

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ СИБИРСКИЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

МУРАСЕВА Динара Серыкбаевна

**РАЗМНОЖЕНИЕ И СОХРАНЕНИЕ *IN VITRO*
РЕДКИХ И ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ РОДА *FRITILLARIA L.***

03.02.01 – «Ботаника»

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель –
доктор биологических наук
Новикова Т.И.

Новосибирск – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. СОХРАНЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ ГЕОФИТОВ МЕТОДАМИ <i>IN VITRO</i> : ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ.....	8
1.1. Биотехнология сохранения растений – новая междисциплинарная наука	8
1.2. Морфогенез в культуре <i>in vitro</i> : базовые концепции	15
1.3. Факторы, влияющие на процесс морфогенеза и регенерации в культуре <i>in vitro</i>	21
1.4. Системы регенерации геофитов в культуре <i>in vitro</i>	35
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
2.1. Объекты исследования	43
2.2. Методы исследования.....	54
ГЛАВА 3. МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ РЕДКИХ И ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ РОДА <i>FRITILLARIA</i> И ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i>	61
3.1. Регенерация побегов <i>de novo</i> из луковичных чешуй.....	62
3.2. Регенерация побегов <i>de novo</i> из флоральных органов	75
3.3. Изучение морфогенеза <i>in vitro</i> с использованием световой микроскопии	84
ГЛАВА 4. УКОРЕНЕНИЕ И АДАПТАЦИЯ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ К УСЛОВИЯМ <i>EX VITRO</i>	94
ГЛАВА 5. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ И СОЗДАНИЯ КОЛЛЕКЦИИ <i>IN VITRO</i> ВИДОВ РОДА <i>FRITILLARIA</i>	105
ВЫВОДЫ.....	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	116

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- B₅ – питательная среда Гамборга и Эвелега
BDS – питательная среда Данстена и Шорта
MS – питательная среда Мурасиге и Скуга
2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота
БАП – 6-бензиламинопурин
ИМК – индолил-3-масляная кислота
ИУК – индолил-3-уксусная кислота
Кн – кинетин
НУК – 1-нафтилуксусная кислота
СЭ – соматический эмбриогенез
ТДЗ – тидиазурон

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Решение глобальной проблемы сохранения биоразнообразия растений на современном этапе невозможно без поиска новых стратегий и подходов. В этой связи в последние годы отмечено развитие перспективного направления исследований – биотехнологии сохранения растений. Это новая междисциплинарная наука, основной задачей которой является дополнение существующих традиционных методов сохранения биоразнообразия *ex situ* современными биотехнологическими инструментами, обеспечивающими возможность устойчивого управления генетическими ресурсами (Benson, 2002).

Род *Fritillaria* L. (рябчик) относится к семейству Лилейных (Liliaceae Juss.) и насчитывает свыше ста видов, распространенных на лугах, степях, каменистых склонах гор, в лесах умеренного пояса Европы, Азии и Северной Америки (Rix, 1997, 2001). Представители рода широко известны, благодаря привлекательной окраске околоцветников и раннему цветению. Помимо этого, они востребованы в медицине, так как накопление различных алкалоидов в луковицах обуславливает широкий спектр лекарственного действия (Lin et al., 2001). На территории Алтае-Саянской горной области встречаются несколько видов рябчиков, в том числе изучаемые нами: *F. dagana* Turcz. ex Trautv., *F. meleagris* L., *F. meleagroides* Patrin ex Schult. & Schult. f., *F. sonnikovae* Schaulo et A. Erst. В связи с медленным размножением в естественных условиях и высокой антропогенной нагрузкой на природные фитоценозы эти виды находятся под угрозой исчезновения. Для их сохранения необходимо разработать эффективные биотехнологии, позволяющие массово воспроизводить ценные генотипы без нанесения ущерба природным популяциям.

В настоящее время оптимизированы протоколы размножения *in vitro* для нескольких представителей рода *Fritillaria*, при этом показано, что процессы регенерации могут происходить двумя путями: через геммогенез или соматический эмбриогенез (Kukuleczanka et al., 1989; Sun, Wang, 1991; Gao et al.,

1999). Однако для видов рябчиков, произрастающих в горах Южной Сибири, эти технологии не разработаны, не выявлены и пути морфогенеза в культуре *in vitro*, что является фундаментальной составляющей работ, направленных на воспроизводство и сохранение гермоплазмы редких и эндемичных видов. Представляет интерес и возможность использования разрабатываемых технологий микроразмножения редких сибирских видов для воспроизведения других представителей рода – *F. camschatcensis* (L.) Ker Gawl., *F. crassifolia* Boiss. & Huet. subsp. *crassifolia*, *F. michailovskyi* Fomin, *F. ruthenica* Wikstr.

Цели и задачи исследования. Цель исследования – провести морфогистологический анализ процессов регенерации редких и эндемичных видов рода *Fritillaria* и на его основе разработать высокоэффективные системы микроразмножения и сохранения *in vitro*.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- выявить морфогенетический потенциал различных типов эксплантов (луковичных чешуй, флоральных органов) исследуемых видов в культуре *in vitro*;
- определить влияние гормональных, трофических и физических факторов на микроразмножение рябчиков;
- провести морфо-гистологические исследования процессов регенерации побегов в культуре ткани;
- разработать эффективные протоколы размножения и сохранения *in vitro* восьми редких и эндемичных видов рода *Fritillaria*.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Морфогенными зонами при регенерации побегов *F. meleagris* являются базальные части листочков околоцветника и тычинок, а также поверхность завязи, при этом морфогенетический потенциал возрастает в ряду тычинки, завязь, листочки околоцветника.

2. Состав минеральной основы среды определяет путь морфогенеза в культуре луковичных чешуй *F. meleagris*: культивирование эксплантов на одинаковом гормональном фоне на В₅ вызывает прямой геммогенез, а с использованием BDS – непрямо́й гемморизо́генез.

Научная новизна работы. Впервые проведена оценка морфогенетического потенциала различных типов эксплантов сибирских видов рябчиков в зависимости от минеральной основы сред и экзогенных регуляторов роста. Показано, что исследуемые виды различаются по скорости индукции морфогенного ответа в тканях сегментов луковичных чешуй. Проведен морфогистологический анализ процессов регенерации в культуре луковичных чешуй *F. sonnikovae* и *F. meleagris*. Впервые использованы флоральные органы как первичные экспланты для введения в культуру ткани рябчика шахматного.

Практическая значимость. Разработаны эффективные методы введения в культуру *in vitro* видов рода *Fritillaria* с использованием в качестве первичных эксплантов луковичных чешуй и флоральных органов. Оптимизированы протоколы клонального микроразмножения восьми редких и эндемичных видов рода *Fritillaria*, включая подбор минеральных основ питательных сред, а также комбинации и концентрации экзогенных регуляторов роста. Определены оптимальные режимы укоренения и адаптации пробирочных растений *Fritillaria* к нестерильным условиям *ex vitro*. Установлено положительное влияние низких температур на дифференциацию луковицы и преодоление покоя при адаптации растений. Подобраны условия для длительного беспересадочного хранения культур в условиях замедленного роста и создана коллекция *in vitro* исследуемых видов.

