

УДК 581.143.6, 581.142  
doi: 10.17223/19988591/44/10

Д.С. Мурасева, Т.И. Новикова

Центральный Сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск, Россия

**Индукция культуры *in vitro* редкого вида  
*Fritillaria meleagroides* Patr. ex Schult. et Schult. fil.  
(Liliaceae) с использованием незрелых семян**

Исследование выполнено в рамках государственного задания Центрального Сибирского ботанического сада СО РАН № АААА-А17-117012610051-5 по проекту «Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами» при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00164\18.

Выявлена эффективность использования незрелых семян *Fritillaria meleagroides* в качестве первичных эксплантов для введения в культуру *in vitro*. Установлено, что данный подход позволяет избежать этапа длительной холодной стратификации и значительно повысить всхожесть семян. Предкультивирование при  $23\pm 2^\circ\text{C}$  в темноте в течение 60 сут на безгормональной среде MS способствовало прорастанию 74% семян, тогда как в условиях стратификации всхожесть не превышала 27%. Индукцию регенерации наблюдали из тканей незрелых зиготических зародышей, изолированных после этапа предкультивирования, при этом базальные части проростков не проявляли морфогенной активности. Для эмбриокультуры *F. meleagroides* характерны процессы прямой и непрямой регенерации, при этом наибольший стимулирующий эффект отмечали при использовании 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты в концентрации от 0,1 до 1,0 мкМ. Высокие концентрации (2,5 и 5,0 мкМ) используемых регуляторов роста оказались неэффективными и приводили к некрозу тканей экспланта. Более интенсивно процессы регенерации протекали в условиях 16-часового фотопериода в сравнении с культивированием в темноте.

**Ключевые слова:** *Fritillaria*; незрелые зиготические зародыши; эмбриокультура; морфогенез; холодная стратификация.

### Введение

В последние годы при разработке новых стратегий сохранения биоразнообразия активно используются методы биотехнологии, служащие основой для создания коллекций редких и исчезающих видов *in vitro* [1]. Важность этих исследований определила интерес к разработке протоколов культивирования редких и эндемичных видов рода *Fritillaria*, востребованных не только как декоративные растения, но и как источники ценных лекарственных веществ [2–4].

Ключевым моментом для инициации культуры *in vitro* объекта исследования является подбор первичного экспланта. При создании систем регенерации для луковичных растений часто в качестве первичных эксплантов выбирают сегменты луковичных чешуй [5, 6]. Однако изоляция подземных органов сопряжена с сильной контаминацией и полным разрушением материнского растения, поэтому кроме подземных органов для введения в культуру *in vitro* также используют листья, листочки околоцветника, части стебля и семена. Работа с семенами дает возможность сохранить растение-донор неповрежденным, а также поддержать естественное генетическое разнообразие вида, что особенно важно для природных популяций редких растений [7]. Технология эмбриокультуры позволяет работать с незрелыми зародышами в качестве первичных эксплантов. В настоящее время, этот подход широко используется для изучения процессов дифференциации и физиологических аспектов эмбриогенеза, в работах по отдаленной гибридизации и получению гаплоидов, для индукции соматических эмбриоидов и преодоления покоя семян [8, 9].

Для семян рябчиков свойствен сложный глубокий морфофизиологический (БВ–В<sub>3</sub>) тип покоя семян [10, 11]. Такой тип покоя определяет недоразвитие зародыша и сильный физиологический механизм торможения прорастания. В литературе встречаются разнообразные методы, испытанные на семенах рябчиков и позволяющие преодолеть затрудненное прорастание и завершить процесс развития зародыша, такие как механическая и химическая скарификация, выщелачивание, обработка горячей водой, холодная и теплая стратификация, замораживание и обработка нитратом калия [12, 13].

*Fritillaria meleagroides* Patr. ex Schult. et Schult. fil. (рябчик малый или шахматовидный) – многолетнее травянистое растение, луковичный геоэфмероид. Распространен в Европе, Средней Азии, европейской части России и на Алтае, местообитания связаны с достаточным освещением и увлажнением. Вид занесен в ряд региональных Красных книг, в том числе в Красную книгу Новосибирской области (2008) в статусе уязвимого вида 2(V) [14].

Разработка эффективных протоколов микроразмножения необходима для создания систем сохранения уязвимых и редких растений в коллекциях *in vitro*, являющихся банком гермоплазмы и резервным фондом для пополнения «живых» коллекций в условиях *ex situ*. Настоящее исследование направлено на выявление оптимальных условий культивирования незрелых семян в качестве источников первичных эксплантов и индукцию морфогенеза из тканей незрелых зиготических зародышей и проростков *Fritillaria meleagroides*.

### Материалы и методики исследования

Незрелые плоды *F. meleagroides* с сочными зелеными стенками собраны с растений из природной популяции – НСО, Тогучинский район, пойма р. Изылы, заливной луг (55°10'21.8"N, 84°34'54.8"E).

**Введение в культуру *in vitro*.** Поверхностную стерилизацию плодов проводили погружением в 15%-ный водный раствор «Domestos» («Юнилевер Русь», Россия) на 20 мин, затем трижды промывали стерильной дистиллированной водой. После стерилизации в асептических условиях с помощью пинцета и скальпеля извлекали семена из плодов.

Эксперименты проводили согласно схеме, представленной на рис. 1. Предкультивирование незрелых семян проводили в темноте на 0,6%-ном водном растворе агара или питательной среде Мурасиге-Скуга (MS) [15] без регуляторов роста. Длительность этапа составляла 40 или 60 сут. На данном этапе использовали два температурных режима: 4°C (термостат «RuMed», Германия) и 23±2°C (свето-культуральная комната). Всего в исследовании использовано 480 семян *F. meleagroides*.

