

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕМПЕРАТУРНЫХ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ СЕМЯН ТРОПИЧЕСКИХ ОРХИДНЫХ НА ПРИМЕРЕ *EULOPHIA STREPTOPETALA* И *STANHOPEA TIGRINA*

© 2022

Макарова А.Е., Сырова В.В., Половинкина Е.О., Широков А.И.*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского
(г. Нижний Новгород, Российская Федерация)*

Аннотация. В статье представлены результаты исследования оптимизации температурного режима для хранения семян тропических орхидей на примере *Eulophia streptopetala* Lindley и *Stanhopea tigrina* Batem ex Lindl. Зрелые семена замораживались при температурах -18°C , -40°C или -80°C на срок 1, 3, 6 или 12 месяцев, контролем служила температура хранения $+4^{\circ}\text{C}$. До и после заморозки определяли жизнеспособность семян визуальным и тетразольным методами. После разморозки проводили посев семян и культивирование выросших из них растений на питательной агаризованной асимбиотической среде, далее фиксировали динамику развития растений, проводили количественное определение содержания пигментов фотосинтеза (хлорофилла и каротиноидов). Анализ полученных данных показал, что жизнеспособность семян существенно снижается после хранения, в том числе в условиях отрицательных температур. В то же время у экспериментальных групп растений сокращались сроки ранних онтогенетических состояний и увеличивалась скорость роста протокормов. Заморозка семян вызывала в дальнейшем перестройку фотосинтетического аппарата. Оптимальными температурами для хранения семян вида *Eulophia streptopetala* оказалась температура $+4^{\circ}\text{C}$, а для *Stanhopea tigrina* -80°C и -40°C .

Ключевые слова: Orchidaceae; семена; воздействие низких температур; криосохранение; культивирование *in vitro*; протокорм; жизнеспособность семян; пигментный состав.

TEMPERATURE CONDITIONS OPTIMIZATION FOR STORING TROPICAL ORCHID SEEDS ON THE EXAMPLE OF *EULOPHIA STREPTOPETALA* AND *STANHOPEA TIGRINA*

© 2022

Makarova A.E., Syrova V.V., Polovinkina E.O., Shirokov A.I.*National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod (Nizhny Novgorod, Russian Federation)*

Abstract. The paper presents the results of the study of temperature regime optimization for storing seeds of tropical orchids on the example of *Eulophia streptopetala* Lindley and *Stanhopea tigrina* Batem ex Lindl. Mature seeds were frozen at temperatures of -18°C , -40°C or -80°C for a period of 1, 3, 6 or 12 months, the storage temperature was $+4^{\circ}\text{C}$. Before and after freezing, the viability of seeds was determined by visual and tetrazole methods. After defrosting, the seeds were sown and the plants grown from them were cultivated on a nutrient asymmetric medium, then the dynamics of plant development was recorded, the content of photosynthesis pigments (chlorophyll and carotenoids) was quantified. The analysis of the data obtained showed that the viability of seeds significantly decreases after storage, including in conditions of low temperatures. At the same time, in experimental groups of plants, the terms of early ontogenetic states were shortened, and the growth rate of protocorms increased. Freezing of seeds caused further restructuring of the photosynthetic apparatus. The optimal temperatures for storing seeds of the species *Eulophia streptopetala* were $+4^{\circ}\text{C}$, and for *Stanhopea tigrina* -80°C and -40°C .

Keywords: Orchidaceae; seeds; exposure to low temperatures; cryopreservation; *in vitro* propagation; protocorm; seed viability; pigment composition.

Введение

Орхидные – одно из крупнейших семейств покрытосеменных растений во всем мире. Описано около 736 родов и 28 тыс. видов, широко распространенных в большинстве наземных экосистем, особенно в тропиках [1, р. 237; 2]. Человеческая деятельность и глобальные экологические изменения повышают угрозу исчезновения орхидей в их естественной среде обитания [3, с. 38; 4, с. 273; 5, р. 185]. В настоящее время активно разрабатываются биотехнологические методы сохранения генофонда, а также микрочлонального размножения, которые, с одной стороны, способствуют сохранению редких видов и восстановлению численности их природных популяций, с другой стороны, позволяют внедрить орхидные в коммерческое производство и садоводство [6, р. 682–683; 7, с. 750].

Наиболее удобная для хранения часть растений – семена, которые содержат уникальный набор генов. Однако сохранение в семенной форме подходит не для всех видов растений. Это относится к растениям, не имеющим семян и размножающимся вегетативно, видам, которые имеют как стерильные генотипы, так и генотипы, дающие ортодоксальные семена, и видам с семенами, которые нельзя высушить до достаточно низкого уровня влажности, чтобы обеспечить их длительное хранение [8, р. 427]. Большинство видов орхидей имеет ортодоксальные семена, и содержание влаги в зрелых семенах орхидей обычно составляет менее 13% [9, р. 122]. Проблема надежного и длительного сохранения ценного генофонда на данный момент решается путем хранения семян, клеток и микроорганов в жидком азоте [10], но данный метод требует специального оборудования, за-

трат, а также не лишен некоторых рисков [11, с. 6–7]. Поэтому существует и альтернатива: сохранение генофонда в условиях вечной мерзлоты [11, с. 8; 12, с. 241; 13, с. 151]. Однако неизвестно, подходят ли данные методы хранения семян для тропических орхидных [10].

