

Размножение и сохранение *in vitro* редкого вида *Fritillaria meleagris* L. из флоральных эксплантов

Д. С. МУРАСЕВА, Т. И. НОВИКОВА, А. А. ЭРСТ

Центральный Сибирский ботанический сад СО РАН
630090, Новосибирск, ул. Золотодоминская, 101
E-mail: dsmuraseva@csbg.nsc.ru

Статья поступила 05.06.2015

Принята к печати 15.06.2015

АННОТАЦИЯ

Впервые исследованы особенности регенерации редкого вида *Fritillaria meleagris* L. из флоральных эксплантов в культуре *in vitro*. На стадии инициации и собственно размножения наиболее эффективным оказалось использование питательной среды В₅, дополненной 0,44 мкМ БАП в сочетании с 3,22 мкМ НУК и 2,28 мкМ ИУК. На стадии размножения на указанной среде регенерация достигала 80 %, и в среднем образовывалось $3,9 \pm 0,3$ луковички на эксплант. Установлено, что путь морфогенеза формирующихся *de novo* структур зависит от минерального состава используемой среды: применение В₅ приводило к прямому адвентивному побегообразованию (геммогенез), тогда как на среде BDS наблюдали образование морфогенного каллуса и гемморизогенез на его поверхности. Отмечено стимулирующее действие низких температур (+7 °С) на развитие микролуковиц и последующую адаптацию к условиям *ex vitro*.

Ключевые слова: *Fritillaria meleagris* L., регенерация *in vitro*, флоральные экспланты, морфогистологический анализ, адвентивное побегообразование, сохранение биоразнообразия.

Проблемы сохранения разнообразия растительного мира, возникающие вследствие дестабилизации экосистем, обусловленной загрязнением среды, антропогенной нагрузкой, увеличением числа инвазивных видов и изменением климата, требуют поиска и разработки новых стратегий. Одним из эффективных подходов, позволяющих успешно сохранять редкие виды в условиях *ex situ*, является использование биотехнологий [Engelmann, 2011]. Процессы регенерации в культуре *in vitro* являются основой не только для разработки технологий размножения, но и

для фундаментальных исследований морфогенетического развития растений. Принципиально важное свойство морфогенеза – универсальность его путей как *in vivo*, так и в условиях *in vitro* – позволяет исследовать потенциал растительных клеток и моделировать процессы развития в культуре органов и тканей [Батыгина и др., 2010].

Рябчик шахматный *Fritillaria meleagris* L. (сем. Liliaceae) – редкий вид с дизъюнктивным ареалом, распространен в Западной Сибири и европейской части России, Восточной Европе, Казахстане, Средиземноморье, за-

несен в Красную книгу РФ, статус Зв [2008]. Природные популяции этого эфемероида страдают от сбора и выкапывания луковиц, что объясняется привлекательной окраской цветов и ранним цветением. Низкая скорость естественного размножения *F. meleagris* также является одной из причин уязвимости природных популяций этого вида. Сохранению и воспроизведению рябчика шахматного посвящен ряд исследований, в которых обоснована эффективность использования вместо традиционных методов размножения альтернативных биотехнологических подходов [Вечернина, 2004; Nikolić et al., 2008; Ветчинкина, 2010; Subotić et al., 2010; Petrić et al., 2011; Jevremović et al., 2010].

Регенерация растений в культуре *in vitro*, особенно однодольных, нередко является сложной задачей [Laslo et al., 2011]. Соматические клетки этого класса высших растений дифференцируются довольно рано, а затем теряют митотическую активность и морфогенетический потенциал. Чаще всего для размножения *in vitro* используются зародыши или органы, имеющие меристематические зоны. Однако семена видов рода *Fritillaria* имеют глубокий морфофизиологический тип покоя, что затрудняет их использование в качестве первичных эксплантов [Николаева и др., 1999; Ветчинкина и др., 2012].

Для введения в культуру *in vitro* рябчиков используют и другие типы эксплантов: луковичные чешуи (например, для *F. verticillata* [Вечернина, 2004], *F. meleagris* [Laslo et al., 2011], *F. thunbergii* [Paek, Murthy, 2002]), основание листа (*F. meleagris* [Subotić et al., 2010]), листочки околоцветника (*F. imperialis* [Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2007, 2008]), луковички-детки (*F. unibracteata* [Gao et al., 1999]).

Использование флоральных органов в качестве первичных эксплантов обеспечивает сохранение материнского растения, что особенно важно при работе с редкими видами, позволяет избежать высокого уровня контаминации, характерного для эксплантов из подземных органов, а также является альтернативой луковичных чешуй, составляющих луковицу растения-донора, особенно в случае их ограниченного количества (1–3 чешуи) [Ziv, Lilien-Kipnis, 2000; Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2008].

Установлено, что в культуре *in vitro* процессы регенерации представителей рода *Fritillaria* могут происходить двумя путями: через геммогенез или соматический эмбриогенез, при этом формирование структур *de novo* возможно прямым путем, либо непрямым через стадию каллусообразования [Paek, Murthy, 2002; Вечернина, 2004]. Для *F. meleagris*, согласно литературным данным, наиболее характерным является путь соматического эмбриогенеза, нередко через промежуточную стадию каллусообразования [Subotić et al., 2010; Petrić et al., 2010]. Так как конечной целью этих работ является сохранение гермоплазмы редких и исчезающих видов и поддержание ее в стабильном состоянии, важным моментом при разработке технологий микроразмножения является исследование путей морфогенеза *in vitro*.

Цель данного исследования – изучение морфогенеза редкого вида *F. meleagris* в культуре *in vitro* из листочков околоцветника как основы для разработки высокоэффективных и стабильных систем размножения и сохранения вида.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исходным материалом для введения в культуру *in vitro* послужили закрытые цветочные бутоны *F. meleagris* (всего 37 шт.), взятые в 2013–2015 гг. от растений, произрастающих на интродукционном участке лаборатории декоративных растений Центрального Сибирского ботанического сада СО РАН (Новосибирск).