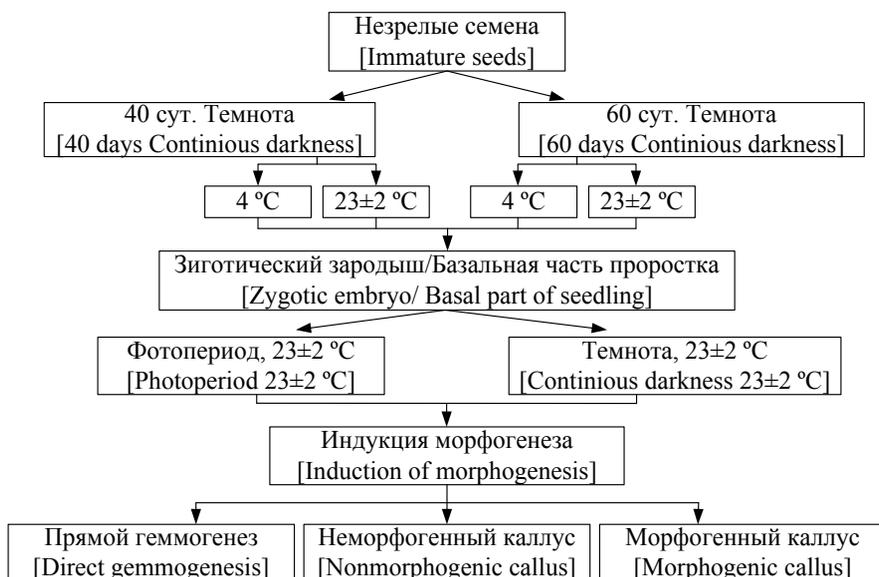


Рис. 1. Схема эксперимента  
[Fig. 1. Experiment scheme]

**Индукция морфогенеза в культуре незрелых зиготических зародышей.** После предкультивирования незрелые зиготические зародыши изолировали (путем сжимания семени пинцетом) и высаживали на среды для индукции морфогенеза. Культивирование проводили в свето-культуральной комнате при 23±2°C, в условиях темноты или 16-часового фотопериода (интенсивность освещения 4,0–4,2 клк). При прорастании семян изолировали базальную часть проростка и высаживали на питательные среды. Для индукции морфогенеза использовали минеральную основу по прописи среды MS, дополненную регуляторами роста: тидиазуроном (TDZ), 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-D) в концентрациях от 0,1 до 5,0 мкМ. Контролем

служила безгормональная среда MS. Длительность пассажа на данном этапе составила 60–75 сут.

В ходе экспериментов оценивали всхожесть семян (%), частоту каллусогенеза (%), частоту регенерации (%), количество выпячиваний или побегов (шт./экспл.).

Морфологический анализ развития проводили с использованием стереомикроскопа SteREODiscovery. V 12 с камерой высокого разрешения AxioCamHRc и с программой AxioVision 4.8 («CarlZeiss», Германия) на базе Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ЦСБС СО РАН (г. Новосибирск).

**Статистическая обработка результатов.** В каждый культуральный сосуд на этапе введения в культуру *in vitro* помещали по 10 семян, в экспериментах по индукции морфогенеза – по 5 эксплантов. Эксперименты проведены в 4–5 повторностях. Полученные данные обрабатывали с использованием пакетов программ Microsoft Office Excel 2007 и StatSoft STATISTICA 6.0. Значения в таблицах приведены в виде средних арифметических значений и стандартных ошибок ( $M \pm SE$ ). Для выявления статистически значимых различий проведен однофакторный дисперсионный анализ с тестом Дункана, многофакторный дисперсионный анализ применяли для оценки влияния состава питательной среды и условий культивирования. В работе обсуждали результаты статистически значимых различий средних ( $p < 0,05$ ).

## Результаты исследования

**Введение в культуру *in vitro*.** Размер плодов (длина) *F. meleagroides* варьировал в диапазоне 1,6–2,7 см (рис. 2, *a*), в среднем в одном плоде около 70 семян, полноценность и выполненность которых оценить не удалось из-за высокой степени незрелости. На момент введения семян в культуру *in vitro* зиготический зародыш слабо развит, имел линейную форму, располагался в микропилярной зоне, длина зародыша – 1,4–1,7 мм (рис. 2, *b*).

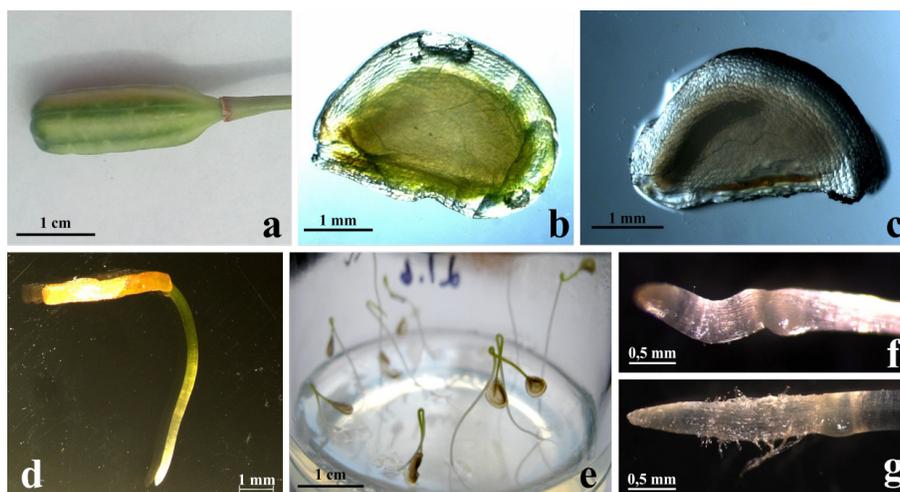
Начало роста зиготических зародышей отмечали через 8 сут после введения в культуру *in vitro*. Более активное развитие зародыша протекало при температуре  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ : размер увеличился до 2,6 мм и зародыш приобретал изогнутую форму, занимая  $\frac{2}{3}$  эндосперма, на всех питательных средах. При пониженной температуре роста зародыша не наблюдали.

В условиях холодной стратификации через 40 сут предкультивирования всхожесть семян на безгормональной среде MS выше и составила 21% (табл. 1). При этом на этапе предкультивирования при  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  наблюдали только рост зародыша, прорастание не отмечено (рис. 2, *c*). На данном этапе при отсутствии прорастания вне зависимости от условий зародыш занимал  $\frac{3}{4}$  или целиком весь эндосперм (78%) и размер зародыша достигал 3,2 мм.