Цель данной работы: определение оптимального температурного режима хранения семян орхидных в диапазоне низких температур, анализ влияния температур и сроков хранения на прорастание семян и дальнейший ход ранних стадий онтогенеза на примере *Eulophia streptopetala* Lindley и *Stanhopea tigrina* Batem ex Lindl.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили семена тропических орхидей *Eulophia streptopetala* Lindley и *Stanhopea tigrina* Batem ex Lindl. Семена для эксперимента были предоставлены Ботаническим садом Института биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского, где оба вида успешно культивируются.

Eulophia – один из крупных родов семейства орхидных, насчитывающий более 200 видов, распространенных в тропических и субтропических регионах мира [14, р. 9]. *Eulophia streptopetala* – растение высотой до 1,5 м с хорошо развитыми псевдобульбами. Листья ланцетные и ребристые, 50 мм длиной и 8 мм шириной. Соцветие многоцветковое. Чашелистики зеленые с коричневато-фиолетовыми пятнами внутри, лепестки ярко-желтые снаружи и бледно-кремовые внутри, шпорец пурпурно-красный [15, р. 264]. Семена *Eulophia*-типа имеют шаровидно-булавовидной формы, светло-коричневого цвета. Клетки семенной оболочки продолговатые, почти прямоугольные или даже изодиаметрические, свободного межклеточного пространства между ними не бывает. Межклеточный бордюр не имеет складчатых кутикулярных утолщений, в углах между клетками могут присутствовать впадинки в форме 3-лучевых звездочек. Характерной особенностью семян *Eulophia*-типа является наличие утолщений на пери- и антиклинальных клеточных стенках [16, с. 208].

Род *Stanhopea* насчитывает около 50 видов [17, р. 610]. *Stanhopea tigrina* – эпифитное или литофитное растение, эндемичное для Мексики и распространенное в Восточной Сьерра-Мадре [18, р. 250]. Семена *Stanhopea*-типа, средние размеры $592 \pm 62 \times 356 \pm 44$ мкм. Форма семян шаровидная, внезапно сужающаяся в довольно узкую короткую трубку на микропиллярном конце. Семенная оболочка прозрачная, бесцветная, тонкая, зародыш светло-желтый, почти округлый (соотношение длины и ширины 1,35). В расширенной части семенной оболочки клетки почти изометрические, многоугольные. Семена *Stanhopea tigrina* объемные, за счет большого значительного объема воздушного пространства (92,52%) [16, с. 215–216].

Перед началом эксперимента проводилась визуальная оценка семян с целью определения их пригодности в работе. Для исследования использовались зрелые сухие семена. Производилась выборка из 150 семян и при помощи микроскопа и программы eScore подсчитывалась средняя длина и ширина семян, а также наличие или отсутствие зародыша. При наличии зародыша также измерялась его длина.

При температурах -18°C , -40°C , -80°C семена замораживали в пластиковых пробирках, объемом

1,5 мл на срок 1, 3, 6 или 12 месяцев. Контролем являлись семена, хранившиеся при $+4^{\circ}\text{C}$. По истечении срока семена извлекали из холодильника и размораживали при комнатной температуре. После разморозки определялась жизнеспособность семян методом тетразольного окрашивания. Семена помещались в 0,5%-й водный раствор тетразола на 24 часа, после чего проводился подсчет процента семян с окрашенным зародышем [19; 20, с. 111] при помощи микроскопа Ломо МПС-1.

Для культивирования *Eulophia streptopetala* и *Stanhopea tigrina* использовали агаризованную питательную среду [21]. В течение месяца растения культивировались в условиях темноты при температуре $+10^{\circ}\text{C}$, после чего были перенесены на освещаемые стеллажи с температурой $+20^{\circ}\text{C}$ для дальнейшего культивирования. В ходе культивирования отмечались сроки смены стадий онтогенеза. На стадии протокорма высчитывалась динамика увеличения его площади. Для вычисления прогресса роста протокормов раз в неделю проводилась фотосъемка. Полученные фото обрабатывали в программе Adobe Photoshop CS3 для получения черно-белых изображений протокормов в битовом формате. Полученные фотографии анализировались при помощи программы Leafarea, которая позволяла подсчитать площадь протокома в условных единицах [22]. На ювенильной стадии (на 63-й неделе культивирования) проводился морфометрический анализ, включающий в себя замеры длины побега и количество листовых пластинок.

Также у ювенильных особей на 63-й неделе культивирования проводилось количественное содержание пигментов фотосинтеза. Содержание хлорофилла (Хл.) *a* и *b* и каротиноидов (Кар.) определяли с помощью спектрофотометра СФ2000, экстрагируя их 96% этиловым спиртом, и рассчитывали по формулам [23]:

$$C_{\text{Хл.а}} [\text{мг/л}] = 12,21 \times D_{663} - 2,81 \times D_{646};$$

$$C_{\text{Хл.б}} [\text{мг/л}] = 20,13 \times D_{646} - 5,03 \times D_{663};$$

$$C_{\text{Кар}} [\text{мг/л}] = (1000 \times D_{470} - 3,27 \times C_{\text{Хл.а}} - 100 \times C_{\text{Хл.б}}) / 229,$$

где D_{470} , D_{646} и D_{663} – оптическая плотность вытяжки при 470, 646 и 663 нм соответственно; C – концентрация пигмента в вытяжке, мг/л.