Получение асептической культуры. Поверхностную стерилизацию проводили погружением в 20%-ный водный раствор “Domestos” на 20 мин, далее трехкратно промывали стерильной дистиллированной водой. Стерильные листочки околоцветника отделяли от цветоложа и использовали в качестве первичных эксплантов. На стадии введения в культуру *in vitro* использовали питательную среду, разработанную для *F. imperialis* [Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2008]: минеральная основа по прописи О. Л. Гамборга и Д. Е. Эвелеге (B₅) [Gamborg, Eveleigh, 1968], регуляторы роста – 0,44 мкМ 6-бензиламинопурина (БАП) в сочетании с 3,22 мкМ

α -нафтилуксусной кислоты (НУК) и 2,28 мкМ индолил-3-уксусной кислоты (ИУК). В качестве контроля использовали безгормональную среду В₅.

Размножение *in vitro*. Конгломераты регенерированных микролуковичек переносили на среды для дальнейшего размножения. На этапе собственно размножения использовали модифицированные питательные среды В₅, а также Данстена и Шорта (BDS) [Dunstan, Short, 1977], дополненные БАП, НУК, индолил-3-уксусной кислотой (ИУК) в концентрациях 0,2–10,0 мкМ. Культивирование растительного материала проводили в условиях 16 ч свет/8 ч темнота при 23 ± 2 °С по общепринятым методикам [Калинин и др., 1980]. Период субкультивирования составил 35–40 дней.

Морфо-гистологический анализ. Для морфологических исследований использовали стереомикроскоп Stereo Discovery V 12 (Carl Zeiss, Германия). Детальное гистологическое изучение процессов морфогенеза проводили на постоянных микроскопических препаратах, подготовленных по методике З. П. Паушевой [1988]. Растительный материал фиксировали в FAA – этанол : формалин : ледяная уксусная кислота (100 : 7 : 7). Промывку и дальнейшее хранение осуществляли в 70%-ном этаноле. Подготовленные тонкие срезы окрашивали гематоксилином по Эрлиху с подкраской анилиновым синим. Гистологический анализ развития растений проводили с помощью светового микроскопа Axioskop-40 (Carl Zeiss, Германия), оборудованного цифровой камерой AxioCam MRc5 с использованием программы AxioVision 4.8 для получения, обработки и анализа изображений.

Укоренение и адаптация к условиям *ex vitro*. На этапе укоренения полученные микролуковички высаживали на питательную среду В₅ с уменьшенным в 2 раза содержанием макро- и микросолей, дополненную 5 мкМ НУК. Все питательные среды для укоренения включали измельченный активированный уголь (0,5 мг/л). Для индукции ризогенеза микрорастения помещали в условия низкой положительной температуры в световой термостат фирмы Rumed (Германия) при 7 °С на 1,5–2 мес. По истечении этого срока регистрировали показатели роста и развития: диаметр луковички и количество луковичных

чешуй, количество и длину корней. Контролем служила питательная среда 1/2 В₅ и температура 23 ± 2 °С.

Для адаптации к условиям *ex vitro* растения-регенеранты высаживали в контейнеры, заполненные смесью измельченного кокосового волокна и песка (3 : 1), закрывали пленкой и переносили в условия теплицы.

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты проводились дважды. При обработке результатов использовали пакет статистического анализа Microsoft Excel. На диаграммах приведены средние арифметические величины и доверительные интервалы. В работе обсуждаются различия, достоверные при 95 %-ном уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При использовании листочков околоцветника в качестве первичного экспланта помимо обеспечения высокой степени стерильности необходимо снизить повреждающее действие стерилизующего агента. Разработанный нами режим поверхностной стерилизации цветочных бутонов с использованием 20 мин экспозиции в 20%-ном растворе “Domestos” оказался эффективным, и стерильность эксплантов достигала 91–98 %, при этом жизнеспособность первичных эксплантов составила 76 %.

На контрольной безгормональной среде регенерация побегов не происходила, ткань листочков подвергалась некрозу. Использование питательной среды В₅, дополненной 0,44 мкМ БАП в сочетании с 3,22 мкМ НУК и 2,28 мкМ ИУК, способствовало активизации морфогенных процессов в тканях листочков околоцветника. Появление первых протуберанцев на поверхности экспланта в зоне прикрепления листочка околоцветника к цветоложу отмечалось через 23–25 дней после введения в культуру ткани и происходило без образования каллуса, но с разрастанием ткани основания листочка (рис. 1). На данной среде регенерация достигала 56 %, в среднем образовывалось 4,4 ± 0,5 луковички на эксплант. Эффективность данной питательной среды отмечалась ранее в работе М. Мохаммади-Дехчешмех с соавт. при использовании флоральных эксплантов *F. imperialis* [Mohammadi-Dehcheshmeh, 2008].