Таблица 1 [Table 1]

**Всхожесть семян *Fritillaria meleagroides* в культуре *in vitro***  
**[*In vitro* germination rate of *Fritillaria meleagroides* seeds], %**

Условия проращивания [Germination conditions]	4°C		23±2°C	
	40 сут [days]	60 сут [days]	40 сут [days]	60 сут [days]
0,6% агар [Water agar]	11	20	0	66
MS	21	27	0	74



**Рис. 2.** Прорастание семян *Fritillaria meleagroides* в культуре *in vitro*, 23±2°C, темнота: *a* – незрелый плод; *b* – семя перед введением в культуру *in vitro*; *c* – рост зародыша, 0,6%-ный агар, 40 сут; *d* – прорастание семени через 60 сут, MS; *e* – проростки на 0,6%-ном агаре, 60 сут; *f* – формирование зачаточной луковички, 0,6%-ный агар, 60 сут; *g* – корневые волоски, 0,6%-ный агар, 60 сут. Автор фото: Д.С. Мурасева

[**Fig. 2.** *In vitro* germination of *Fritillaria meleagroides* seeds at 23±2°C under continuous darkness: *a* - Immature fruit; *b* - Seed before *in vitro* culture initiation; *c* - Growth of the embryo, 0.6% water agar, 40 days; *d* - Germination of the seed after 60 days, MS medium; *e* - Seedlings on 0.6% water agar, 60 days; *g* - Formation of the bulb primordium, 0.6% water agar, 60 days; *f* - Root hairs, 0.6% water agar, 60 days. Photos by DS Muraseva]

Через 60 сут предкультивирования число проросших семян в условиях холодной стратификации возросло до 20 и 27% на водном агаре и среде MS соответственно. Более длительный этап предкультивирования при 23±2°C индуцировал прорастание незрелых семян *F. meleagroides*, при этом на водном агаре всхожесть составила 66%, а на среде MS – 74%. Выявлено, что использование безгормональной среды MS более эффективно и позволяет получить высокие значения прорастания независимо от условий культивирования семян (см. табл. 1). Размер проростков, полученных из незрелых семян, – 3–6 см, в зоне гипокотилия проростка формировалась зачаточная лу-

ковичка (рис. 2, *d-f*), у 2 проростков наблюдали развитие корневых волосков (рис. 2, *g*). Семядольный лист имел зеленую окраску, его верхушка к этому моменту, как правило, еще не освободилась от семенной кожуры.

Таким образом, при использовании незрелых семян целесообразно проводить предкультивирование при  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , что сопровождается увеличением (почти в 2 раза) размеров зародыша через 40 сут и приводит к прорастанию 74% семян на среде MS через 60 сут предкультивирования, что более чем в 2,5 раза превышает этот показатель в сравнении с условиями стратификации.

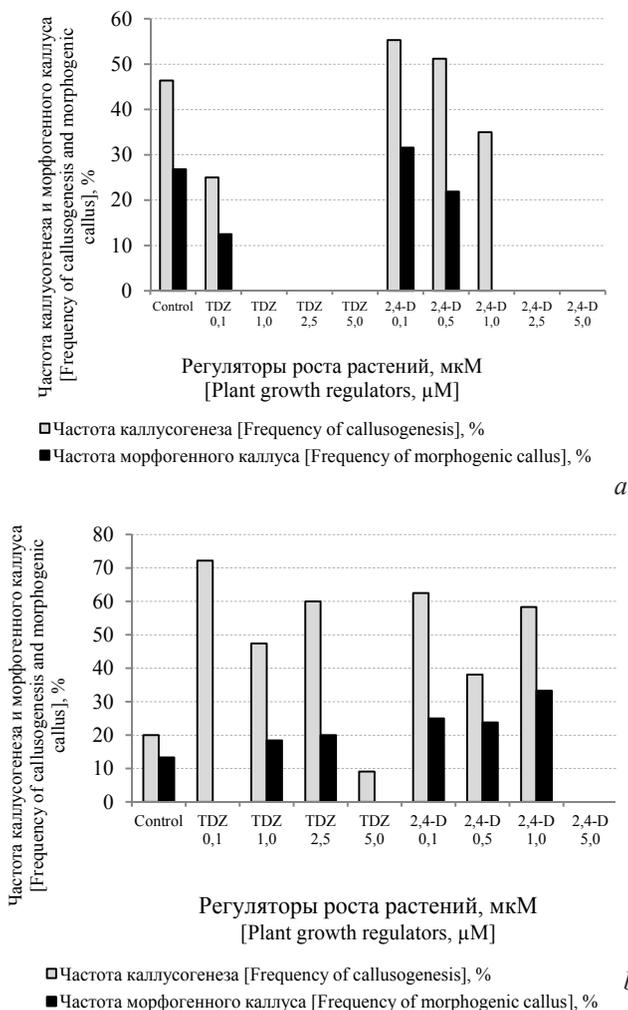
**Индукция морфогенеза.** Изолированные незрелые зиготические зародыши, а также базальные части проростков использовали для индукции морфогенеза (см. рис. 1). Индукцию морфогенеза проводили при  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  в темноте и в условиях фотопериода на средах, дополненных TDZ и 2,4-D.

Культивирование базальных частей проростков не сопровождалось регенерацией побегов *de novo*, наблюдали только гипергидратацию тканей луковички, формирование неморфогенного каллуса. Следовательно, использование в качестве эксплантов базальных частей проростков нецелесообразно. По этой причине в дальнейших исследованиях использовали только незрелые зиготические зародыши.

**Фотопериод.** Активный каллусогенез в условиях фотопериода с частотой более 50% отмечали на средах, дополненных 2,4-D в концентрации 0,1 и 0,5 мкМ (55 и 51% соответственно) (рис. 3). Однако доля морфогенного каллуса оказалась невысокой и не превышала 32% на фоне 0,1 мкМ 2,4-D. Формировалось два типа каллуса: неморфогенный плотный и морфогенный рыхлый зернистый. На поверхности морфогенного каллуса развивались полиморфные структуры – глобулярные выпячивания и единичные побеги (рис. 4, *a*). Максимальное количество глобулярных выпячиваний на поверхности каллуса получено на контрольной среде – 5,0 шт./экспл., минимальное на среде с 0,1 мкМ TDZ – 2,3 шт./экспл. (табл. 2). В целом использование TDZ в качестве индуктора каллусогенеза в условиях фотопериода оказалось неэффективным.