Апробация работы. Основные результаты исследования были представлены на юбилейной X Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Казань, 2013), I Всероссийской научно-практической конференции «Ботаническое образование в России: прошлое, настоящее и будущее» (Новосибирск, 2013), Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы сибирского садоводства», посвященной 80-летию ГНУ НИИ садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко (Барнаул, 2013), III (V) Всероссийской молодежной конференции с участием иностранных ученых «Перспективы развития и проблемы современной ботаники» (Новосибирск, 2014), Международной научной конференции

«Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений» (Минск, 2014), I Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Новосибирск, 2014), «Международной конференции по биологии и биотехнологии растений» (Алматы, 2014), XIII Международной научно-практической конференции «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии» (Барнаул, 2014), III (XI) Международной Ботанической конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ, в том числе 3 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из списка сокращений, введения, 5 глав, выводов, списка литературы, включающего 315 источников, в том числе 248 – на иностранном языке. Работа изложена на 149 страницах машинописного текста, содержит 16 таблиц, 30 рисунков.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.б.н. Новиковой Татьяне Ивановне за помощь и поддержку, оказанные при подготовке и написании диссертационной работы. Отдельная благодарность к.б.н. Эрст Анне Алексеевне за проявленный интерес к работе и помощь в обсуждении полученных результатов, к.б.н. Полубояровой Татьяне Владимировне за помощь в освоении методов световой микроскопии, а также всем сотрудникам лаборатории Биотехнологии за ценные советы.

ГЛАВА 1. СОХРАНЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ ГЕОФИТОВ МЕТОДАМИ *IN VITRO*: ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

1.1. Биотехнология сохранения растений – новая междисциплинарная наука

Биологическое разнообразие видов является основой жизни на Земле. Однако в последние десятилетия наблюдается стремительное снижение видового разнообразия, причиной которого является ухудшение экологической обстановки на планете, связанное с глобальным изменением климата, истощением природных ресурсов, экологическими катастрофами и индустриальной деятельностью человека. Важно отметить, что при исчезновении любого таксона, мы не только теряем компонент мировой флоры, но и потенциально ценный генетический ресурс, позволяющий улучшить сельско-хозяйственные культуры, либо являющийся продуцентом биологически активных соединений (Rao, 2004; Leung, 2010).

Отражением актуальности указанных проблем является разработка различных международных программ по сохранению исчезающих видов. Еще в 1992 году был принят базовый документ – Международная Конвенция о биологическом разнообразии, рассматривающая проблемы сохранения биоразнообразия *in situ* и *ex situ* (Конвенция о биологическом ..., 1992). На ее основании подготовлена российская государственная научно-техническая программа «Биологическое разнообразие» (Sokolov et al., 1994).

Существует две стратегии по сохранению генетического разнообразия: *in situ* – в естественных экосистемах с созданием особо охраняемых природных территорий (ООПТ): заповедников, заказников, национальных парков, памятников природы и прочее, а также *ex situ* – вне естественных мест обитания: коллекции ботанических садов, генные банки. Эти два подхода принципиально различаются: при сохранении *ex situ* происходит изъятие интересующего таксона

из природной среды и его выращивание в искусственно созданных условиях, а сохранение *in situ* предполагает определение ареала произрастания и мониторинг растений на месте (Maxted et al., 1997). Основными трудностями при организации ООПТ и закладке «живых» коллекций редких и уязвимых видов является создание, наблюдение и защита мест произрастания, занимающих значительные площади, а так же поражение растений вредителями и патогенами (Андреев, Горбунов, 2003; Новикова и др., 2008; Laslo et al., 2011).

Стоит отметить, что наиболее предпочтительным является охрана биологического разнообразия *in situ*, однако не всегда данный метод подходит для сохранения отдельных видов. Поэтому стратегии сохранения генофонда *ex situ* становятся все более востребованными. В их основе лежит создание коллекций редких и исчезающих растений с созданием банков семян, полевых генных банков и банков культур *in vitro*.

Создание банков семян направлено на сохранение растений с ортодоксальными семенами, хорошо переносящими высушивание и имеющих высокую всхожесть (Engelmann, Engels, 2002). Понижение влажности и температуры при хранении замедляет метаболические процессы, и тем самым тормозит старение семян (Roberts, 1973). Благодаря созданию генетических банков семян на начало нового столетия в них хранилось примерно 6,1 млн. образцов (FAO..., 1996). Полевые генные банки или «живые» коллекции, а также коллекции *in vitro* предназначены для сохранения растений с неортодоксальными (рекальцитратными) семенами и/или видов, размножающихся вегетативно (Pence, Sandoval, 2002; Engelmann, 2011). Этими методами сохраняют многие луковичные геофиты, среди которых редкие виды родов *Fritillaria* (Седельникова, 2008), *Ornithogalum* L. (Павлова, 2006), *Lilium* L. (Данилова и др., 2005), *Allium* L. (Амельченко и др., 2013; Мулдашев и др., 2013), *Leucojum aestivum* L., *Galanthus woronowii* Losinsk. (Слепченко, 2013). Поскольку «живые» коллекции создаются и поддерживаются главным образом в ботанических садах, они характеризуются высоким межвидовым, но низким внутривидовым генетическим разнообразием (Engelmann, Engels, 2002). Такие коллекции чрезвычайно уязвимы

из-за процессов случайного дрейфа генов, искусственного отбора, накопления мутаций и поражения вредителями (Hamilton, 1994). Для видов, естественное возобновление которых в природе ослаблено или затруднено, от устойчивости воспроизводства *ex situ* зависит сохранность их генофонда в целом. При этом становится необходимым поиск и разработка новых подходов сохранения генетического материала. Решением выше перечисленных проблем может быть использование методов биотехнологии, а именно культивирование изолированных клеток, тканей и органов растений на искусственных питательных средах и создание банка культур *in vitro*.

Биотехнологический подход обладает рядом преимуществ перед традиционными методами сохранения видов, находящихся под угрозой исчезновения: нет необходимости в больших площадях, занятых маточными и размножаемыми растениями, в регулярном уходе за посадками, исключаются болезни растений и, как следствие, потеря материала (Reed et al., 2011). Так же подход позволяет осуществлять восстановление численности охраняемых таксонов путем создания искусственных популяций на территории природного ареала (репатриация) (Tandon, Kumaria, 2005). Одним из наиболее привлекательных преимуществ сохранения *in vitro* является возможность получения стерильных культур видов (редких, эндемичных) без изъятия из природных местообитаний, что позволяет предотвратить разрушение фитоценозов (Leung, 2010; Reed et al., 2011). Это становится особенно актуальным в работах по сохранению луковичных растений, естественные популяции которых страдают как от сбора на букеты, так и выкопки луковиц для дальнейшего выращивания и заготовки в качестве лекарственного сырья (Слепченко, 2013).