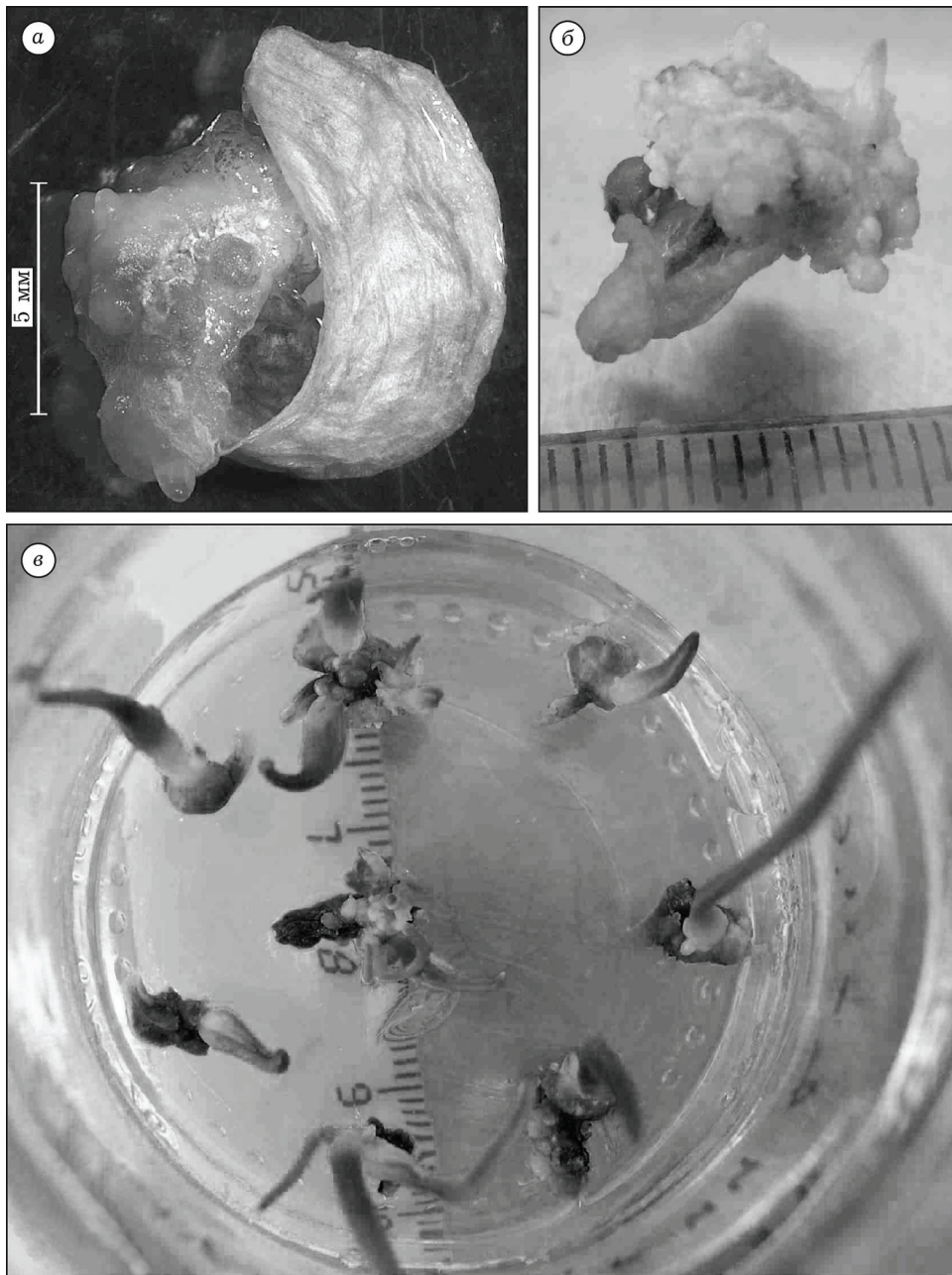


Рис. 1. Введение в культуру *in vitro* *F. meleagris* с использованием листочков околоцветника в качестве первичных эксплантов, питательная среда В₅, дополненная БАП 0,44 мкМ + НУК 3,22 мкМ + ИУК 2,28 мкМ: а – разрастание основания листочка, формирование протуберанцев на 25 день; б – развитие микропочек, 34 день; в – образование побегов *de novo* через 65 дней культивирования

Сформировавшиеся на стадии введения в культуру *in vitro* микролуковички отделяли от первичного экспланта и культивировали на разных средах (В₅ и BDS) с целью оптимизации стадии собственно размножения с использованием различных концентраций и комбинаций ауксинов и цитокининов (рис. 2). На всех испытанных средах частота регене-

рации микропобегов варьировала от 60 до 81 % (см. таблицу). При оценке влияния регуляторов роста на адвентивное побегообразование *F. meleagris* установлено, что наибольшее количество побегов формируется на питательной среде В₅, дополненной БАП 0,44 мкМ + НУК 3,22 мкМ + ИУК 2,28 мкМ. Такое сочетание минеральной основы В₅ и

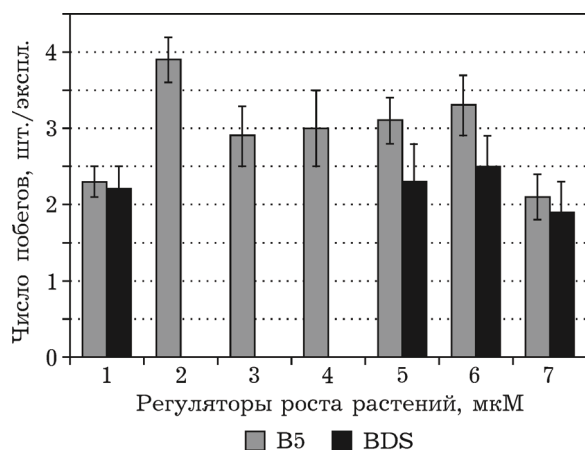


Рис. 2. Влияние компонентов питательной среды на регенерацию микролуковичек *F. meleagris* в культуре *in vitro*.

1 – без регуляторов роста; 2 – БАП 0,44 + НУК 3,22 + ИУК 2,28; 3 – НУК 0,3 + ИУК 0,2; 4 – НУК 3,2 + ИУК 2,3; 5 – БАП 0,5; 6 – БАП 5 + Нук 2; 7 – БАП 10 + НУК 2

регуляторов роста с преобладанием ауксинов способствовало формированию в среднем $3,9 \pm 0,3$ адвентивных микролуковичек на эксплант, частота регенерации при этом составила 80 %. Из приведенной диаграммы (см. рис. 2) видно, что использование только ауксинов или только цитокининов на стадии размножения приводило к снижению формирования микролуковичек *de novo*. Сходные результаты получены при культивировании *Lilium davidii* var. *unicolor* [Xu et al., 2009] и *Allium chinense* [Yan et al., 2009]. В целом для индукции побегообразования у геофитов сочетание ауксинов и цитокининов является наиболее эффективным [Kim et al., 2005]. Во многих работах исследователи использовали высокие концентрации этих регуляторов роста (22–89 мкМ) [De Bruyn et al., 1992; Slabbert et al., 1993], что нередко способствовало появлению соматональной изменчивости.

При увеличении концентрации БАП до 10 мкМ отмечается угнетение побегообразования (до 1,9 побега/эксплант) и снижение частоты регенерации (до 60 %), при этом происходит увеличение периода, необходимого для регенерации микролуковичек. Кроме того, обнаружена регенерация адвентивных побегов на контрольных безгормональных средах, что можно объяснить накоплением экзогенных регуляторов роста, содержащихся в

питательных средах на стадии введения в культуру *in vitro*, в тканях экспланта (см. таблицу).