Установив концентрацию пигмента в вытяжке, определяли его содержание в исследуемой ткани с учетом объема вытяжки и массы пробы:

$$F [\text{мг/г сырой массы}] = (V \times C) / P,$$

где: F – содержание пигмента в растительном материале, мг/г сыр. массы; V – объем вытяжки, л; C – концентрация пигмента, мг/л; P – навеска растительного материала, г.

Рассчитали соотношение пигментов:

$$\text{Хл.а} / \text{Хл.б} \text{ и } (\text{Хл.а} + \text{б}) / \text{Кар.}$$

Результаты и их обсуждение

Перед замораживанием семян проводили определение морфометрических показателей семян и зародышей визуальным методом (табл. 1). Данный метод имеет погрешности, так как не все семена, имеющие зародыши, могут быть жизнеспособны.

Таблица 1 – Морфометрические показатели исследуемых семян перед заморозкой

Параметр	<i>Eulophia streptopetala</i>	<i>Stanhopea tigrina</i>
Средняя длина семян ($M \pm m$), мм	$0,98 \pm 0,14$	$0,78 \pm 0,1$
Средняя ширина семян ($M \pm m$), мм	$0,34 \pm 0,05$	$0,35 \pm 0,06$
Средняя длина зародыша ($M \pm m$), мм	$0,37 \pm 0,08$	$0,28 \pm 0,04$
Доля жизнеспособных семян, %	75	92

После хранения при различных температурах и разморозки семян проводили окраску тетразольным методом. Размороженные семена визуально не отличались от контрольных.

Семена *Eulophia streptopetala* после заморозки имели меньший процент жизнеспособных семян, чем контрольная группа, хранившаяся при $+4^{\circ}\text{C}$ (рис. 1). Спустя год хранения процент жизнеспособных семян контрольной группы снизился на 31,3%, а у группы, хранившейся при -80°C , на 34%. Больше всего показатель жизнеспособности семян снизился у группы, хранившейся при -18°C (на 55,3%).

Семена *Stanhopea tigrina* после заморозки были более жизнеспособны, чем контрольная группа (рис. 2). Спустя год хранения семян наименьшее снижение жизнеспособности семян (на 7%) наблюдалось у группы, хранившейся при температуре -80°C , в то время как у контрольной группы семян жизнеспособность снизилась на 22%.

При культивировании, вне зависимости от температурных условий хранения семян, набухание происходило у всех групп растений одновременно. У *Eulophia streptopetala* на 7-й неделе, у *Stanhopea tigrina* на 6-й неделе культивирования. Формирование протокорма у всех экспериментальных групп происходило на 10-й неделе культивирования у *Eulophia streptopetala* и 7–8-й неделе у *Stanhopea tigrina*. Это на 1–2 недели раньше, чем у контрольных групп (11-я и 9-я недели соответственно).

У *Eulophia streptopetala* формирование первого листа у особей из всех экспериментальных групп происходило на 58-й неделе культивирования, что на 1–2 недели раньше контроля (на 59–60-й неделе). У *Stanhopea tigrina* формирование первого листа происходило у контрольной группы на 17-й неделе, у растений из семян, хранившихся при температуре -80°C на 18-й неделе, а у растений из семян, хранившихся при температуре -18°C или -40°C на 19-й неделе.

Определение динамики увеличения площади протокормов проводилась только на протокормах *Eulophia streptopetala*, поскольку протокормы *Stanhopea tigrina* слишком малы для выбранной методики. Также это связано с тем, что протокормы данного вида быстро перешли в ювенильную стадию. Вне зависимости от условий заморозки у всех экспериментальных групп площадь протокормов превышала контроль. При хранении семян в течение месяца, из развившихся протокормов наибольшей динамикой роста обладали растения из группы -18°C . На 55-й неделе культивирования площадь протокормов составляла 151% по сравнению с контролем. При замо-

розке семян на 3 и 6 месяца, наибольший прирост площади протокормов наблюдался у группы -40°C и составил 127,1% и 165,8% соответственно. При заморозке на 12 месяцев (рис. 3) наибольшая площадь была у группы -80°C (140,3%).

Условия хранения семян не повлияло на количество и размеры листовых пластинок на стадии ювенильной стадии. Анализ количественного состава пигментов показал, что на ювенильной стадии (на 8-й неделе) у *Eulophia streptopetala* наблюдалось снижение количественного содержания хлорофиллов по сравнению с контролем. У растений из семян, хранившихся при температуре -18°C , количество хлорофиллов *a* и *b* снизилось до 64,1% и 46,5% соответственно. У группы -40°C – на 82,9% и 69%, у -80°C – на 76,8% и 54,1%. Количественное содержание каротиноидов преимущественно увеличивалось до 121,3%, 129,5% и 138% у групп -18°C , -40°C и -80°C соответственно (рис. 4). Соотношение хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* в группах -18°C и -80°C по отношению к контролю были повышены и достигали до 148,7% и 142,3% соответственно (рис. 5). В группе -40°C данный показатель был различен в зависимости от сроков хранения семян. Значительно снижалась доля хлорофиллов по отношению к каротиноидам, в группе -80°C до 62,4%.