В основу биотехнологического подхода к сохранению генетических ресурсов *in vitro* заложено поддержание жизнеспособности пробирочных растений или их отдельных органов в течение длительного периода. Так, в коллекции Королевского ботанического сада (Кью, Великобритания) в банке *in vitro* поддерживается более 3 тыс. таксонов, большинство из которых редкие и исчезающие виды (Sarasan et al., 2006). В нашей стране в ряде ботанических садов

также имеются генетические банки *in vitro*: ГБС РАН (800 наименований), Волгоградский ботанический сад (238), ГУ ВРБС (94), ЦСБС СО РАН, БИН им. Комарова РАН и другие. Особенностью этих коллекций является то, что они взаимно дополняют, а не дублируют друг друга (Молканова и др., 2010).

В настоящее время сохранение растений *in vitro* можно осуществлять тремя путями:

- Хранение в условиях активного роста;
- Депонирование в условиях замедленного роста при пониженных температурах (+2-15 °С);
- Криоконсервация в жидком азоте (-196 °С).

Хранение растений *в условиях активного роста* позволяет успешно сохранять, размножать и реинтродуцировать многие редкие виды, для которых использование семян затруднено их низкой всхожестью и/или требовательностью к условиям произрастания. Основу метода составляет периодическое пассирование культур на свежие питательные среды, что обеспечивает поддержание регенерационного потенциала культивируемых растений на постоянно высоком уровне и, следовательно, их устойчивый рост. При этом подбор оптимальных условий способствует культивированию растений в течение многих лет без видимых признаков онтогенетического старения.

Данный метод широко используется для сохранения *in vitro* как двудольных, так и однодольных растений, являющихся представителями различных жизненных форм. При этом для геофитов характерны высокие показатели регенерации на искусственных питательных средах и относительно легкий этап адаптации к естественным условиям обитания. Как отмечает И.И. Сикура с соавторами, такие особенности размножения и сохранения *in vitro* позволяют получить из ограниченного количества растений-доноров большой объем посадочного материала для восстановления природных популяций (Сикура и др., 2008). При этом для сохранения редких и исчезающих видов предпочтительно использовать культуры апекса побега и пазушные почки.

Активация существующих в растении меристем позволяет получить генетически идентичное потомство (Rani, Raina, 2000). Кроме того использование этих эксплантов сопровождается оздоровлением материала, поскольку апикальная меристема побега характеризуется минимальным содержанием вирусов, которые могут присутствовать в тканях, не вызывая видимых негативных эффектов (Grout, 1990; Wang, Valkonen, 2009).

В то же время, хранение растений в условиях активного роста нередко сопряжено с постепенным снижением морфогенетического потенциала длительно пассируемых культур и возникновением соматклональной изменчивости (Вечернина, 2006). Соматклональная изменчивость, с одной стороны, приводит к потере чистоты генотипа, сохраняемых видов, но с другой – позволяет получать новые линии для популяций, подверженных сильной регрессии.

Наиболее распространенным способом хранения растений *in vitro* является *хранение в условиях замедленного роста*, характеризующееся сокращением вегетативной активности сохраняемого материала. Основным преимуществом этого подхода является возможность длительного депонирования культур с меньшими затратами на хранение, что обеспечивается увеличением интервалов между субкультивированиями (Cordeiro et al., 2014). Такое среднесрочное хранение (от нескольких месяцев до 4 лет в беспересадочной культуре) большинства видов сосудистых растений протекает при температуре +1-4 °С, обычно при пониженной освещенности или в темноте, на питательной среде без регуляторов роста, в некоторых случаях при добавлении в среду ингибиторов роста – ретардантов (манит, сорбит, абсцизовая кислота), при снижении концентрации сахарозы в среде, либо разбавлении минеральной основы (Bell, Reed, 2002; Митрофанова, 2009; Engelmann, 2011). При этом длительное беспересадочное субкультивирование при внесении в питательную среду осмотиков, как ингибиторов роста, объясняется снижением метаболической активности тканей культивируемых растений (Bekheet, 2011). Установлено, что оптимальное сочетание условий культивирования позволяет увеличить как период субкультивирования, так и жизнеспособность эксплантов. При этом, как

отмечают О.И. Молканова с соавторами, хранение растений-регенерантов из сем. Liliaceae при пониженных температурах (+3-7 °С), слабой освещенности на питательной среде ½ MS, дополненной 20,0 г/л сахарозы и 5,0-7,0 мг/л абсцизовой кислоты позволяет увеличить длительность одного пассажа до 24 месяцев (Молканова и др., 2010). Использование низких температур, повышенной концентрации сахарозы (90,0 г/л) в питательной среде, а так же ингибитора роста – хлор холин хлорида позволило сохранять жизнеспособными микрорастения различных садовых культур на протяжении 12-24 месяцев (Митрофанова, 2007). Необходимым условием для такого депонирования является период адаптации к низкой температуре: его отсутствие, либо недостаточная продолжительность приводят к гибели культивируемых растений. Однако низкие положительные температуры не всегда подходят для длительного хранения различных таксонов. Так, хранение тропических видов, чувствительных к температурному режиму, осуществляется при температуре +15-20 °С и даже выше на модифицированных питательных средах (Paunescu, 2009).

При достижении культурами критического срока хранения их переносят на свежие питательные среды для стимуляции роста, а затем начинают новый цикл хранения *in vitro*. Однако описанные подходы не позволяют решить основную проблему, связанную с высокой затратностью технологий, из-за необходимости периодического пассирования культур.

Полностью отказаться от субкультивирований возможно лишь при полной остановке митотической активности и метаболических процессов и, как следствие, прекращении роста сохраняемых растений, что достигается использованием *методов криоконсервации*. Длительного хранения меристем можно добиться несколькими методами криосохранения: медленная заморозка, витрификация (быстрая заморозка) и инкапсуляция-дегидратация. Первый метод основан на медленном охлаждении (чаще до -40 °С), с использованием криопротекторов, и быстрым погружением в жидкий азот, с последующим хранением и оттаиванием (Cruz-Cruz et al., 2013). Второй метод – витрификация – включает дегидратацию образцов перед быстрым охлаждением путем

воздействия высококонцентрированным криопротекторным раствором либо путем воздушной сушки, что препятствует в дальнейшем формированию внутриклеточного льда (Fahy et al., 1984). Метод инкапсуляции-дегидратации активно используется для создания искусственных семян: экспланты инкапсулируют в альгинатные шарики, подрастив их в жидкой среде, частично подсушивают (воздушный поток, силикагель) и затем быстро погружают в жидкий азот (Gonzalez-Arnao et al., 2003; Engelmann, 2011).

На сегодняшний день в жидком азоте хранятся суспензионные и каллусные культуры, апикальные меристемы, покоящиеся почки, изолированные зародыши, семена, соматические эмбриониды, а также пыльца. Т.А. Матсумото с соавторами была успешно разработана технология криоконсервации *Lilium japonicum* Thunb., основанная на витрификации апикальных меристем луковичных чешуй, при этом через 4 недели после криоконсервации частота побегообразования достигала 80 % (Matsumoto et al., 1995). Этот метод успешно применялся и для пяти других генотипов лилий (Matsumoto et al., 1995). Однако криоконсервация очень трудоемкий и дорогостоящий процесс, успех которого зависит от тщательной проработки всех этапов и точного соблюдения технологии. Криоконсервация меристем обеспечивает важный, ранее недостающий тип долгосрочного хранения гермоплазмы растений, размножаемых вегетативно (Bell, Reed, 2002).