Установлено влияние минерального состава питательной среды на эффективность размножения *F. meleagris* в культуре *in vitro*. Так, использование среды В₅ способствовало более активной регенерации вне зависимости от используемых регуляторов роста. Использование двух минеральных основ позволило выявить различные пути морфогенеза в культуре ткани: культивирование микролуковичек, полученных из листочков околоцветников, на среде В₅ приводило к активному побегообразованию, тогда как на среде BDS отмечалось разрастание тканей луковичной чешуи микролуковичек и активный каллусогенез (72–87 %), при этом на поверхности каллуса формировались эмбриоподобные структуры. Нами показано, что использование различных комбинаций регуляторов роста оказывает эффект только на активность процессов регенерации и не влияет на путь морфогенеза (см. рис. 2). Подобное действие минеральной основы среды на морфогенез *in vitro* рассматривается в работе К. М. Рамаг и Р. Р. Вильямса [Ramag, Williams, 2002].

Для выявления точного пути морфогенеза *F. meleagris* в культуре *in vitro* нами проведен морфо-гистологический анализ развития структур *de novo*.

Как упоминалось ранее, при культивировании микролуковичек (стадия собственно размножения) на питательной среде по прописи В₅ формирование микропочек отмечалось в основании луковички при пассирова-

Частота адвентивного побегообразования *F. meleagris* в культуре *in vitro* на стадии собственно размножения

Регуляторы роста, мкМ	Регенерация, %	
	В ₅	BDS
Контроль	71	30
БАП 0,44 + НУК 3,22 + ИУК 2,28	80	–
НУК 0,3 + ИУК 0,2	45	–
НУК 3,2 + ИУК 2,3	47	–
БАП 0,5	81	58
БАП 5 + НУК 2	77	64
БАП 10 + НУК 2	73	60

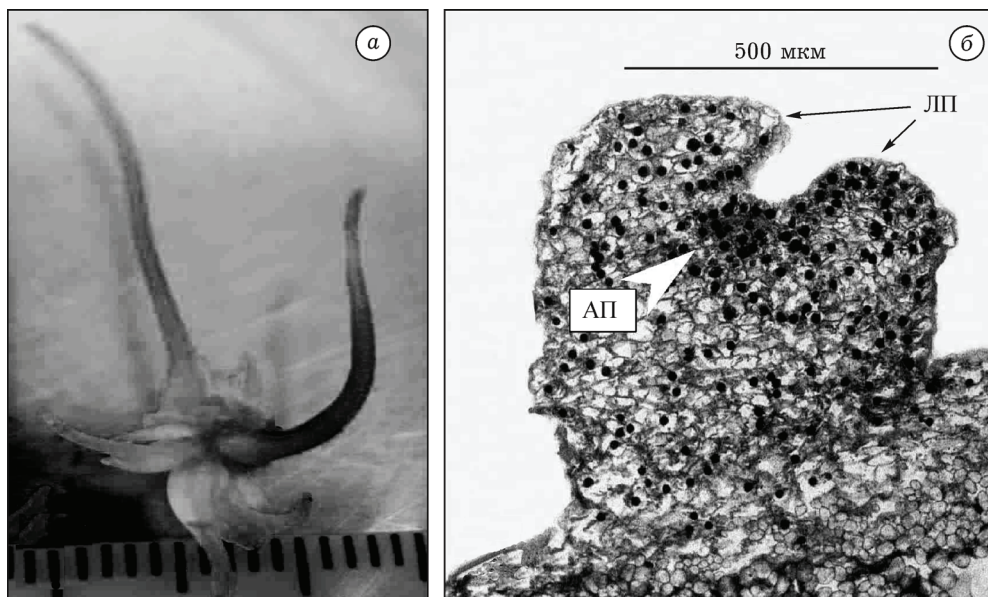


Рис. 3. Формирование адвентивных микролуковичек *F. meleagris* на стадии размножения на питательной среде В₅, дополненной БАП 0,44 мкМ + НУК 3,22 мкМ + ИУК 2,28 мкМ: а – конгломерат адвентивных микролуковичек в конце пассажа, б – развивающийся микропобег, видны апекс побега (АП) и листовые примордии (ЛП)

нии на свежую питательную среду. Проведенный морфо-гистологический анализ выявил, что при этом происходит прямое адвентивное побегообразование – геммогенез, без промежуточной стадии каллусообразования (рис. 3).

Культивирование микролуковичек на питательной среде по прописи BDS, дополненной БАП 5 мкМ и НУК 2 мкМ, приводило к формированию плотного морфогенного каллуса. По мере роста каллусной массы на ее поверхности наблюдали образование эмбриоподобных структур, имеющих удлиненную форму (рис. 4). При этом дифференцировки луковичных чешуй на начальных этапах развития не происходило. Необходимо отметить асинхронность развития структур *de novo*: одновременно наблюдали как закладывающиеся протуберанцы, так и хорошо развитые микропобеги.

Гистологическое исследование эмбриоподобных структур позволило обнаружить наличие апексов как побега, так и корня, а также присутствие в паренхиме почек вытянутых в длину клеток прокамбия (рис. 5, а, б). Дальнейшая пролиферация этих клеток приводила к появлению тяжей первичной проводящей системы, соединяющих листовые

зачатки и апекс корня, формирование которых наблюдалось к 35–42 дню культивирования (см. рис. 5, в). Апоикальная меристема микропобега имела организацию по типу туника-корпус, отчетливо видна протодерма (см. рис. 5, г). Наличие на поздних этапах морфогенеза хорошо развитых корневых апексов у микропобегов указывает на начало формирования адвентивных корней (см. рис. 5, в, д). При этом одновременную закладку двух корневых апексов можно объяснить развитием придаточных корней, характерных для всех луковичных геофитов.

Изучение строения формирующихся структур позволяет предположить, что закладка меристем, дающих начало микропобегам, происходит не на поверхности каллуса, а в более глубоких клеточных слоях.

Несмотря на наличие апексов побега и корня, нам не удалось выявить процессы соматического эмбриогенеза в каллусной ткани *F. meleagris* в силу отсутствия биполярности на самых ранних этапах морфогенеза *in vitro*. Из этого следует, что регенерация *F. meleagris* на поверхности каллуса проходит по пути гемморизогенеза.