У особей *Stanhopea tigrina* в стадии ювенильного побего (8 недель) наблюдалась иная картина. У всех экспериментальных групп повышается содержание хлорофиллов *a* и *b* (рис. 6). У группы -18°C до 143,3% и 189,7%, у -40°C – до 161,9% и 166,1%, у -80°C – 135,4% и 148,3%. Количественное содержание каротиноидов было так же увеличено: у группы -18°C до 150%, -40°C – 179,2%, -80°C – 186,1%. Доля хлорофиллов по отношению к каротиноидам у растений из группы -18°C возрастает до 155,3% (при сроке хранения 6 месяцев), но при более низких температурах хранения снижается (рис. 7).

Данные результаты исследования можно сравнить с рядом других, где были успешно проведены эксперименты по криосохранению семян орхидей, таких как *Calanthe vestita* Wall. ex Lindl., *Encyclia cochleata* (L.) Lemee [9, p. 122], *Anguloa clowesii* Lindl., *Dendrobium ochreatum* Lindl. [24, с. 178–179], *Angaecum magdalenae* Schltr. & H. Perrier, *Trichopilia tortilis* Lindl. [25, с. 932] и др. В нашем эксперименте, несмотря на хранение в условиях пониженных температур, жизнеспособность семян *Eulophia streptopetala* и *Stanhopea tigrina* существенно понижается. Выявлены различия сохранения жизнеспособности у разных видов тропических орхидей. Семена *Eulophia streptopetala*, хранившиеся при отрицательных температурах, утрачивали жизнеспособность быстрее, чем контрольная группа. Однако стоит отметить, что в экспериментальных группах чем ниже была температура заморозки, тем лучше сохранялась жизнеспособность семян. Можно предположить, что при еще более низких температурах (менее -80°C) можно добиться лучшей сохранности семян. Семена *Stanhopea tigrina* после заморозки были более жизнеспособны, чем контрольная группа. При этом чем ниже температура заморозки, тем лучше сохранялась жизнеспособность. Возможно, повреждающий эффект низких температур снижен для данного вида в связи с наличием более толстой оболочки и/или различной обводненностью семян этих видов. Таким образом, од-

ни и те же условия хранения могут по-разному влиять на семена различных видов. Также отмечено, что при длительном хранении семян интенсивность их

окрашивания снижается. Можно предположить, что семена, считавшиеся жизнеспособными, содержат повреждения или какие-либо другие изменения.

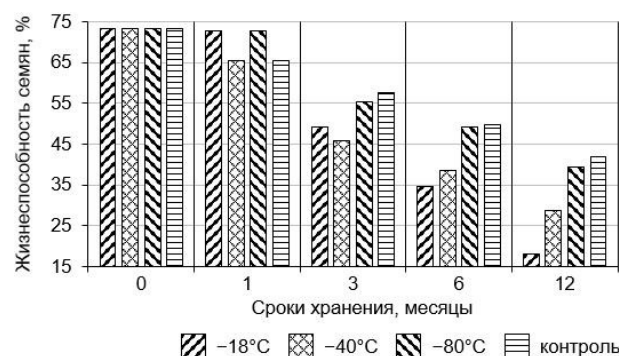


Рисунок 1 – Жизнеспособность семян *Eulophia streptopetala* после заморозки при разных температурных режимах, определенная тетразольным методом

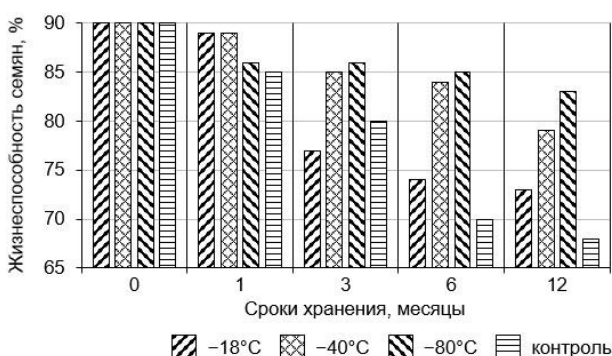


Рисунок 2 – Жизнеспособность семян *Stanhopea tigrina* после заморозки при разных температурных режимах, определенная тетразольным методом