В условиях фотопериода, кроме формирования морфогенного каллуса в эмбриокультуре незрелых зиготических зародышей, наблюдали прямую регенерацию побегов *de novo* (рис. 4, *c*). Культивирование на безгормональной среде MS приводило к развитию в среднем 4,0 побега на эксплант с частотой регенерации 29%. Однако анализ процессов гомогенеза не выявил достоверных различий в количестве побегов, формирующихся на тестируемых питательных средах. Из табл. 3 видно, что значительно изменялась частота побегообразования: наибольший процент (40%) регенерации получен на среде MS, дополненной 1,0 мкМ 2,4-D. Этот показатель увеличивался при повышении концентрации 2,4-D до 1,0 мкМ и значительно снизился вплоть до полного отсутствия регенерации при более высоких значениях. Это указывает на ингибирующее действие высоких концентраций

2,4-D на процессы прямой регенерации в эмбриокультуре *F. meleagroides*, что прослеживается и при других обработках.



**Рис. 3.** Каллусогенез в эмбриокультуре незрелых зиготических зародышей *Fritillaria meleagroides* в условиях фотопериода (a) и темноты (b), питательная среда MS, дополненная регуляторами роста: Control – контроль, безгормональная среда MS [Fig. 3. Callusogenesis in immature zygotic embryo culture of *Fritillaria meleagroides* under a photoperiod (a) and continuous darkness (b), MS nutrient medium supplemented with growth regulators. On the X-axis - Plant growth regulators, μM; on the Y-axis - Frequency of callusogenesis and morphogenic callus, %: Control - hormone-free MS medium]

Среды, дополненные TDZ, не вызывали некроз тканей эксплантов, но и не стимулировали процессы гомогенеза *in vitro*. Исключение составляет концентрация 0,1 мкМ TDZ: на данной среде на поверхности эксплантов

наблюдали микролуковички, а также глобулярные выпячивания, которые в дальнейшем давали начало побегам. Необходимо отметить, что для сред с TDZ характерны разрастание тканей экспланта и их гипергидратация, которая снижалась при концентрациях 2,5 и 5,0 мкМ. Разростающаяся ткань являлась неморфогенной (рис. 4, *b*).

Таблица 2 [Table 2]

**Число формирующихся глобулярных выпячиваний на поверхности морфогенного каллуса, питательная среда MS**  
**[Number of globular protuberances formed on the surface of morphogenic callus, MS nutrient medium]**

Регуляторы роста, мкМ [Growth regulators, μM]	Число глобулярных выпячиваний, шт./экспл. [Number of globular protuberances per explant]	
	Фотопериод [Photoperiod]	Темнота [Continuous darkness]
Контроль [Control]	5,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	1,5 ± 0,3 <sup>a</sup>
TDZ 0,1	2,3 ± 0,9 <sup>b</sup>	0
TDZ 1,0	0	3,6 ± 0,7 <sup>a</sup>
TDZ 2,5	0	2,7 ± 1,2 <sup>a</sup>
TDZ 5,0	0	0
2,4-D 0,1	2,8 ± 0,3 <sup>ab</sup>	3,5 ± 1,5 <sup>a</sup>
2,4-D 0,5	4,0 ± 1,0 <sup>ab</sup>	3,0 ± 0,4 <sup>a</sup>
2,4-D 1,0	0	4,5 ± 1,7 <sup>a</sup>
2,4-D 2,5	0	–
2,4-D 5,0	0	0

*Примечание.* «–» – нет данных. Значения, за которыми следуют разные буквы в одной колонке, статистически значимо различаются ( $p \leq 0,05$ ) в соответствии с тестом Дункана.  
 [Note. – No data. Values followed by different letters in the same column are significantly different ( $p \leq 0.05$ ) according to Duncan's test].

**Темнота.** В темноте каллусогенез удалось индуцировать при использовании более широкого диапазона концентраций регуляторов роста в сравнении с условиями фотопериода, но доля морфогенного каллуса, как и число глобулярных выпячиваний существенно не изменились (табл. 2). Значительно увеличилась частота каллусогенеза на среде с 0,1 мкМ TDZ: с 25% в условиях фотопериода до 72% в темноте, но формировался только неморфогенный каллус (см. рис. 3, *b*). В целом, в темноте развитие каллуса происходило на всех средах, содержащих TDZ, однако наблюдали снижение доли морфогенного каллуса в сравнении со средами, дополненными 2,4-D. Прямой зависимости частоты формирования каллуса от концентрации 2,4-D в условиях темноты не отмечено (см. рис. 3). На всех вариантах питательных сред морфогенный каллус имел схожую морфологию – светло-желтый рыхлый зернистый (рис. 4, *d*).

Таблица 3 [Table 3]

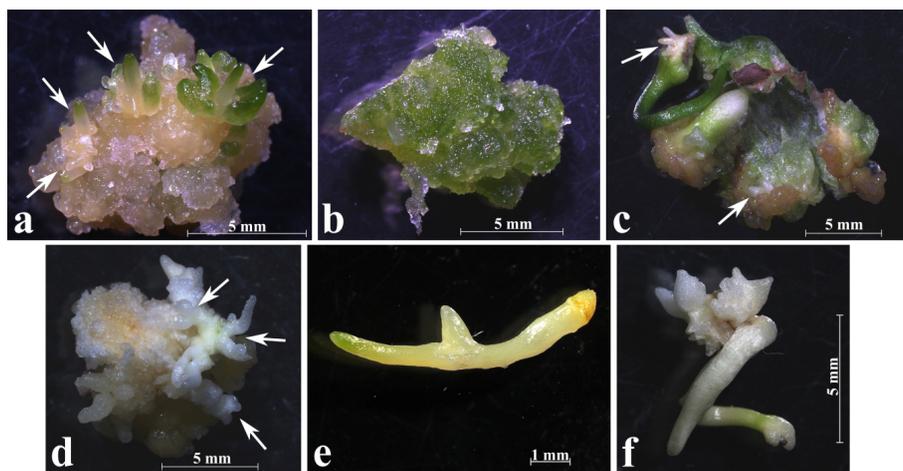
**Влияние условий культивирования на процесс прямого гомогенеза в культуре незрелых зиготических зародышей *Fritillaria meleagroides*, питательная среда MS**  
**[Effect of the culture condition on direct gemmogenesis process in immature zygotic embryo culture of *Fritillaria meleagroides*, MS nutrient medium]**