Вопрос происхождения структур *de novo* и факторов инициации процессов регенера-

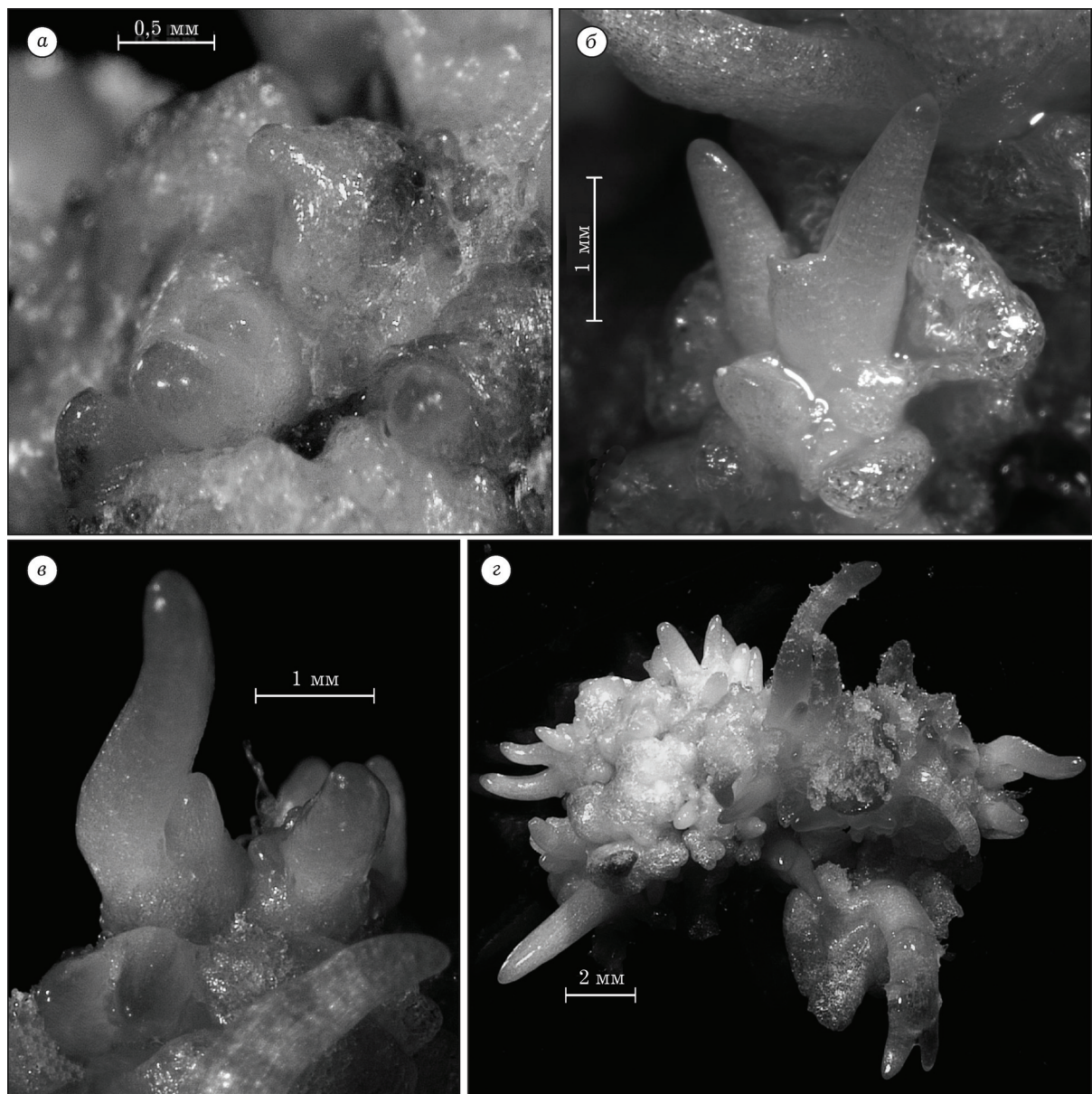


Рис. 4. Развитие эмбриоподобных структур *F. meleagris* на питательной среде BDS, дополненной БАП 5 мкМ и НУК 2 мкМ: а – протуберанцы на поверхности морфогенного каллуса; б – развивающиеся эмбриоподобные структуры, 25 день; в – микропобег на 32 день культивирования; г – конгломерат микропобегов на поверхности каллуса

ции обсуждается во многих работах. В работе М. Отани и Т. Шимадо адвентивные луковички *F. camtschaticensis* получались путем прямого органогенеза [Otani, Shimada, 1997], подобный тип морфогенеза в культуре *in vitro* показан для *F. thunbergii* [Paek, Murthy, 2002] и *F. roylei* [Joshi et al., 2007] из тканей луковичных чешуй, при этом для *F. imperialis* возможен как непрямой соматический эмбриогенез, так и прямое адвентивное побегообразование из тканей листочков околоцветни-

ков [Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2007, 2008]. Непрямой соматический эмбриогенез получен для *F. meleagris* при использовании зрелых зиготических зародышей в качестве первичных эксплантов и в дальнейшем из чешуй сформированных микролуковичек [Petrić et al., 2011].

Для геофитов, развивающихся как в естественных условиях, так и в условиях *in vitro*, характерно наличие периода покоя, который задерживает прорастание и даль-