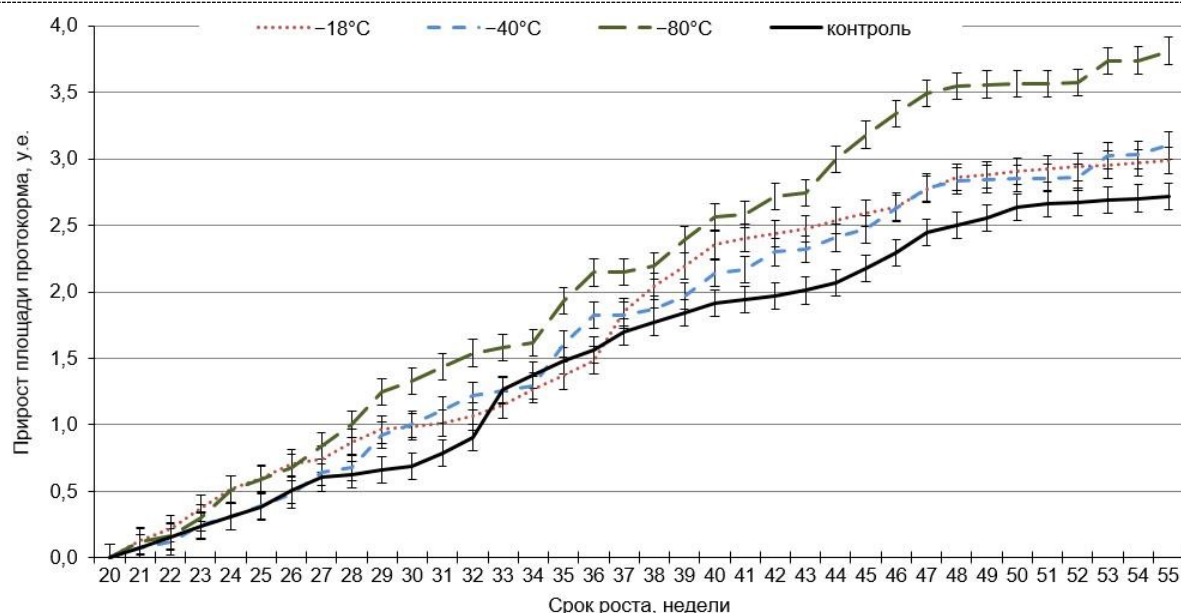


Рисунок 3 – Скорость прироста площади протокормов, развивавшихся из семян *Eulophia streptopetala* после 12 месяцев заморозки

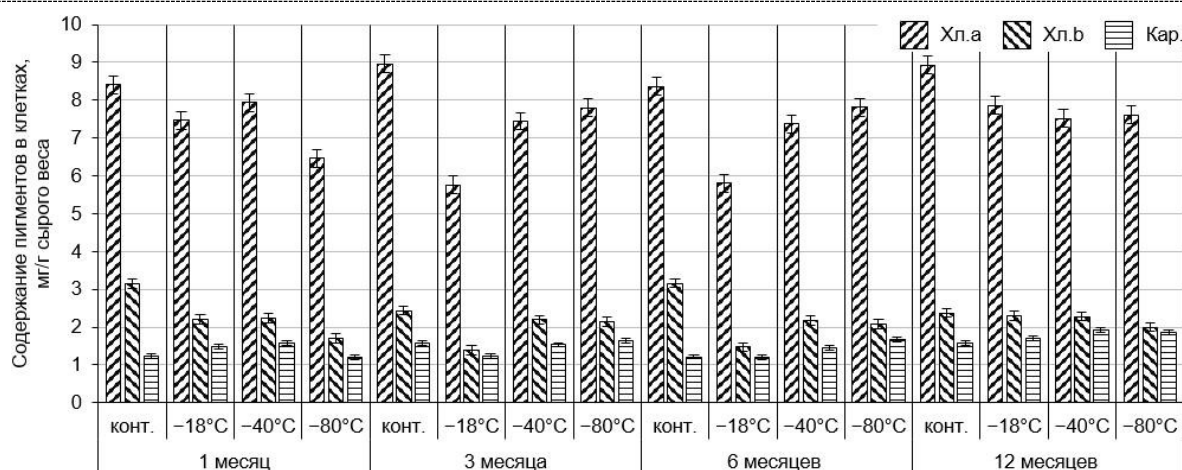


Рисунок 4 – Пигментный состав ювенильных растений *Eulophia streptopetala*, выращенных из семян, подвергшихся заморозке

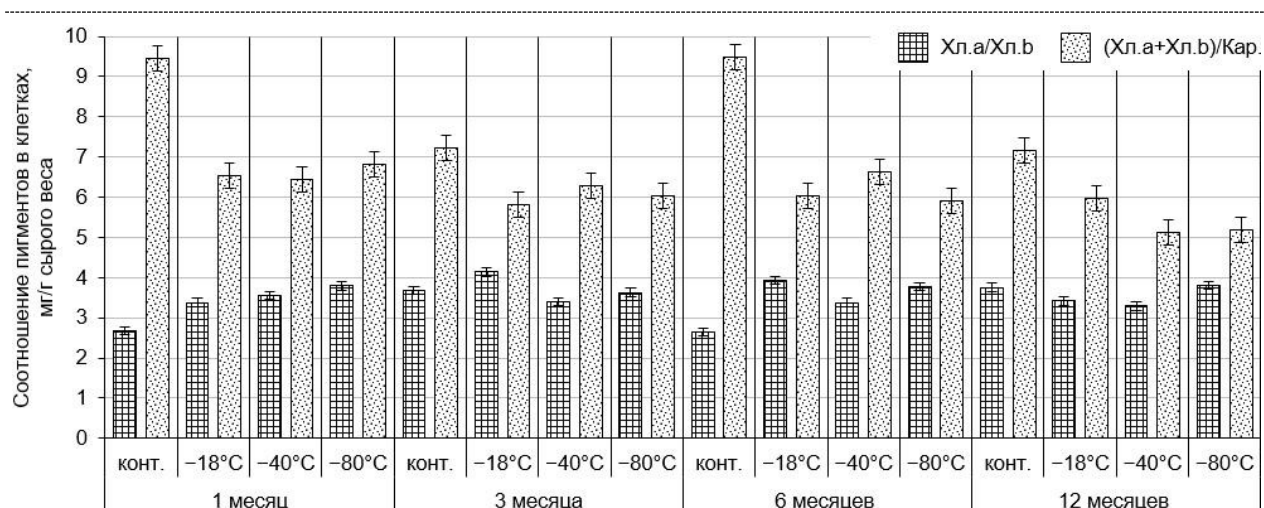


Рисунок 5 – Соотношение пигментов в ювенильных особях *Eulophia streptopetala* выросших из семян, подвергшихся заморозке при разных температурных режимах