Регуляторы роста, мкМ [Growth regulators, μM]	Фотопериод [Photoperiod]		Темнота [Continuous darkness]	
	Частота регенерации [Regeneration rate], %	Число побегов, шт./экспл. [Shoot number per explant]	Частота регенерации [Regeneration rate], %	Число побегов, шт./экспл. [Shoot number per explant]
Контроль [Control]	29	4,0±0,4 <sup>a</sup>	0	0
TDZ 0,1	25	2,6±0,5 <sup>a</sup>	0	0
TDZ 1,0	0	0	11	2,3±0,9 <sup>a</sup>
TDZ 2,5	0	0	7	2,0 <sup>a</sup>
TDZ 5,0	0	0	0	0
2,4-D 0,1	21	3,9±0,6 <sup>a</sup>	38	4,0±1,2 <sup>b</sup>
2,4-D 0,5	29	2,8±0,2 <sup>a</sup>	24	3,6±0,6 <sup>ab</sup>
2,4-D 1,0	40	3,0±0,4 <sup>a</sup>	17	4,0±1,0 <sup>ab</sup>
2,4-D 2,5	12	4,0±1,0 <sup>a</sup>	–	–
2,4-D 5,0	0	0	0	0

*Примечание.* «–» – нет данных. Значения, за которыми следуют разные буквы в одной колонке, статистически значимо различаются ( $p \leq 0,05$ ) в соответствии с тестом Дункана. [Note. – No data. Values followed by different letters in the same column are significantly different ( $p \leq 0.05$ ) according to Duncan's test].

Процессы прямой регенерации в условиях темноты отличались меньшей активностью в сравнении с фотопериодом и зависели, в первую очередь, от регуляторов роста. Так, использование безгормональной среды оказалось неэффективным для индукции гомогенеза (табл. 3). Регенерация протекала на средах, дополненных 1,0 и 2,5 мкМ TDZ, однако частота регенерации не превышала 11%. При этом концентрация TDZ 0,1 мкМ, приводящая к регенерации побегов *de novo* на свету, не индуцировала этот процесс в темноте, как и контрольная среда. При культивировании в темноте эффективным для индукции прямого гомогенеза являлось использование 2,4-D (рис. 4, e–f). Наиболее результативными оказались низкие концентрации этого регулятора роста, максимальная регенерация получена при 0,1 мкМ – частота регенерации 38%, число адвентивных побегов 4,0 шт./экспл.

Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что на процессы не-прямой регенерации оказывало влияние совместное действие состава питательной среды и условий культивирования ( $p = 0,039$ ), тогда как по отдельности эти факторы не влияли на морфогенез в тканях каллуса (состав среды  $p = 0,071$ , условия культивирования  $p = 0,765$ ). Также выявлено, что гормональный состав питательной среды оказывает влияние на прямую регенерацию побегов ( $p = 0,029$ ), которая не зависела от физических условий культивирования ( $p = 0,277$ ) и комбинации этих факторов ( $p = 0,092$ ).



**Рис. 4.** Морфогенез в эмбриокультуре незрелых зиготических зародышей *Fritillaria meleagroides* (конец пассажа, питательная среда MS) в условиях фотопериода (a–c), в условиях темноты (d–f): a – непрямая регенерация побегов, безгормональная среда; b – неморфогенный каллус, 0,1 мкМ TDZ; c – прямая регенерация, 0,5 мкМ 2,4-D; d – морфогенный каллус, 2,5 мкМ 2,4-D; e – прямой геммогенез, 0,1 мкМ 2,4-D; f – адвентивное побегообразование, 1,0 мкМ TDZ. Автор фото Д.С. Мураева

**[Fig. 4.** Morphogenesis in immature zygotic embryo culture of *Fritillaria meleagroides* (the end of the passage, MS nutrient medium) under a photoperiod (a–c) and continuous darkness (d–f): a - Indirect shoot regeneration, hormone-free medium; b - Nonmorphogenic callus, TDZ 0.1 μM; c - Direct regeneration, 2,4-D 0.5 μM; d - Morphogenic callus, 2,4-D 2.5 μM; e - Direct gemmogenesis, 2,4-D 0.1 μM; f - Adventitious shoot formation, 2,4-D 1.0 μM. Photos by DS Muraseva]

Таким образом, установлено, что низкие концентрации (0,1–1,0 мкМ) 2,4-D оказывают наибольший стимулирующий эффект на процессы морфогенеза *in vitro* в культуре незрелых зиготических зародышей *F. meleagroides*. На данных вариантах питательных сред протекали активные процессы как прямой регенерации, так непрямой, проходящие через промежуточную стадию каллусообразования, при этом развития проростка не происходило. Общим в индукции морфогенеза при различных условиях являлось негативное воздействие высоких концентраций (5,0 мкМ) тестируемых регуляторов роста на процессы морфогенеза.

### Обсуждение результатов исследования

Работы по использованию незрелых семян геофитов единичны. При этом известно, что использование незрелых семян позволяет избежать физиологический механизм торможения прорастания, проявляющийся на более поздних этапах развития семени. Первое сообщение, посвященное культивированию незрелых зародышей, принадлежит коллективу S. Mirici с соавторами, которые предложили протокол для размножения *Sternber-*

*gia fischeriana* (Herbert) Rupr. [16]. В работе с *S. fischeriana* использовали незрелые зиготические зародыши размером около 1 мм, которые культивировали с помощью двух различных протоколов. В первом протоколе пассировали на среде MS, дополненной БАП и НУК в различных концентрациях; во втором – на среде N6, содержащей 2,0 мг/л 2,4-D, а также L-пролина и казеин гидролизат. При этом на среде MS, содержащей 4,0 мг/л БАП и 0,25 мг/л НУК, через 3–4 мес культивирования на каллусе формировались побеги, а на среде N6 с добавлением 2,0 мг/л 2,4-D – соматические эмбриониды [16]. Положительный результат получен при использовании данного подхода как основы при культивировании незрелых зиготических зародышей *F. alburyana* Rix и *F. whittallii* Baker [17]. Система микроразмножения с использованием незрелых зародышей приведена для *F. tubaeformis* Grenier et Godron [18]. Исследователи инкубировали незрелые семена на 1% агаре при 4°C в темноте в течение 30, 60 и 90 сут (холодная стратификация). После предобработки извлекали незрелые зиготические зародыши и высаживали их на среду MS, дополненную БАП и НУК, для индукции регенерации и процессов соматического эмбриогенеза. Отмечено, что зародыши достигают максимальных размеров (до 3,0 мм) после 60 сут холодной стратификации, а через 90 сут подвергаются некрозу. На индукцию соматического эмбриогенеза оказывала влияние длительность этапа холодной стратификации и не влияли состав питательных сред и комбинация этих факторов. Исследователи отмечают, что прорастание семян наступало только через 3 мес культивирования при 4°C, при этом низкие температуры вызывали незамедлительный рост клеток зиготического зародыша [18].