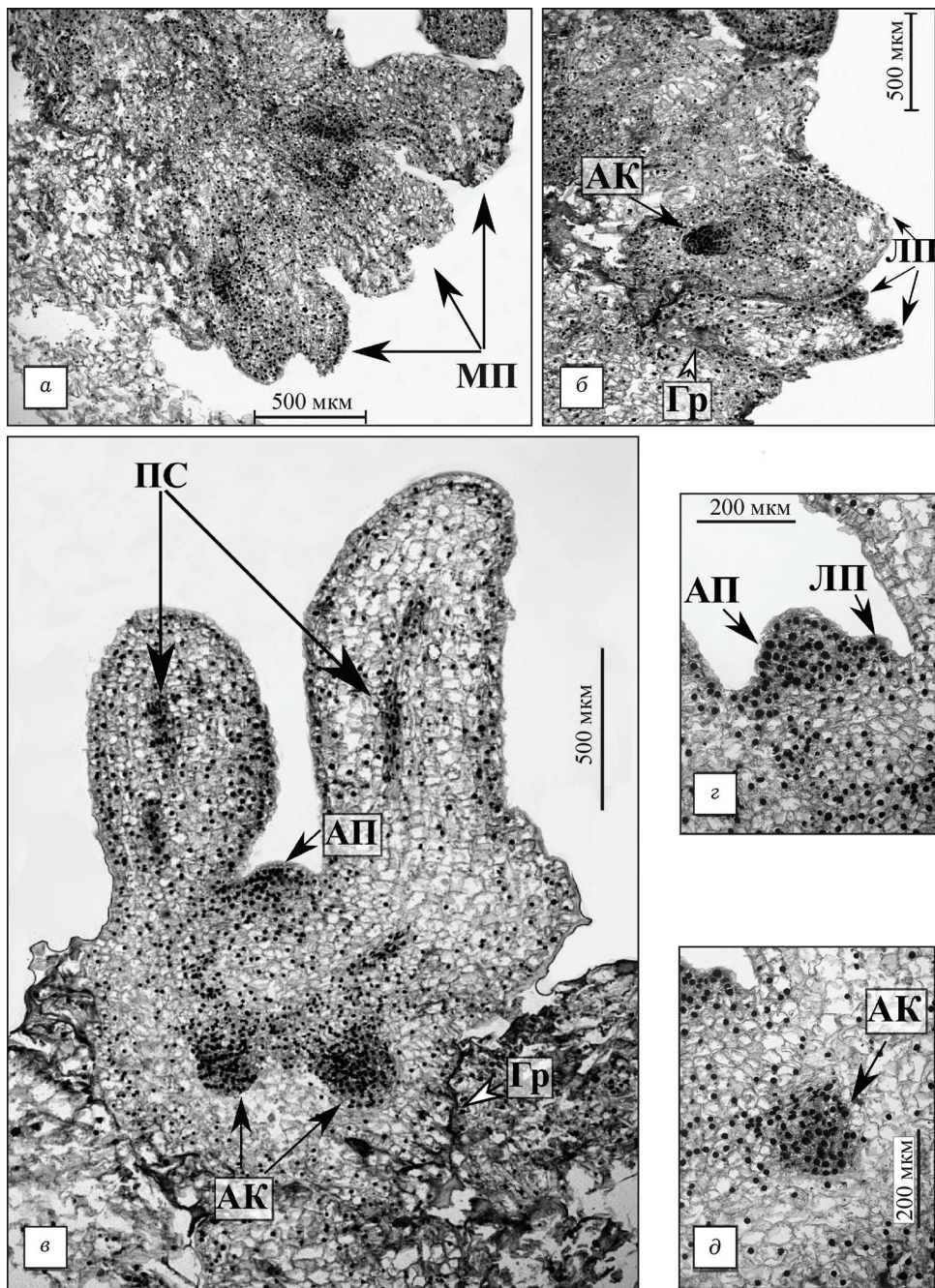


Рис. 5. Гистологический анализ процессов непрямого гемморизогенеза *F. meleagris* в культуре *in vitro* на среде BDS, дополненной БАП 5 мкМ и НУК 2 мкМ: а – развитие соматических эмбрионидов на поверхности морфогенного каллуса, 30 день культивирования; б – микропобеги с хорошо развитым корневым апексом и листовыми примордиями; в – сформированный микропобег с развитыми апексами побега и корня, отчетливо видна граница между тканями каллуса и эмбриоида, а также первичная проводящая система, 40 день культивирования; г – формирование апекса побега, видна организация по типу туника-корпус и заложение очередного листового примордия; д – закладка апекса корня. АК – апекс корня, ЛП – листовые примордия, МП – микропочка, ПС – сосуды первичной проводящей системы