Таким образом, развивается новая междисциплинарная наука – биотехнология сохранения растений, дополняющая существующие традиционные методы сохранения биоразнообразия *ex situ* современными инструментами, обеспечивающими возможность устойчивого управления генетическими ресурсами (Benson, 2002). При этом культура *in vitro* служит источником оздоровленного растительного материала, используемого для размножения, закладки маточных насаждений, обмена коллекциями, а также являющегося источником эксплантов для криоконсервации (Cruz-Cruz et al., 2013). Необходимым условием успешного хранения растений в условиях *in vitro* является обеспечение оптимальных условий культивирования. Эффективный подбор источника первичного экспланта, питательных сред, физических и

химических факторов культивирования позволяет осуществлять длительное хранение растений с созданием банка *in vitro*.

1.2. Морфогенез в культуре *in vitro*: базовые концепции

Морфогенез это сложный процесс формообразования растений, регуляция которого осуществляется на клеточном, тканевом и организменном уровнях (Журавлев, Омелько, 2008; Шевелуха и др., 2008). Исследование морфогенетических путей в культуре *in vitro* представляет особый интерес, так как отсутствие организменного контроля развития и использование регуляторов роста позволяет получить широкий спектр морфогенетических реакций, моделирующих процессы формообразования растений *in vivo* (Журавлев, Омелько, 2008).

Наиболее полное описание разнообразия путей морфогенеза *in vivo* и *in vitro*, приводящих к образованию новой особи, представлено в монографической сводке Т.Б. Батыгиной «Эмбриология цветковых растений» (Батыгина, 1999, 2000) (рис. 1).

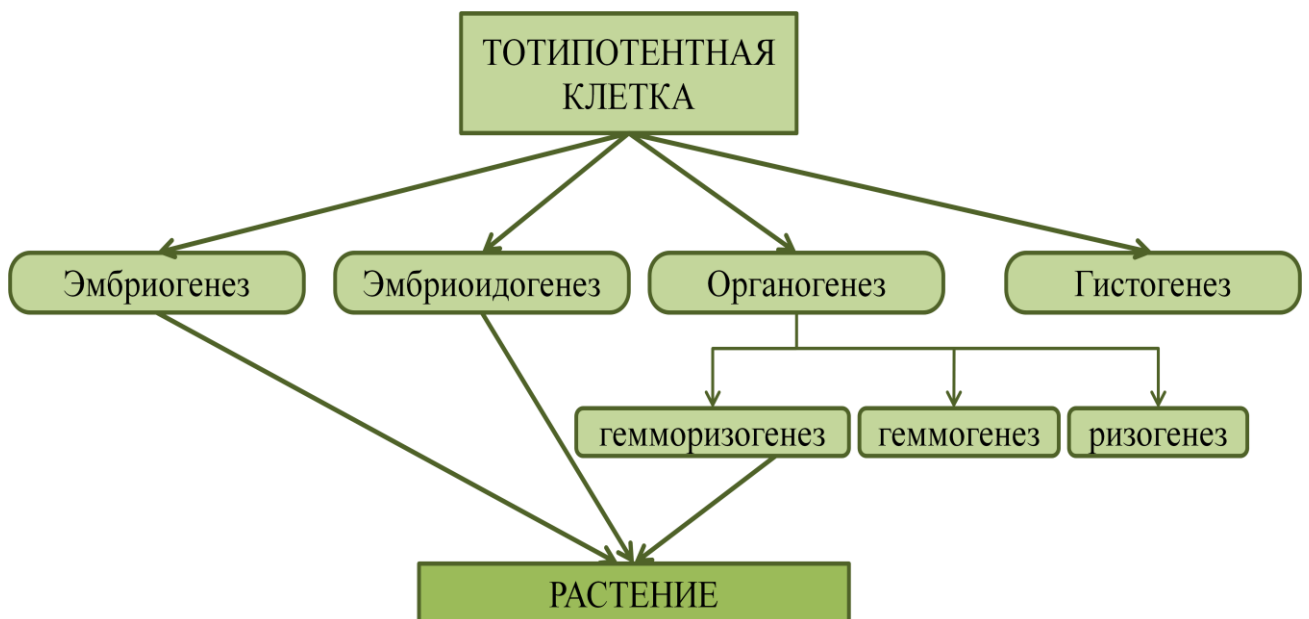


Рис. 1. Пути морфогенеза при образовании нового растительного организма (Батыгина, 2000)

В культуре *in vitro* только два пути морфогенеза приводят к регенерации целого растения *de novo*: эмбриоидогенез – соматический эмбриогенез и органогенез побегов с последующим ризогенезом – гемморизогенез (Phillips, 2004). Оба пути морфогенеза могут реализоваться как через промежуточную стадию каллусообразования (непрямая регенерация), так и минуя ее (прямая регенерация) (Hicks, 1980). При этом, как уточняют Д.Л. Вердейл с соавторами, плюрипотентность клеток лежит в основе органогенеза, а тотипотентность – в основе соматического эмбриогенеза (Verdeil et al., 2007).

Органогенез – это процесс формирования органов *de novo* как в условиях *in vivo*, так и *in vitro* из меристематических или немеристематических тканей (Schwarz et al., 2005). Микроразмножение из предсуществующих меристем через культуру пазушных почек или нодальных сегментов является наиболее востребованной технологией, на которой базируется коммерческое производство ценных генотипов растений (Kane, 2005). Адвентивный органогенез представляет путь формирования органов *de novo* из дифференцированных немеристематических тканей (Geneve, 2011). Таким путем могут формироваться побеги, корни, цветки, подземные органы геофитов (луковички, клубни).

Впервые концепция компетенции, детерминации и дифференциации тканей в процессе органогенеза была представлена в серии работ М.Л. Христиансона и Д.А. Ворника на основе изучения процессов регенерации органов из листовых эксплантов выюнка полевого (*Convolvulus arvensis* L.) (Christianson, Warnick, 1983, 1984, 1985). Авторы выделили три стадии органогенеза:

1. Приобретение клетками экспланта органогенной компетентности, определяемой как способность к реакции на гормональные сигналы;
2. Детерминация компетентных клеток под воздействием экзогенных регуляторов роста;
3. Собственно морфогенез, протекающий независимо от экзогенных регуляторов роста.

На основании этой концепции разработано несколько схем, детализирующих отдельные стадии процесса органогенеза *in vitro*. Одна из них представлена О.Д. Шварцом с соавторами (рис. 2) (Schwarz et al., 2005).

