Science (BIN RAS), 2, Professor Popov Street, St. Petersburg, 197022 Russia, elena_andronova@binran.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3918-2094>

Oksana G. Butuzova, Cand. Sci. (Biology), Researcher, Laboratory of Embryology and Reproductive Biology, Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Science (BIN RAS), 2, Professor Popov Street, St. Petersburg, 197022 Russia, obutuzova@binran.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3526-7453>

Alina A. Kovaleva, Junior Researcher, Laboratory of Embryology and Reproductive Biology, Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Science (BIN RAS), 2, Professor Popov Street, St. Petersburg, 197022 Russia, akovaleva@binran.ru

Ekaterina Yu. Semenova, Junior Researcher, Laboratory of Embryology and Reproductive Biology, Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Science (BIN RAS), 2, Professor Popov Street, St. Petersburg, 197022 Russia, esemenova@binran.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3121-2458>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 02.11.2024; одобрена после рецензирования 06.12.2024; принята к публикации 20.12.2024.

The article was submitted on 02.11.2024; approved after reviewing on 06.12.2024; accepted for publication on 20.12.2024.