Схема, предложенная V. Carasso и M. Mucciarelli для культивирования *F. tubaeformis* [18] и используемая нами в модифицированном виде в качестве основы, позволила индуцировать прорастание незрелых семян *F. meleagroides* уже на 40-е сут предкультивирования в условиях холодной стратификации. Установлено, что предкультивирование незрелых семян при  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  приводит к прорастанию 74% семян к завершению второго месяца пассирования и исключает этап холодной стратификации. При этом более эффективно культивирование на безгормональной среде MS в сравнении с 0,6%-ным агаром. Так как изначальный размер незрелых зародышей *F. meleagroides* очень мал, что затрудняет извлечение зародыша без повреждений, негативно отражающихся на развитии *in vitro*, необходим период предкультивирования. Доразвивание зародыша на этапе предкультивирования семян снижает риск его повреждения при изоляции и повышает выживаемость зародышей при культивировании *in vitro*. Выявлено, что использование сред, дополненных экзогенными регуляторами роста, стимулировало процессы морфогенеза в тканях незрелых зиготических зародышей и не оказывало эффекта на регенерацию в культуре базальных частей проростков *F. meleagroides*.

Можно выделить три преимущества эмбриокультуры незрелых зиготических зародышей, подтвержденных в нашем исследовании. Во-первых, за-

родыши, изолированные из стерильных семян, лишены микробной и грибной контаминации. Во-вторых, незрелые зиготические зародыши обладают высоким регенерационным потенциалом в течение длительного времени [18, 19], что объясняется большим количеством проэмбриогенных (меристематических) клеток [20]. И, в-третьих, использование семенного потомства значительно повышает генетическое разнообразие сохраняемых в культуре *in vitro* редких видов растений.

### Заключение

Таким образом, использование незрелых семян *Fritillaria meleagroides* позволяет ускорить процесс развития зародыша в условиях *in vitro*. Начало роста незрелого зародыша отмечается уже через 8 сут после введения в культуру ткани, а через 40 сут зародыш увеличивается почти вдвое при культивировании при  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . При этом отпадает необходимость в длительной холодной стратификации семян. Установлена эффективность эмбриокультуры незрелых зиготических зародышей, изолированных из семян после предкультивирования, для индукции прямой и непрямой регенерации на фоне низких (0,1–1,0 мкМ) концентраций 2,4-D. Однако дальнейшее повышение концентрации 2,4-D (до 2,5 и 5,0 мкМ) приводило к некрозу тканей эксплантов. В тканях базальных частей проростков регенерационные процессы не протекали. Использование незрелых семян для введения в культуру *in vitro* редкого вида *F. meleagroides* позволяет оптимизировать процесс размножения редких и эндемичных видов рябчиков, а также обеспечить высокую видовую репрезентативность при создании коллекции *in vitro*.

*При подготовке публикации использовались материалы УНУ «Коллекция живых растений в открытом и закрытом грунте», USU\_440534.*

### Литература

1. Plant conservation biotechnology. Benson E.E., ed. London; Philadelphia P.A. : Taylor & Francis, 1999. 309 p.
2. Paek K.Y., Murthy H.N. High frequency of bulblet regeneration from bulb scale sections of *Fritillaria thunbergii* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2002. Vol. 68. PP. 247–252.
3. Эрст А.А., Эрст А.С., Шауло Д.Н., Кульханова Д.С. Сохранение и размножение *in vitro* редких видов рода *Fritillaria* (Liliaceae) // Растительный мир Азиатской России. 2014. № 1 (13). С. 64–70.
4. Muraseva D.S., Novikova T.I. Efficient protocol for *in vitro* propagation from bulb scale explants of *Fritillaria ruthenica* Wikstr. (Liliaceae), a rare ornamental species // Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali. 2018. Vol. 29. PP. 491–497. doi: [10.1007/s12210-018-0693-8](https://doi.org/10.1007/s12210-018-0693-8)
5. 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. Vol. 31. PP. 833–838. doi: [10.1007/s11738-009-0299-y](https://doi.org/10.1007/s11738-009-0299-y)

6. Liu X.M., Yang G.C. Adventitious shoot regeneration of oriental lily (*Lilium orientalis*) and genetic stability evaluation based on ISSR marker variation // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2012. Vol. 48. PP. 172–179. doi: [10.1007/s11627-012-9429-0](https://doi.org/10.1007/s11627-012-9429-0)
7. Benson E.E., Danaher J.E., Pimbley I.M., Anderson C.T., Wake J.E., Daley S., Adams L.K. *In vitro* micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant // *Biodiversity and Conservation*. 2000. Vol. 9. PP. 711–726.
8. Bhojwani S.S., Dantu P.K. *Plant tissue culture : An introductory text*. New Delhi : Springer, 2013. 309 p. doi: [10.1007/978-81-322-1026-9](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9)
9. Железниченко Т.В., Новикова Т.И. Влияние аскорбиновой кислоты и глутатиона на индукцию соматического эмбриогенеза *Picea pungens* Engelmann // *Turczaninowia*. 2017. № 20 (3). С. 27–35. doi: [10.14258/turczaninowia.20.3.4](https://doi.org/10.14258/turczaninowia.20.3.4)
10. Поздова Л.М., Разумова М.В. Покой семян. Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / под ред. Т.Б. Батыгиной. СПб. : Мир и семья, 1997. С. 656–667.
11. Николаева М.Г., Лянгузова И.В., Поздова Л.М. Биология семян. СПб. : НИИ химии СПбГУ, 1999. 232 с.
12. Carasso V., Hay F.R., Probert R.J., Mucciarelli M. Temperature control of seed germination in *Fritillaria tubiformis* subsp. *moggridgei* (Liliaceae) a rare endemic of the South-West Alps // *Seed Science Research*. 2011. Vol. 21. PP. 33–38. doi: [10.1017/S0960258510000310](https://doi.org/10.1017/S0960258510000310)
13. Ветчинкина Е.М., Ширнина И.В., Ширнин С.Ю., Молканова О.И. Сохранение редких видов растений в генетических коллекциях *in vitro* // *Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Естественные и медицинские науки*. 2012. Вып. 7. С. 109–118.
14. Красная книга Новосибирской области / Департамент природных ресурсов и охраны окружающей среды Новосибирской области. 2-е изд. Новосибирск : Арта, 2008. 528 с.
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15. PP. 473–497.
16. Mirici S., Parmaks I., Ozcan S., Sancak C., Uranbey S., Sarhan E.O., Gumuscu A., Gurbuz B., Arslan N. Efficient *in vitro* bulblet regeneration from immature embryos of endangered *Sternbergia fischeriana* // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2005. Vol. 80. PP. 239–246.
17. Özcan S., Parmaksız I., Mirici S., Cocu S., Uranbey S., Ipek A., Sancak C., Sarhan E.O., Gurbuz B., Sevimey C.S., Arslan N. Efficient *in vitro* bulblet regeneration from immature embryos of endemic and endangered geophyte species in *Sternbergia*, *Muscari* and *Fritillaria* genera / Z. Xu, J. Li, Y. Xue, W. Yang, eds. *Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond*. Dordrecht, The Netherlands : Springer, 2007. PP. 381–383.
18. Carasso V., Mucciarelli M. *In vitro* bulblet production and plant regeneration from immature embryos of *Fritillaria tubiformis* Gren. & Godr. // *Propagation of Ornamental Plants*. 2014. Vol. 14 (3). PP. 101–111.
19. Elhiti M., Stasolla C. The use of zygotic embryos as explants for *in vitro* propagation: an overview // *Plant Embryo Culture. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. T.A. Thorpe, E.C. Yeung, eds. Vol. 710. New Delhi, India : Humana Press, 2011. PP. 229–255. doi: [10.1007/978-1-61737-988-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-61737-988-8_17)
20. Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплант // *Физиология и биохимия культурных растений*. 2009. Т. 41, № 2. С. 124–131.