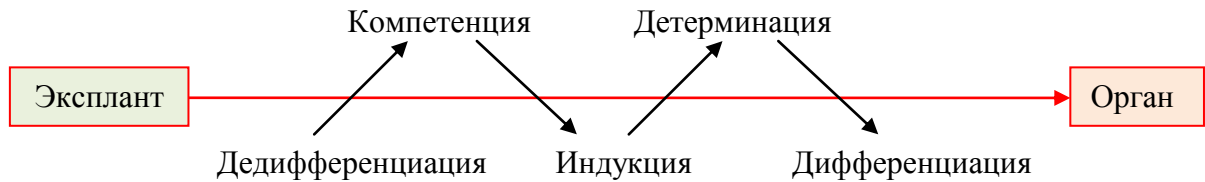


Рис. 2. Этапы органогенеза (Schwarz et al., 2005 с изменениями)

Процесс *дедифференциации* заключается в переходе тканей экспланта к менее организованному и одновременно более «подвижному» состоянию. По степени дедифференциации можно выделить мультипотентные, плюрипотентные и тотипотентные клетки. Мультипотентные клетки способны дать начало нескольким типам клеток, но в пределах одной клеточной линии (Hochedlinger, Plath, 2009), плюрипотентные клетки могут сформировать практически любой тип клеток, однако их компетенции недостаточно для развития нового организма (Komatsu et al., 2011) и только тотипотентные клетки способны дать начало всем типам клеток, составляющих растительный организм (Verdeil et al., 2007). Приобретение клеткой *компетенции* является важным процессом и начинается с реакции на специфические гормональные сигналы, с последующими перестройкой присущей клетке программы развития и первых клеточных делений, приводящих к образованию меристематического центра или меристемоида (Dhaliwal et al., 2003; De Almeida et al., 2015). Стадия *индукции* протекает между приобретением клетками компетенции и полной их *детерминацией* и завершается, когда клетки или группы клеток способны дать начало побегам либо корням. На данном этапе происходит полная детерминация программы клеточного развития. Стадия *дифференциации* характеризуется морфологическим обособлением и окончательным развитием того или иного органа (побег, корень) (Schwarz et al., 2005).

В культуре *in vitro* из тканей экспланта либо каллуса можно индуцировать развитие почек либо корней – гемо- и ризогенез соответственно. Часто при непрямом органогенезе эти два процесса могут происходить сопряжено: сначала в морфогенном каллусе на поверхности меристематического очага закладываются почки, затем в толще каллуса эндогенно формируется корень (Батыгина и др., 2010; Круглова, Сельдимирова, 2011). Подобный тип органогенеза называют гемморизогенез. Как отмечают Н.Н. Круглова и О.А. Сельдимирова, в культуре каллусов пшеницы при гемморизогенезе в первую очередь формируется почка, по мере достижения ею определенной степени развития (при формировании листовых зачатков первого порядка) начинается закладка меристем корня в базальной части каллуса (Круглова, Сельдимирова, 2011). Постепенно между почкой и корнем устанавливается сосудистая связь, и происходит формирование единой системы (Круглова, Сельдимирова, 2011).

Соматическим эмбриогенезом называется процесс, при котором соматические клетки растений дифференцируются с образованием эмбриоидов – зачатков целых организмов – в результате серии морфологических и биохимических изменений. Соматические эмбриоиды по своей морфологии схожи с зиготическими зародышами: имеют 2 меристематических полюса (биполярность), характерные зародышевые органы, отсутствует сосудистая связь с родительской тканью (Schmidt et al., 1997; Jimenez, 2005; Komamine et al., 2005). В этом проявляется параллелизм в развитие половых зародышей и соматических эмбриоидов *in vivo* и *in vitro* (Батыгина, 1997 б; Батыгина и др., 2010). Однако в отличие от зиготических зародышей, полученных при слиянии родительских гамет (гетерофазная репродукция), соматические эмбриоиды формируются из соматических клеток растений и полностью повторяют генотип родителя (гомофазная репродукция) (Батыгина, 2000; Raghavan, 2000; Phillips, 2004).

Впервые соматический эмбриогенез (СЭ) *in vitro* наблюдали в 1958 году Ф.С. Стюард с соавторами в суспензионной культуре *Daucus carota* L. (Steward et al., 1958), на сегодняшний день СЭ получен для большого количества видов растений. Эффективность индукции СЭ зависит от ряда факторов, среди которых

генотип и тип экспланта, минеральный состав культуральных сред, регуляторы роста и условия культивирования (освещенность, температура, pH) (Gray, 1990; Jimenez, Bangerth, 2001; Митрофанова, 2009).

Начало соматическому эмбриоиду может дать одна клетка либо группа клеток (рис. 3). В случае развития эмбриоидов из одной клетки наблюдаются согласованные клеточные деления, приводящие к образованию суспензора, соединяющего эмбриоид с тканью экспланта (Williams, Maheswaran, 1986; Quiroz-Figueroa et al., 2002). Однако, когда эмбриоид имеет многоклеточное происхождение, пролиферация на ранних стадиях развития приводит к возникновению на поверхности экспланта различных выпячиваний (протуберанцев) (Gill et al., 1998). Независимо от пути развития соматические эмбриоиды могут формироваться непосредственно из тканей экспланта (прямой СЭ), либо их развитию может предшествовать образование каллуса (непрямой СЭ). Особым случаем СЭ является вторичный соматический эмбриогенез, когда формирующийся эмбриоид останавливается в своем росте и не развивается в растение, но дает начало эмбриоидам следующих порядков (Thomas et al., 1976).

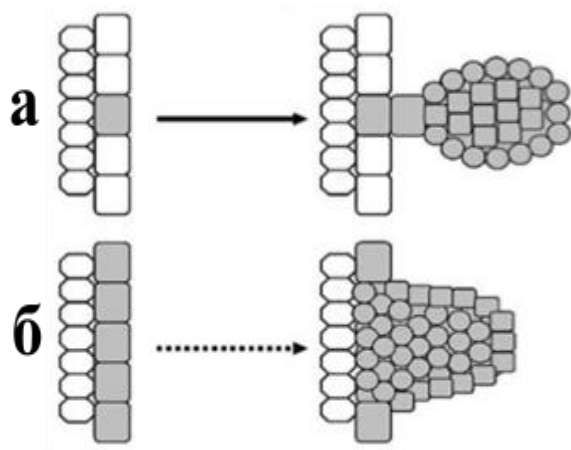


Рис. 3. Схематическое изображение развития соматического эмбриоида: а – из одной клетки; б – из группы клеток (Quiroz-Figueroa et al., 2006 с изменениями)

Для соматических эмбриоидов характерны те же стадии эмбриогенеза, что и для зиготических зародышей. При этом развитие эмбриоидов двудольных и однодольных несколько отличается, как и в условиях *in vivo* (Quiroz-Figueroa et al., 2006).

В ходе соматического эмбриогенеза можно выделить пять основных этапов:

1. Инициация эмбриогенных клеток;
2. Пролиферация проэмбриогенных комплексов;
3. Развитие эмбриоидов;
4. Созревание соматических эмбриоидов;
5. Регенерация растений.