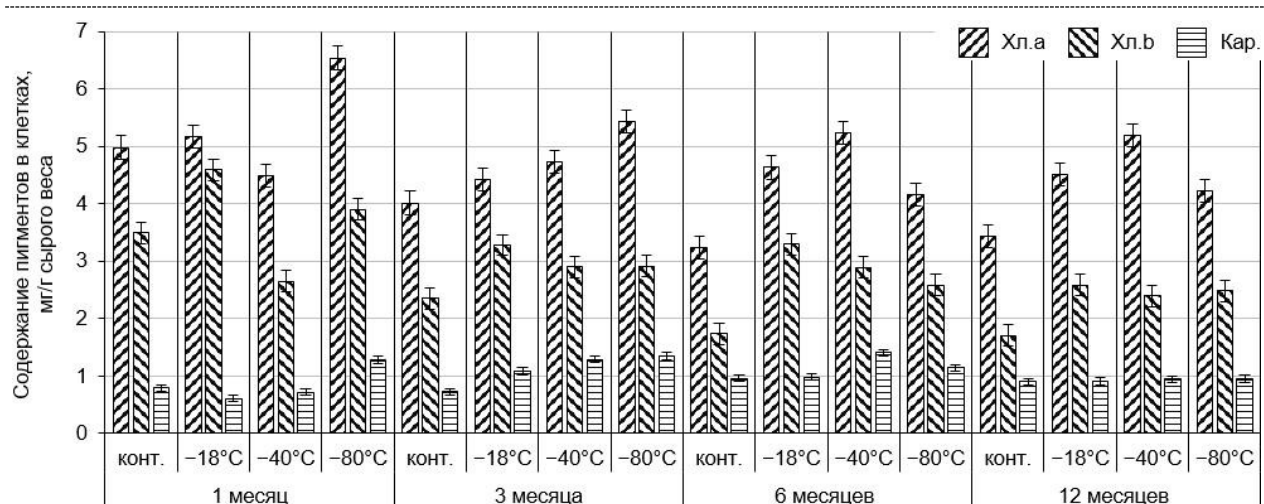


Рисунок 6 – Пигментный состав растений *Stanhopea tigrina* на стадии ювенильного растения, полученных из семян, подвергшихся заморозке

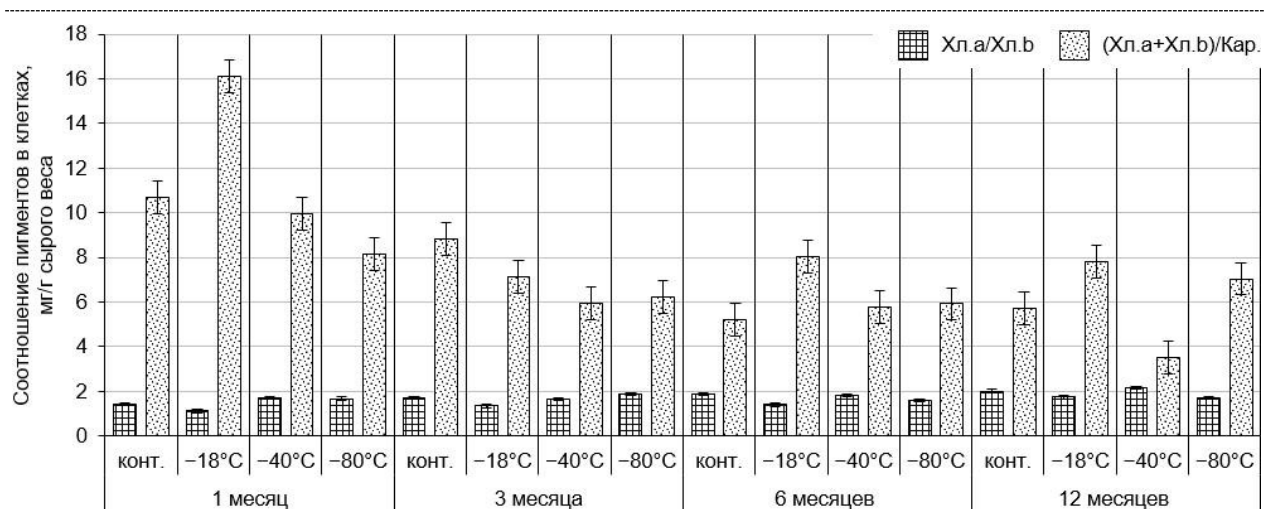


Рисунок 7 – Соотношение пигментов в клетках листа *Stanhopea tigrina* на стадии ювенильного растения, полученных из семян после воздействия различных температур

У обоих видов растений наблюдается сокращение сроков перехода растений в стадию протокорма (на 1–2 недели) по сравнению с контролем. Еще в работах Т.В. Никишиной [25] и А.С. Попова [26] предполагалось, что это было связано с изменением липидного состава мембран либо с механическим повреждением оболочки семян, что облегчает доступ к зародышу питательных веществ. Это объясняет и более интенсивное развитие протокормов (увеличение его размеров) в экспериментальных группах, по сравнению с контролем. Однако в экспериментах других исследователей данная закономерность наблюдалась не всегда. Например, протокормы *Angaecum magdalenae* и *Miltonia flavescentis* × *Brassia longissima*, развивавшиеся из семян, подвергшихся заморозке, первые 45 дней культивирования имели больший диаметр по сравнению с контрольной группой, а к 90-му дню культивирования замедлили свой рост и были мельче контроля. А у экспериментальных протокормов *Encyclia cochleata* изначально было замедленное развитие по сравнению с контрольной группой [25, с. 934]. Различия наблюдаются и в скорости образования ювенильного побега. В эксперименте с *Eulophia streptopetala* и *Stanhopea tigrina* у всех групп растений образование ювенильного побега происходит в один срок и морфометрически растения идентичны.