Поступила в редакцию 06.09.2018 г.; повторно 15.11.2018 г.;  
принята 27.11.2018 г.; опубликована 27.12.2018 г.

**Авторский коллектив:**

**Мурасева Динара Серыкбаевна** – канд. биол. наук, м.н.с. лаборатории биотехнологии, Центральный Сибирский ботанический сад (Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101).

E-mail: [dsmuraseva@csbg.nsc.ru](mailto:dsmuraseva@csbg.nsc.ru)

**Новикова Татьяна Ивановна** – д-р биол. наук, зав. лабораторией биотехнологии, Центральный Сибирский ботанический сад (Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101).

E-mail: [tin27@mail.ru](mailto:tin27@mail.ru)

**For citation:** Muraseva DS, Novikova TI. *In vitro* culture initiation using immature seeds of a rare species *Fritillaria meleagroides* Patr. ex Schult. et Schult. fil. (Liliaceae). *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2018;44:172-187. doi: [10.17223/19988591/44/10](https://doi.org/10.17223/19988591/44/10) In Russian, English Summary

**Dinara S. Muraseva, Tatyana I. Novikova**

*Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*

***In vitro* culture initiation using immature seeds of a rare species  
*Fritillaria meleagroides* Patr. ex Schult. et Schult. fil. (Liliaceae)**

*Fritillaria meleagroides* Patr. ex Schult. et Schult. fil. is a perennial herbaceous ephemeral bulbous plant. The importance of the natural flora biodiversity conservation has determined the interest in development of culture protocols of this rare species. The aims of the present study were to identify optimal conditions for immature seeds cultivation as primary explants and to induce the morphogenesis from immature zygotic embryo tissue and seedlings of *F. meleagroides*.

We collected immature fruits from plants of the natural population located in Novosibirsk Oblast, Toguchin Region, the Izyli River floodplain (55°10'21.8"N, 84°34'54.8"E). The fruits were sterilized by immersion into 15% aqueous solution of "Domestos" for 20 min. The scheme of the experiment is shown in Figure 1. We precultivated immature seeds for 40 or 60 days under continuous darkness on 0.6% water agar or hormone-free MS medium. Two temperature regimes - 4 °C and 23±2 °C were tested. Morphogenesis from immature zygotic embryo tissue and the basal part of seedlings was induced under a 16-h photoperiod or continuous darkness at 23±2 °C on MS medium supplemented with thidiazuron (TDZ) or 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) at a concentration of 0.1-5.0 µM. Hormone-free MS medium was applied as a control. The passage at this stage lasted for 60-75 days. We evaluated the frequency of callusogenesis (%), regeneration rate (%) and the number of protuberances or shoots per explant at the end of the passage at the morphogenesis induction stage.

We observed seed germination with a rate of 21% after 40 days of precultivation at cold stratification, whereas at 23±2 °C germination was not recorded (See Table 1). After 60 days of precultivation, the germination rate at cold stratification achieved 27%, at the same time 74% of seeds were germinated on hormone-free MS medium at 23±2 °C (See Fig. 2). We found that using the basal parts of seedlings was not effective at the induction stage. Two types of callus formed from zygotic embryo tissue under a photoperiod: dense nonmorphogenic and friable granular morphogenic (See Fig. 3 and 4). The maximum number of globular protuberances developed on callus was obtained on the control medium; the minimum was on MS supplemented with TDZ 0.1 µM (See Table 2). We also observed direct shoot regeneration in immature zygotic embryo culture. The largest rate (40%) of adventitious shoot formation was achieved on MS medium with 2,4-D 1.0 µM, but the regeneration rate decreased significantly at higher

concentrations (See Table 3). Cultivation on the media supplemented with TDZ resulted in the absence of direct gemmogenesis without necrosis processes. Under continuous darkness, the callus formed more actively, but morphogenic callus and the number of globular protuberances did not change significantly (See Table 2). Low concentrations of 2,4-D were more efficient for induction of the direct regeneration: the maximum of shoot regeneration rate (38%) with 4.0 of adventitious shoot on the average per explant was obtained at 0.1  $\mu\text{M}$ . Thus, we established the effectiveness of using immature zygotic embryo isolated from seeds after precultivation to induce direct and indirect shoot regeneration. The need for a long cold stratification of seeds was eliminated.