Процесс *инициации эмбриогенных клеток* может происходить несколькими путями (Plant development ..., 2005):

1) если соматические эмбриоиды развиваются из недифференцированной эмбриональной ткани (при использовании незрелых зиготических зародышей в качестве первичных эксплантов), происходит только процесс увеличения количества существующих эмбриональных клеток;

2) если индукция СЭ протекает в неэмбриональной ткани, то только небольшая часть клеток первичного экспланта способна стать эмбриогенной. *Пролиферация* эмбриогенных клеток приводит к образованию проэмбриогенных комплексов. Степень дифференциации проэмбриогенных комплексов в присутствии регуляторов роста – ауксинов варьирует у различных видов, при этом по мере деградации ауксинов в питательной среде (без переноса на свежие культуральные среды) отмечается начало развития соматических эмбриоидов (Plant propagation ..., 2008). *Развитие соматических эмбриоидов* заключается в превращении проэмбриогенных комплексов в эмбриоиды. Этот переход имеет большое значение в СЭ, сложность данного процесса объясняет неспособность многих эмбриогенных клеточных линий формировать хорошо развитые эмбриоиды. Этап *созревания соматических эмбриоидов* характеризуется морфологическими и биохимическими изменениями. На этой стадии происходит увеличение семядолей, как запасяющих органов, в результате процесса активного накопления питательных веществ, также отмечается уменьшение содержания воды и снижение активности метаболизма (Thomas, 1993; Jimenez, 2005). Развитие у соматических эмбриоидов на данном этапе устойчивости к обезвоживанию позволяет получать больше сформированных микрорастений в конце процесса

эмбриогенеза. Завершающим этапом СЭ является *регенерация растений*. Как правило, этот этап протекает на питательных средах без регуляторов роста. В итоге формируются растения, имеющие апекс побега и корня, собственную проводящую систему, не связанную с сосудистыми элементами родительской ткани, обладающие полярным ростом и способные самостоятельно синтезировать биологически активные вещества, необходимые для поддержания роста и развития.

Таким образом, понимание процессов морфогенеза и регенерации растений *in vitro* имеет ключевое значение как для разработки протоколов микроразмножения, так и для фундаментальных исследований биологии развития растений (Duclercq et al., 2011). При этом культура *in vitro* может служить модельной системой для изучения морфогенеза растений, поскольку его пути как в условиях *in vivo*, так и в условиях *in vitro* универсальны (Журавлев, Омелько, 2008).

1.3. Факторы, влияющие на процесс морфогенеза и регенерации в культуре *in vitro*

На успех регенерации побегов *in vitro* влияют различные факторы такие, как генотип, тип экспланта, минеральные компоненты питательной среды, регуляторы роста растений, условия культивирования (Lee et al., 1997; Marinangeli et al., 2005; Lim et al., 2012; Delporte et al., 2014). Ниже будут рассмотрены факторы, оказывающее наибольшее влияние на процессы морфогенеза в культуре *in vitro*.

Эксплант. Эксплант – фрагмент ткани или органа, самостоятельно инкубируемый на питательной среде или используемый для получения первичного каллуса (Чайлахян и др., 1982). Основными факторами, определяющими морфогенетический потенциал экспланта, являются генотип растения, стадия клеточного цикла клеток экспланта, наличие или возможность транспорта эндогенных регуляторов роста и метаболизм клеток. Для многих

видов растений экспланты, полученные из различных органов, значительно различаются по скорости регенерации и роста. При этом на успех регенерации в культуре *in vitro* оказывает влияние не только источник экспланта, но также возраст ткани и самого растения-донора, подготовка и способ размещения экспланта на питательной среде (Bhojwani, Dantu, 2013).

Наиболее часто используют экспланты, имеющие меристематическую активность, такие как верхушка побега и корня, пазушные почки. Подобные экспланты обладают высокими морфогенетическим потенциалом, скоростью клеточных делений и способны накапливать и/или продуцировать необходимые вещества, регулирующие рост (ауксины и цитокинины) (Akin-Idowu et al., 2009). Эффективность использования апикальных и пазушных почек объясняется также тем, что для развития имеющихся почек достаточно наличие триггера, тогда как при работе с корнями, листьями и прочими эксплантами, не имеющими меристематической активности, сначала требуется индуцировать формирование меристематических клеток и лишь затем начнется регенерация (Lombardi et al., 2007; Husain et al., 2010). Апикальные и латеральные меристемы активно используют для размножения *in vitro* различных видов растений *Lilium longiflorum* Thunb. (Nhut et al., 2001), *Lilium philippinensis* Baker, (Zamora, Gruezo, 1999), *Ansellia africana* Lindl. (Vasudevan, Van Staden, 2011). При этом данный тип эксплантов широко используется при работе с редкими и исчезающими видами, так как обеспечивает максимальное генетическое соответствие регенерантов материнским растениям.

Помимо этого для введения в культуру *in vitro* используют семена и изолированные зародыши: *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. (Mirici et al., 2005), *Iris ensata* Thunb. (Boltenkov et al., 2007), *Muscari mirum* Speta (Nasircilar et al., 2011). Однако часто использование семян для введения в культуру *in vitro* осложняется их глубоким покоем. Так, для растений рода *Fritillaria* характерен глубокий морфо-физиологический покой и слабая дифференциация зародыша, что затрудняет их использование в качестве первичных эксплантов (Поздова, Разумова, 1997; Николаева и др., 1999). Различные процедуры и методы

прерывания покоя семян, такие как механическая и химическая скарификации, выщелачивание, обработка горячей водой, холодовая и тепловая стратификации, замораживание и обработка KNO_3 были испытаны на семенах *F. imperialis* L. (Surki, Nazari, 2013). При этом замораживание (-20 °C) привело к улучшению прорастания семян только на 5%, в то время как холодовая стратификация семян в течение 10 недель при +4 °C привела к полной их всхожести (Surki, Nazari, 2013). Как отмечает ряд авторов, трудности в этом случае связаны с необходимостью длительной тепловой и холодовой стратификаций (до 170 дней) (Zhang et al., 1992; Carasso et al., 2011; Ветчинкина и др., 2012). Использование различных температурных режимов индуцирует окончательное доразвитие зародыша, устраняет физиологический механизм торможения и стимулирует прорастание семян в культуре *in vitro*.

Широко используемыми источниками первичных эксплантов также являются листья, флоральные органы, луковичные чешуи, части стебля. При этом в тканях экспланта происходит закладка меристем адвентивных побегов *de novo*, в отсутствие каллуса характеризующихся большой генетической стабильностью и отсутствием химер (Varshney et al., 2001). Распространенным типом эксплантов являются листовые органы (семядоли, листовые пластинки, черешки). Морфогенетический потенциал листьев можно объяснить высокими дозами эндогенных регуляторов роста, а также активностью интеркалярной меристемы в черешке и основании листа (Iapichino et al., 1991; Yancheva et al., 2003). Регенерационная активность этой зоны, возможно, сопряжена с наличием ассимилятов, при этом увеличение содержания биологических веществ происходит по направлению от верхушки листа к его основанию (Высоцкий, Упадышев, 1992). Так, выявление регенерационного потенциала различных частей листовой пластинки у *Lilium philippinensis* показало, что наибольшим потенциалом обладает основание листа (Zamora, Gruezo, 1999). При этом в верхней и средней частях листа морфогенетические процессы не наблюдались (Zamora, Gruezo, 1999).

Использование флоральных органов обеспечивает сохранение материнского растения, что особенно важно при работе с редкими видами, позволяет избежать высокого уровня контаминации, характерного для эксплантов от подземных органов. В работе с луковичными растениями 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).