Пигменты играют большую роль в обеспечении продуктивности роста и используются как диагностический признак, по которому можно определить физиологическое состояние растений. На стадии ювенильного побега у *Eulophia streptopetala* количество хлорофилла в экспериментальных группах ниже, чем у контрольной группы растений. Это может свидетельствовать о некотором повреждении или изменении фотосинтетического аппарата. Возможно, хранение семян при низких температурах вызвало повреждение исключительно на формирование хлорофилла. Каротиноиды выполняют защитную функцию, поэтому при снижении количества хлорофилла возросла их необходимость для защиты растения от излишнего освещения. У растений *Stanhopea tigrina* на стадии ювенильного побега наблюдалась иная картина. Возрастает количество всех пигментов по отношению к контролю. Доля каротиноидов у группы растений, хранившихся при -18°C , была заметно меньше, чем у контрольной группы, но при более низкой температуре хранения увеличивалась. Таким образом, хранение семян при низких температурах приводило к перестройке фотосинтетического аппарата у растений в дальнейшем.

Выводы

Жизнеспособность семян *Eulophia streptopetala* существенно снижалась к 12-му месяцу хранения в условиях отрицательных температур, и лучшим показателем обладала контрольная группа. Примененные температурные условия оказались неэффективны для хранения семян данного вида, однако есть вероятность, что использование еще более низких температур может принести положительный результат.

Жизнеспособность семян *Stanhopea tigrina* не изменялась при хранении при -40°C и при -80°C в течение года, а при -18°C и $+4^{\circ}\text{C}$ снижалась на 10% и 15% соответственно. Температуры -80°C и -40°C могут использоваться для сохранения семян *Stanhopea tigrina* до 12 месяцев.

Растения, культивируемые из ранее замороженных семян, на первых стадиях развиваются быстрее контрольной группы, однако к моменту образования ювенильного побега все морфометрические показатели выравниваются.

Наблюдается изменение содержания и соотношения пигментов, происходит незначительная перестройка фотосинтетического аппарата, не критичная для растений.

Список литературы:

1. Jin W., Xiang X., Jin X. Generic delimitation of Orchidaceae from China: current situation and perspective // Biodiversity Science. 2015. Vol. 23, iss. 2. P. 237–242.
2. Вахрамеева М.Г., Варлыгина Т.И., Татаренко И.В. Орхидные России (биология, экология и охрана). М.: Изд-во «Товарищество научных изданий КМК», 2014. 437 с.
3. Фатерыга А.В. Новый чеклист орхидных (Orchidaceae) флоры Крыма // Экосистемы. 2019. № 17 (47). С. 38–43.
4. Кириллова И.А., Кириллов Д.В. *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soo (Orchidaceae, Liliopsida) на северной границе ареала: структура популяций и семенная продуктивность // Поволжский экологический журнал. 2021. № 3. С. 272–292. DOI: 10.35885/1684-7318-2021-3-272-292.
5. Bustam B.M., Dixon K., Bunn E. A cryopreservation protocol for ex situ conservation of terrestrial orchids using asymbiotic primary and secondary (adventitious) protocorms // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 2016. Vol. 52, iss. 2. P. 185–195. DOI: 10.1007/s11627-015-9732-7.
6. Worrachottayanon W., Bunnag S. Cryopreservation of *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. by encapsulation-dehydration method // Songklanakarin Journal of Science and Technology. 2018. Vol. 40, № 3. P. 682–691. DOI: 10.14456/sjst-psu.2018.69.
7. Попова Е.В., Никишина Т.В., Коломейцева Г.Л., Попов А.С. Криосохранение семян и протокормов гибридной орхидеи *Bratonia* // Физиология растений. 2003. Т. 50, № 5. С. 750–755.
8. Engelmann F. Plant cryopreservation: progress and prospects // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 2004. Vol. 40, iss. 5. P. 427–433. DOI: 10.1079/ivp2004541.
9. Nikishina T.V., Popova E.V., Vakhrameeva M.G., Varlygina T.I., Kolomeitseva G.L., Burov A.V., Popovich E.A., Shirokov A.I., Shumilov V.Yu., Popov A.S. Cryopreservation of seeds and protocorms of rare temperate orchids // Russian Journal of Plant Physiology. 2007. Vol. 54, iss. 1. P. 121–127. DOI: 10.1134/s1021443707010189.
10. Cerna M., Valdivieso P., Cella R., Matyas B., Aucapina C. Cryopreservation of orchid seeds through rapid and step freezing methods // F1000Research. 2018. Vol. 7. DOI: 10.12688/f1000research.13622.1.
11. Кершенгольц Б.М., Ремигайло П.А., Хлебный Е.С. Банк семян в вечной мерзлоте // Наука из первых рук. 2011. № 6 (42). С. 6–9.
12. Филипенко Г.И., Силаева О.И., Сторожева Н.Н. Использование вечной мерзлоты с целью сохранения генетических ресурсов растений // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2012. Т. 169, С. 240–244.
13. Куваев В.А., Кузьмин Г.П. Подземное криохранилище семян растений на вечной мерзлоте // Геология, география и глобальная энергия. 2018. № 4 (71). С. 150–155.