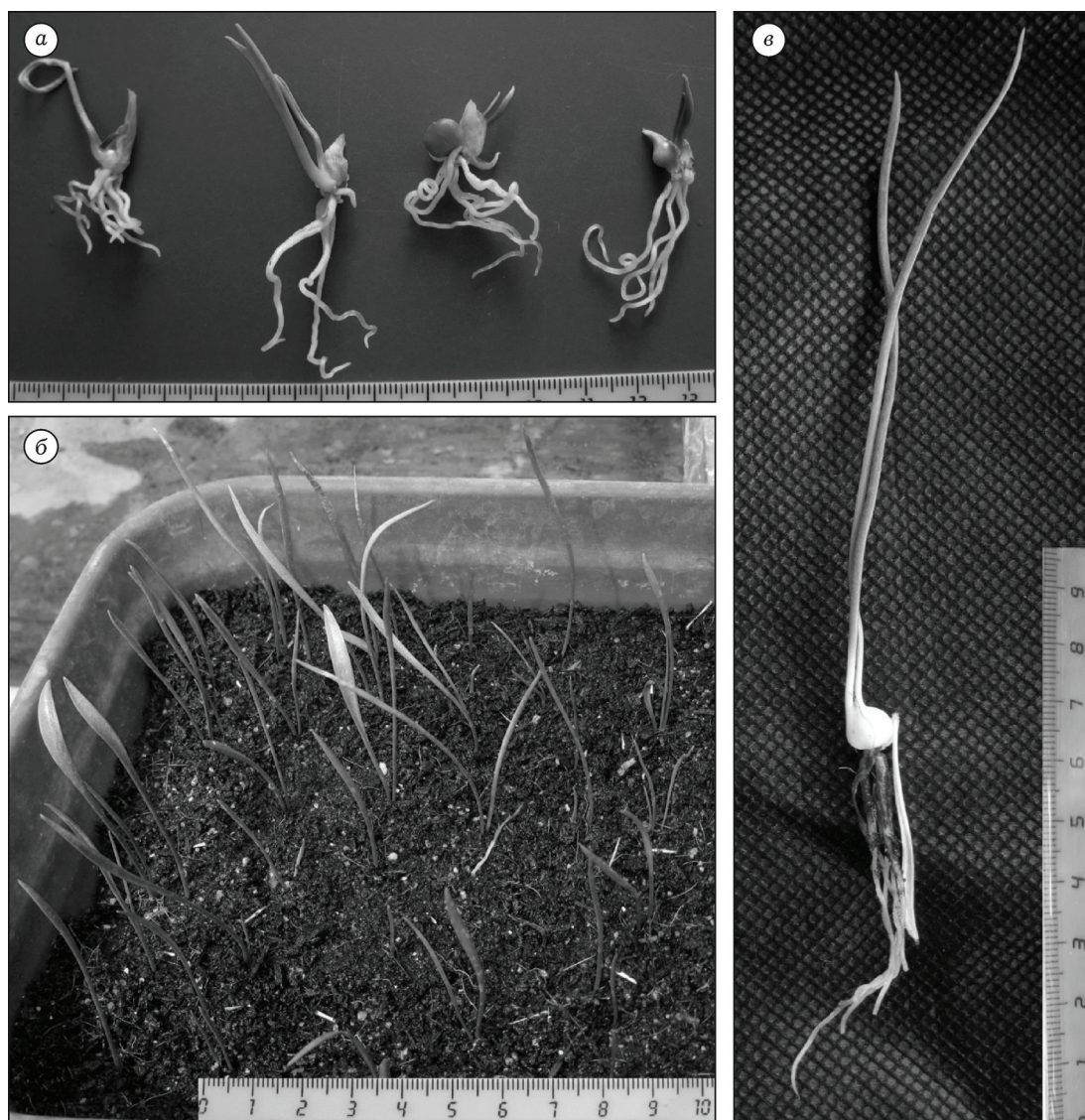


Рис. 6. Укоренение и адаптация микролуковичек *F. meleagris*: а – укорененные микролуковички после 6 нед. при 7 °С, питательная среда В₅, дополненная 5 мкМ НУК; б – прорастающие луковичи, находящиеся в смеси измельченного кокосового волокна и песка (3 : 1), теплица; в – луковича *F. meleagris* после 5 мес. выращивания в открытом грунте

нейшее развитие лукович при переносе их в условия *ex vitro* [Paek, Murthy, 2002; Nikolić et al., 2008]. Рядом авторов получены результаты, указывающие на стимулирующий эффект низких температур на ризогенез и преодоление покоя лукович, развивающихся *in vitro* [Yae et al., 2001; Эрст и др., 2014], в том числе и для *F. meleagris* [Jevremović et al., 2010].

В нашей работе для преодоления покоя микролуковичек, стимуляции их роста, а также развития корней мы применили ме-

тод холодной стратификации с выдерживанием микролукович при низкой положительной температуре (7 °С). В результате получены хорошо укоренные микрорастения *F. meleagris*, частота укоренения достигала 98 %. Однако сравнение показателей роста луковичи и укоренения *in vitro* при различных температурных режимах (при 23 ± 2 °С и при 7 °С) выявило отсутствие достоверных различий: в среднем микролуковичи состояли из $3,1 \pm 0,4$ чешуй, при этом их диаметр варьировал от 4 до 5,5 мм. По истече-

нии 6–7 недель независимо от температурного режима у луковицы развивалось до 3–4 корней длиной 18–23 мм.

В то же время отмечено, что культивирование при низких температурах способствует более быстрому прорастанию и развитию луковиц *F. meleagris* при последующем переносе их в условия *ex vitro*. Так, развитие первого листа, образующегося в условиях *ex vitro*, при предварительном выдерживании микролуковиц при температуре 7 °C отмечается на 51–56 день, тогда как в отсутствие низкотемпературной обработки прорастание отмечается только спустя 89–94 дня. Следует отметить, что и в том, и в другом случае луковицы прорастают синхронно.

Использование смеси измельченного кокосового волокна и песка (3 : 1) позволило добиться 70%-ного уровня адаптации к условиям *ex vitro*. Выращивание регенерантов в условиях теплицы способствовало развитию 2–3 ассимилирующих листьев с хорошо развитой листовой пластинкой линейной формы (рис. 6). Дальнейшее выращивание растений *F. meleagris* проводили в открытом грунте. Прекращение периода вегетации отмечалось спустя 2–2,5 месяца после развития первого листа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе впервые в качестве экспланта для введения в культуру *in vitro* редкого вида *F. meleagris* использованы листочки околоцветника. Данный тип эксплантов является перспективной альтернативой ранее используемым луковичным чешуям, так как позволяет сохранить материнское растение и преодолеть проблемы с контаминацией. Использование сред различного состава на этапе собственно размножения (B_5 и BDS) позволило выявить влияние минеральной основы как на активность регенерации, так и на пути морфогенеза *in vitro*. Установлено, что процессы регенерации активнее реализуются на среде B_5 , независимо от используемых регуляторов роста. При этом формирование структур *de novo* на этой среде происходит путем прямого геммогенеза, тогда как на среде BDS – путем гемморизо-

генеза через стадию каллусообразования. Оптимизированы условия адаптации и показан стимулирующий эффект низких температур на прорастание и развитие луковиц *F. meleagris* при последующем переносе их в условия *ex vitro*.

Результаты наших исследований, выявившие различные пути морфогенетического развития рябчика шахматного в культуре *in vitro* из флоральных органов, представляют интерес как при разработке технологий воспроизведения редкого вида, так и для понимания процессов регенерации в культуре изолированных органов и тканей однодольных растений.

Исследования выполнены при финансовой поддержке грантов ОПТЭК, “УМНИК”.

ЛИТЕРАТУРА

- Батыгина Т. Б., Круглова Н. Н., Горбунова В. Ю. и др. От микроспоры – к сорту. М.: Наука, 2010. 174 с.
- Ветчинкина Е. М. Биологические особенности культивирования *in vitro* семян и зародышей редких видов растений: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2010. 20 с.
- Ветчинкина Е. М., Ширнина И. В., Ширнин С. Ю., Молканова О. И. Сохранение редких видов растений в генетических коллекциях *in vitro* // Вестн. Балт. фед. ун-та им. И. Канта. 2012. № 7. С. 109–118.
- Вечернина Н. А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений: монография. Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2004. 205 с.
- Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры ткани в физиологии и биохимии растений. Киев: Наук. думка, 1980. 488 с.
- Красная книга Российской Федерации: растения и грибы. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2008. 855 с.
- Николаева М. Г., Лянгузова И. В., Поздова Л. М. Биология семян. СПб.: НИИ химии СПбГУ, 1999. 232 с.
- Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988. 271 с.
- 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.
- De Bruyn M. H., Ferreira D. I., Slabbert M. M., Pretorius J. *In vitro* propagation of *Amaryllis belladonna* // Plant Cell Tissue Organ Cult. 1992. N 31. P. 179–184.
- Dunstan D. J., Short K. C. Improved growth of tissue cultures of the onion *Allium cepa* // Physiol. Plant. 1977. Vol. 41, N 1. P. 70–72.
- Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2011. Vol. 47. P. 5–16.
- Gamborg O. L., Eveleigh D. E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. Journ. Biochem. 1968. Vol. 46, N 5. P. 417–421.