Для индукции культуры *in vitro* видов крокуса, являющихся источниками кроцина и пикрокроцина – важных вторичных метаболитов, в качестве первичных эксплантов широко используют флоральные органы (завязи, столбики, листочки околоцветника) (Sarma et al., 1990; Loskutov et al., 1999; Ebrahimzadeh et al., 2000). При культивировании крокуса с использованием в качестве эксплантов завязи исследователи отмечали процессы прямой регенерации микропобегов (Bhagyalakshmi, 1999) либо непрямого органогенеза с образованием листовых и рыльцеподобных структур (Namin et al., 2010). При культивировании флоральных эксплантов (цветоложе, завязь, рыльце, доли околоцветника) тюльпана сорта «Lucky Strike» было установлено, что наибольшей способностью к морфогенезу обладали экспланты неоплодотворенной завязи и цветоложа, количество формирующихся микропобегов на эксплант варьировало от 2 до 8 штук (Ахметова, 2009). Однако при введении в культуру *in vitro* редких азиатских видов рода *Lilium* наиболее эффективным оказалось использование в качестве первичного экспланта тычиночной нити с пыльником, имеющей в основании фрагмент цветоложа (Набиева, 2008). В работах с лилиями при использовании флоральных органов на этапе инициации культуры *in vitro* также отмечали формирование морфогенного каллуса, при этом в культуре *L. speciosum* Thunb. протекал не прямой органогенез (Chang et al., 2000), а при работе с *L. longiflorum* не прямой соматический эмбриогенез (Tribulato et al., 1997).

При культивировании луковичных и клубнелуковичных растений очень часто в качестве первичного экспланта используют части подземных органов. Так, при введении в культуру *in vitro* использование сегментов чешуй и клубней

оказалось эффективным для представителей родов *Lilium* (Lian et al., 2003; Marinangeli et al., 2003; Joshi, Dhar, 2009), *Muscari* Mill. (Suzuki, Nakano, 2001; Uranbey et al., 2010), *Allium* (Seabrook, 1994), *Polygonatum* L. (Sangavai, Chellapandi, 2008), *Fritillaria* (Gao et al., 1999; Rahimi et al., 2013), *Galanthus* L. (Перегудова, Ширнин, 2008), *Nerine* Herb. (Vishnevetsky et al., 2003). При этом имеются исследования, в которых отмечаются различия регенерационного потенциала чешуй в зависимости от их онтогенетического состояния. Так, О.А. Чуриковой установлено, что в культуре лилий и гиацинтов регенерация активнее в тканях внутренних чешуй луковицы по сравнению с внешними (Чурикова, 2000). При этом, как известно регенерация луковичек протекает преимущественно в базальной части луковичной чешуи (Marinangeli et al., 2003; Khawar et al., 2005). Также необходимо помнить о наличии периода покоя, позволяющего переживать геофитам неблагоприятные сезоны года. Физиологические механизмы, обеспечивающие сохранность луковицы, вызывают замедление морфогенетических процессов при использовании покоящихся луковиц в качестве источников первичных эксплантов. В работе с *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss. было установлено, что в условиях Ирана наиболее благоприятным сезоном для индукции регенерационных процессов в тканях луковичных чешуй является ранняя зима (Azadi, Khosh-Khui, 2007). Ранее важность сезона года для индукции побегообразования в культуре *in vitro* лилий отмечал в своем исследовании Ш.М. Робб (Robb, 1957).

Значение также имеет возраст материнского растения, чем он меньше, тем интенсивней идет рост побегов. Возраст экспланта определяет различия в уровне эндогенных регуляторов роста. Так, С. Такаяма и М. Мисава при культивировании лилий было установлено, что наибольшим регенерационным потенциалом обладают чешуи молодых луковиц или внутренние чешуи более зрелых луковиц (Takayama, Misawa, 1980). Подобные результаты были получены Е.В. Мокшиным при введении в культуру ЖТА-гибридов лилий (Мокшин, 2005). В то же время имеются данные о том, что и молодые, и старые луковичные чешуи *Lilium speciosum* обладают равной регенерационной активностью (Robb, 1957).

Результаты, подтверждающие это предположение, получены также при культивировании различных видов, включая *Cercis canadensis* L. (Distabanjong, Geneve, 1997), *Morus alba* L. (Thomas, 2003) и *Sapindus trifoliatus* L. (Asthana et al., 2011).

Часто для стимуляции регенерационной активности первичный эксплант предварительно разделяют на части перед инокуляцией на питательную среду. Этот шаг подготовки важен, так как сохранение, либо удаление соседних тканей может влиять на тип ответа, полученного в культуре *in vitro* (Bhojwani, Dantu, 2013). Поранения экспланта вызывают морфогенный ответ, характерный для естественных условий, когда растения обрезают, скашивают, либо они подвергаются другим механическим повреждениям, при этом в культуре ткани образуется каллус и/или протекает прямой органогенез (Bhatia et al., 2005). Р. Би с соавторами использовали в качестве первичного экспланта зрелые зиготические зародыши *Triticum* L., при этом исследователи незначительно повреждали зародышевый корешок и почечку, чтобы добиться активации каллусогенеза и дальнейшего формирования соматических эмбриоидов (Bi et al., 2007). Однако рядом исследователей установлено, что частичное повреждение первичного экспланта оказывает негативный эффект на регенерацию *in vitro*. Подобные результаты были получены Л. Бакчета с соавторами при культивировании декоративных сортов лилий: мелкие надрезы листовой пластинки не способствовали формированию побегов (Vacchetta et al., 2003).

Размер первичного экспланта также оказывает влияние на регенерацию *in vitro*. Д. Нут с соавторами установили, что использование сегментов апекса побега *Lilium longiflorum* высотой 1 мм способствовало 100 % выживанию эксплантов и лучшей регенерации побегов, тогда как уменьшение высоты до 0,5 мм сопровождалось значительным некрозом ткани. Авторы отмечали, что самая высокая частота регенерации была характерна для сегментов наиболее близких к конусу нарастания побега (Nhut et al., 2001). В работе Р. Пиерик и А. Пост отмечена зависимость активности регенерации от размера первичного экспланта в культуре гиацинта: количество формирующихся микролуковичек

возрастало с увеличением размера экспланта, при этом необходимым условием было наличие базальной части чешуи, а также большая длина экспланта к его ширине (Pierik, Post, 1975).