14. Martos F., Johnson S.D., Peter C.I., Bytebier B. A molecular phylogeny reveals paraphyly of the large genus *Eulophia* (Orchidaceae): a case for the reinstatement of *Orthochilus* // *Taxon*. 2014. Vol. 63, iss. 1. P. 9–23. DOI: 10.12705/631.6.
15. McAlister B.G., van Staden J. In vitro culture of *Eulophia* species // *South African Journal of Botany*. 1998. Vol. 64, iss. 4. P. 264–266.
16. Коломейцева Г.Л., Антипина В.А., Широков А.И., Хомутовский М.И., Бабоша А.В., Рябченко А.С. Семена орхидей: развитие, структура, прорастание. М.: Изд-во Геос, 2012. 352 с.
17. Curry K.J., McDowell L.M., Judd W.S., Stern W.L. Osmophores, floral features, and systematics of *Stanhopea* (Orchidaceae) // *American Journal of Botany*. 1991. Vol. 78, iss. 5. P. 610–623. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1991.tb12585.x.
18. Castillo-Perez L.J., Martinez-Soto D., Fortanelli-Martinez J., Carranza-Alvarez C. Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and symbiotic acclimatization of the Mexican threatened orchid *Stanhopea tigrina* // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2021. Vol. 146, iss. 2. P. 249–257. DOI: 10.1007/s11240-021-02064-9.
19. ГОСТ 12039-82. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения жизнеспособности. М.: Стандартинформ, 2011. С. 67–106.
20. Лянгузова И.В. Методы оценки качества и жизнеспособности семян // *Методы изучения лесных сообществ: монография*. СПб.: НИИ Химии СПбГУ, 2002. С. 108–114.
21. Van Waes J.M., Debergh P.C. In vitro germination of some Western European orchids // *Physiologia Plantarum*. 1986. Vol. 67, iss. 2. P. 253–261. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1986.tb02452.x.
22. Pandey S.K., Singh H. A simple, cost-effective method for leaf area estimation // *Journal of Botany*. 2011. Vol. 2011. DOI: 10.1155/2011/658240.
23. Wintermans J., De Mots A. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls *a* and *b* and their phenophytins in ethanol // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biophysics including Photosynthesis*. 1965. Vol. 109, iss. 2. P. 448–453. DOI: 10.1016/0926-6585(65)90170-6.
24. Никишина Т.В., Коломейцева Г.Л., Антипина В.А., Бубнова Д.С., Высоцкая О.Н. Коллекции семян орхидей и способы их сохранения // *Охрана и культивирование орхидей: мат-лы X междунар. науч.-практ. конф. 1–5 июня 2015 г., г. Минск, Беларусь*. Минск: А.Н. Вараксин, 2015. С. 177–181.
25. Никишина Т.В., Попов А.С., Коломейцева Г.Л., Голловкин Б.Н. Влияние криоконсервации на прорастание семян редких тропических орхидей // *Физиология растений*. 2001. Т. 48, № 6. С. 930–936.
26. Попов А.С. Криосохранение растений и их клеток // *Ветеринарная патология*. 2008. № 2. С. 158–160.

Информация об авторе(-ах):	Information about the author(-s):
Макарова Алена Евгеньевна , аспирант кафедры ботаники и зоологии, старший лаборант лаборатории микрклонального размножения растений; Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского (г. Нижний Новгород, Российская Федерация). E-mail: alena.makarova.95@mail.ru.	Makarova Alena Evgenievna , postgraduate student of Botany and Zoology Department, senior laboratory assistant of Plant Micropropagation Laboratory; National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod (Nizhny Novgorod, Russian Federation). E-mail: alena.makarova.95@mail.ru.
Сырова Вера Валерьевна , кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и зоологии, заведующий лабораторией микрклонального размножения растений; Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского (г. Нижний Новгород, Российская Федерация). E-mail: vvsyrova@mail.ru.	Syrova Vera Valerievna , candidate of biological sciences, associate professor of Botany and Zoology Department, head of Plant Micropropagation Laboratory; National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod (Nizhny Novgorod, Russian Federation). E-mail: vvsyrova@mail.ru.
Половинкина Елена Олеговна , кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии и биотехнологии; Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского (г. Нижний Новгород, Российская Федерация). E-mail: e.polovinkina@phd.unn.ru.	Polovinkina Elena Olegovna , candidate of biological sciences, associate professor of Biochemistry and Biotechnology Department; National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod (Nizhny Novgorod, Russian Federation). E-mail: e.polovinkina@phd.unn.ru.
Широков Александр Игоревич , кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и зоологии, директор Ботанического сада; Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского (г. Нижний Новгород, Российская Федерация). E-mail: aishirokov@mail.ru.	Shirokov Aleksandr Igorevich , candidate of biological sciences, associate professor of Botany and Zoology Department, director of Botanical Garden; National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod (Nizhny Novgorod, Russian Federation). E-mail: aishirokov@mail.ru.

Для цитирования:

Макарова А.Е., Сырова В.В., Половинкина Е.О., Широков А.И. Оптимизация температурных условий хранения семян тропических орхидных на примере *Eulophia streptopetala* и *Stanhopea tigrina* // Самарский научный вестник. 2022. Т. 11, № 4. С. 71–77. DOI: 10.55355/snv2022114110.