*The paper contains 4 Figures, 3 Tables and 20 References.*

**Key words:** *Fritillaria*; immature zygotic embryos; embryo culture; morphogenesis; cold stratification.

**Funding:** The work was partly supported by the Budgetary Project of the Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences “Assessment of morphogenetic potential of North Asian plant populations by experimental methods” (No AAAA-A17-117012610051-5) and the Russian Foundation for Basic Research (No 18-34-00164\18).

**Acknowledgement:** We used the material from the collection of the Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences – USU\_440534 “Collection of living plants indoors and outdoors”.

## References

1. Plant conservation biotechnology. Benson EE, editor. London; Philadelphia PA: Taylor & Francis Publ.; 1999. 309 p.
2. Paek KY, Murthy HN. High frequency of bulblet regeneration from bulb scale sections of *Fritillaria thunbergii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2002;68:247-252.
3. Erst AA, Erst AS, Shaulo DN, Kulkhanova DS. Conservation and propagation *in vitro* of rare species *Fritillaria* (Liliaceae). *Rastitel'nyj Mir Aziatskoj Rossii = Plant Life of Asian Russia*. 2014;1(13):64-70. In Russian
4. Muraseva DS, Novikova TI. Efficient protocol for *in vitro* propagation from bulb scale explants of *Fritillaria ruthenica* Wikstr. (Liliaceae), a rare ornamental species. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*. 2018;29:491-497. doi: [10.1007/s12210-018-0693-8](https://doi.org/10.1007/s12210-018-0693-8)
5. Joshi SK, 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](https://doi.org/10.1007/s11738-009-0299-y)
6. Liu XM, Yang GC. Adventitious shoot regeneration of oriental lily (*Lilium orientalis*) and genetic stability evaluation based on ISSR marker variation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2012;48:172-179. doi: [10.1007/s11627-012-9429-0](https://doi.org/10.1007/s11627-012-9429-0)
7. Benson EE, Danaher JE, Pimbley IM, Anderson CT, Wake JE, Daley S, Adams LK. *In vitro* micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant. *Biodiversity and Conservation*. 2000;9:711-726.
8. Bhojwani SS, Dantu PK. Plant tissue culture: An introductory text. New Delhi: Springer Publ.; 2013. 309 p. doi: [10.1007/978-81-322-1026-9](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9)
9. Zheleznicenko TV, Novikova TI. Effect of ascorbic acid and glutathione on somatic embryogenesis induction in *Picea pungens* Engelm. *Turczaninowia*. 2017;20(3):27-35. doi: [10.14258/turczaninowia.20.3.4](https://doi.org/10.14258/turczaninowia.20.3.4) In Russian, English Summary
10. Pozdova LM, Razumova MV. Seed dormancy. In: *Embryology of flowering plants. Terminology and concepts*. Vol. 2 Seed. Batygina TB, editor. St. Petersburg: Mir & Sem'ya-95 Publ.; 1997. pp. 656-667.

11. Nikolaeva MG, Lyanguzova IV, Pozdova LM. *Biologiya semyan* [Seed Biology]. St. Petersburg: NII khimii SPbGU Publ.; 1999. 232 p. In Russian
12. Carasso V, Hay FR, Probert RJ, Mucciarelli M. Temperature control of seed germination in *Fritillaria tubiformis* subsp. *moggridgei* (Liliaceae) a rare endemic of the South-West Alps. *Seed Science Research*. 2011;21:33-38. doi: [10.1017/S0960258510000310](https://doi.org/10.1017/S0960258510000310)
13. Vetchinkina Y, Shirnina I, Shirnin S, Molkanova O. The preservation of rare plant species in and *in vitro* genetic collection. *Vestnik Baltiyskogo federal'nogo universiteta im. I. Kanta = IKBFU'S Vestnik. Ser. Natural and Medical Sciences*. 2012;7:109-118. In Russian
14. *Krasnaya kniga Novosibirskoy oblasti* [The Red Data Book of Novosibirsk Region]. Departament prirodnikh resursov i okhrany okruzhayushchey sredy Novosibirskoy oblasti [Department of natural resources and environmental protection of Novosibirsk region]. 2nd ed. Novosibirsk: Arta Publ.; 2008. 528 p. In Russian
15. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15:473-497.
16. Mirici S, Parmaks I, Ozcan S, Sancak C, Uranbey S, Sarhan EO, Gumuscu A, Gurbuz B, Arslan N. Efficient *in vitro* bulblet regeneration from immature embryos of endangered *Sternbergia fischeriana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2005;80:239-246.
17. Özcan S, Parmaksız I, Mirici S, Cocu S, Uranbey S, Ipek A, Sancak C, Sarihan EO, Gurbuz B, Sevimay CS, Arslan N. Efficient *in vitro* bulblet regeneration from immature embryos of endemic and endangered geophyte species in *Sternbergia*, *Muscari* and *Fritillaria* genera. In: *Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond*. Xu Z, Li J, Xue Y and Yang W, editors. Dordrecht, The Netherlands: Springer Publ.; 2007. pp. 381-383.
18. Carasso V, Mucciarelli M. *In vitro* bulblet production and plant regeneration from immature embryos of *Fritillaria tubiformis* Gren.&Godr. *Propagation of Ornamental Plants*. 2014;14(3):101-111.
19. Elhiti M, Stasolla C. The use of zygotic embryos as explants for *in vitro* propagation: an overview. In: *Plant Embryo Culture. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Vol. 710. Thorpe TA, Yeung EC, editors. New Delhi: Humana Press Publ.; 2011. pp. 229-255. doi: [10.1007/978-1-61737-988-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-61737-988-8_17)
20. Kruglova NN, Katasonova AA. Immature wheat embryo as the morphogenetically competent explant. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rasteniy = Plant Physiology and Genetics*. 2009;41(2):124-131. In Russian

Received 06 September 2018; Revised 15 November 2018;

Accepted 27 November 2018; Published 27 December 2018

**Author info:**

**Muraseva Dinara S**, Cand. Sci. (Biol.), Junior Researcher, Laboratory of Biotechnology, Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 101 Zolotodolinskaya Str., Novosibirsk 630090, Russian Federation.

E-mail: [dsmuraseva@csbg.nsc.ru](mailto:dsmuraseva@csbg.nsc.ru)

**Novikova Tatyana I**, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Biotechnology, Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 101 Zolotodolinskaya Str., Novosibirsk 630090, Russian Federation.

E-mail: [tin27@mail.ru](mailto:tin27@mail.ru)