- Gao S. L., Zhu D. N., Cai Z. H., Jiang Y., Xu R. Organ culture of a precious Chinese medicinal plant – *Fritillaria unibracteata* // Plant Cell Tiss Org Cult. 1999. N 59. P. 197–201.
- Jevremović S., Petrić M., Živković S., Trifunović M., Subotić A. Superoxide dismutase activity and isoenzyme profiles in bulbs of snake's head fritillary in response to cold treatment // Arch. Biol. Sci. 2010. N 62 (3). P. 553–558.
- Jiménez V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis // Plant. Growth. Regul. 2005. N 47. P. 91–110.
- Joshi S. K., Dhar U., Andola H. C. *In vitro* bulblet regeneration and evaluation of *Fritillaria roylei* Hook. High Value Medicinal Herb of the Himalaya // Acta Hort. 2007. N 756. P. 75–84.
- Kim M. S., Jeon J. H., Youm J. W., Kim J. H., Lee B. C., Kang W. J., Kim H. S., Joung H. Efficient plantlet regeneration via callus formation from leaf segment of *Lilium* oriental hybrid “Casa blanca” // J. Plant. Biotech. 2005. N 7. P. 129–134.
- Laslo V., Zăpârțan M., Agud E. *In vitro* conservation of certain endangered and rare species of Romanian spontaneous flora // Analele Universității din Oradea, Fascicula Protecția Mediului. 2011. Vol. XVI. P. 252–261.
- Mohammadi-Dehcheshmeh M., Khalighi A., Naderi R., Ebrahimie E., Sardari M. Indirect somatic embryogenesis from petal explant of endangered wild population of *Fritillaria imperialis* // Pak. J. Biol. Sci. 2007. N. 10(11). P. 1875–1879.
- Mohammadi-Dehcheshmeh M., Khalighi A., Naderi R., Sardari M., Ebrahimie E. Petal: a reliable explant for direct bulblet regeneration of endangered wild populations of *Fritillaria imperialis* L. // Acta Physiol. 2008. N 30. P. 395–399.
- Nikolić M., Mišić D., Maksimović V., Jevremović S., Trifunović M., Subotić A. Effect of low temperature on rooting rate and carbohydrate content of *Fritillaria meleagris* bulbs formed in culture *in vitro* // Arch. Biol. Sci. 2008. N 60 (1). P. 5–6.
- Otani M., Shimada T. Micripropagation of *Fritillaria camtschatcensis* (L.) Ker-Gawl. “Kuroyuri” // Bull. RIAR, Ishikawa Agr. Coll. 1997. Vol. 5. P. 39–44.
- Paek K. Y., Murthy H. N. High frequency of bulblet regeneration from bulb scale sections of *Fritillaria thunbergii* // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2002. N 68. P. 247–252.
- Petrić M., Subotić A., Jevremović S., Trifunović M. Somatic embryogenesis and bulblet regeneration in snakehead fritillary (*Fritillaria meleagris* L.) // Afr. Journ. of Biotech. 2011. Vol. 10 (72). P. 16181–16188.
- Ramag C. M., Williams R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2002. N 38. P. 116–124.
- Slabbert M. M., De Bruyn M. H., Ferreira D. I., Pretorius J. Regeneration of bulblets from twin scales of *Crinum macowanii* *in vitro* // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 1993. N 33. P. 133–141.
- Subotić A., Trifunović M., Jevremović S., Petrić M. Morpho-histological study of direct somatic embryogenesis in endangered species *Fritillaria meleagris* // Biologia plantarum. 2010. N 54 (3). P. 592–596.
- Xu L. F., Ma F. W., Liang D. Plant regeneration from *in vitro* cultured leaves of Lanzhou lily (*Lilium davidii* var. *unicolor*) // Sci Hort. 2009. N 119. P. 458–461.
- Yae B. W., Han B. H., Goo D. H. Dormancy breaking and *in vitro* growth of *in vitro* bulblets in *Lilium* oriental hybrid “Casablanca” // J. Kor. Soc. Hort. Sci. 2001. N 42. P. 99–102.
- Yan M.-M., Xu C., Kim C.-H., Um Y.-C., Bah A. A., Guo D.-P. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*) // Scientia Horticulturae. 2009. N 123 (1). P. 124–128.
- Ziv M., Lilien-Kipnis H. Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes *in vitro* // Plant cell reports. 2000. N 19. P. 845–850.

***In vitro* Propagation and Conservation of the Rare Species *Fritillaria meleagris* L. from Floral Explants**

D. S. MURASEVA, T. I. NOVIKOVA, A. A. ERST

*Central Siberian Botanical Garden, SB RAS
630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya str., 101
E-mail: dsmuraseva@csbg.nsc.ru*

The peculiarities of *in vitro* regeneration of the rare species *Fritillaria meleagris* L. from floral explants was studied for the first time. At the establishment of *in vitro* culture and during the multiplication stage the most effective was the use of the B₅ nutrient medium supplemented with 0.44 mM BA, 3.22 mM NAA and 2.28 mM IAA. During the multiplication stage the regeneration rate reached 80 % and the number of bulblets per explant was 3.9 ± 0.3. It was established that morphogenesis of the *de novo* formed structures depended on the mineral composition of the medium: the use of mineral-based B₅ led to adventitious shoot formation (gemmogenesis), while the use of BDS caused morphogenic callus formation and gemmorhizogenesis on its surface. The stimulating effect of low temperatures (+7 °C) on bulblets' development and adaptation to *ex vitro* conditions was noted.

Key words: *Fritillaria meleagris* L., *in vitro* regeneration, floral explants, morpho-histological analysis, adventitious shoot formation, biodiversity conservation.