Ориентация экспланта на питательной среде может иметь значение при индукции органогенеза *in vitro*, при этом важно способны ли клетки изолированной ткани или органа транспортировать ионы водорода и калия через плазматическую мембрану (Chen, Ziv, 2005). Эксплант может быть размещен на питательной среде полярно (физиологическим основанием в среде) или аполярно (основанием не в среде) для гипокотилей и побегов, либо адаксиальной или абаксиальной стороной для листьев и семядолей. Так, наибольшей регенерационной активностью обладали экспланты луковичных чешуй лилий с вертикальным расположением на питательной среде и обратной полярностью (Мокшин, 2005). Д. Чен и М. Зив было отмечено, что ориентация сегментов оси соцветия *Narcissus tazetta* L., используемых в качестве первичных эксплантов, оказывает влияние на скорость регенерации *in vitro* (Chen, Ziv, 2005). Полярная ориентация эксплантов способствовала развитию адвентивных почек на 40-50 день, тогда как при аполярном размещении почки формировались лишь к концу 3 месяца культивирования. Такие различия исследователи объясняют полярностью транспорта ауксинов в растении: создается электрический потенциал положительный в апексе и отрицательный в основании побега (Raven, 1979), инвертированная ориентация экспланта нарушает поступление ауксинов из питательной среды (Chen, Ziv, 2005). Наиболее часто ориентация на среде играет важную роль при использовании в качестве первичных эксплантов листовых органов растения. Различия в морфогенном ответе могут объясняться разным анатомическим строением адаксиальной и абаксиальной сторон листа: наличие кутикулы, количество устьиц, близость к полисадному мезофиллу (Fahn, 1990).

Регуляторы роста растений. Рост растений и процессы развития, такие как, прорастание семени, удлинение стебля, развитие и рост листьев, цветение, образование и созревание плодов контролируется регуляторами роста, действующими в очень низких концентрациях (Garay-Arroyo et al., 2012).

Вещества, синтезируемые в растении и регулирующие его рост, принято считать эндогенными фитогормонами, однако существуют их синтетические аналоги, используемые в культуре ткани – экзогенные регуляторы роста растений (Plant development ..., 2005). При этом синтетические регуляторы роста соответствуют и зачастую превосходят по своей биологической активности и эффективности природные соединения (Varshney, Anis, 2014). Применение экзогенных регуляторов роста в культуре изолированных тканей и органов растений объясняется небольшими размерами первичных эксплантов и их неспособностью самостоятельно управлять ростом и развитием в культуре *in vitro*. Добавление регуляторов роста позволяет стимулировать морфогенетический потенциал эксплантов и процессы регенерации *in vitro*.

Существует пять основных классов регуляторов роста, широко используемых в культуре *in vitro*:

- Ауксины;
- Цитокинины;
- Гиббереллины;
- Этилен;
- Абсцизовая кислота.

Наиболее важными экзогенными регуляторами роста в культуре ткани являются цитокинины и ауксины. Еще в 1957 году Ф. Скугом и К.О. Миллером было обнаружено совместное регуляторное действие этих веществ на морфогенез в каллусной культуре табака (Skoog, Miller, 1957). Исследуя влияние ауксинов и цитокининов на возобновление и поддержание делений клеток, авторы наблюдали, что образование органов зависит от определенных соотношений этих регуляторов роста. В ходе эксперимента было установлено, что при относительно высоком уровне ауксинов по отношению к цитокининам наблюдается ризогенез, смещение баланса в другую сторону вызывает побегообразование. На основании полученных данных Ф. Скугом и К.О. Миллером была выдвинута концепция, согласно которой тот или иной тип органогенеза можно индуцировать, изменяя соотношение ауксинов и цитокининов в культуральной среде (Skoog, Miller, 1957)

(рис. 4). Эта теория дала начало многочисленным исследованиям, описывающим влияние регуляторов роста на морфогенез двудольных и однодольных растений в культуре *in vitro*.

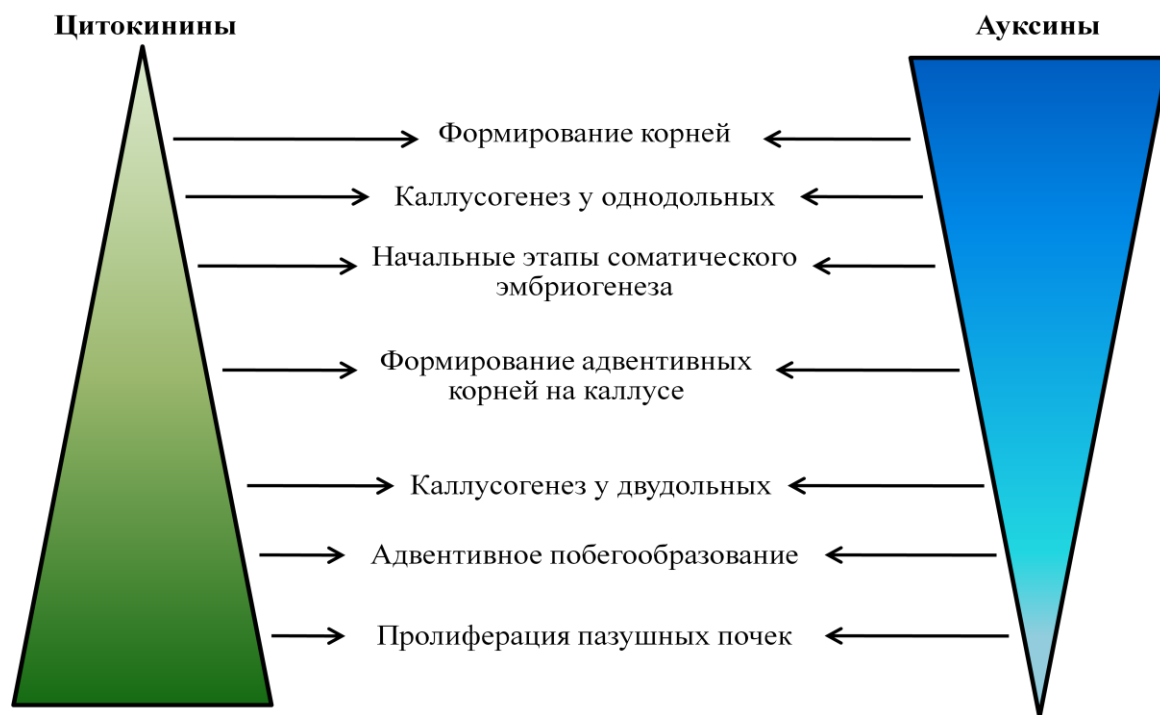


Рис. 4. Влияние содержания цитокининов и ауксинов на процессы роста и морфогенеза в культуре *in vitro* (Van Staden et al., 2008 с изменениями)

Ауксины. Первым изолированным эндогенным (природным) регулятором роста был ауксин – индолил-3-уксусная кислота (ИУК). Природная ИУК быстро разрушается как в растении, так и в питательной среде, сейчас имеются более стабильные синтетические аналоги, называемые также ауксинами благодаря схожей биологической активности: 3-индолилмасляная кислота (ИМК), 1-нафтилуксусная кислота (НУК) и 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д). Как природные, так и синтетические ауксины являются низкомолекулярными кристаллическими соединениями, содержащими индольное или ароматическое кольцо, хорошо растворимы в органических растворителях.

Ауксины стимулируют элонгацию клеток, включены в процессы формирования меристем, дающих начало неорганизованной каллусной ткани и органам, совместно с цитокининами способствуют дифференциации ксилемы и флоэмы. Совместное действие ауксинов и цитокининов, регулирующее клеточное

деление, объясняется влиянием этих веществ на различные фазы клеточного цикла. Известно, что ауксины являются индукторами репликации ДНК, а цитокинины – контролируют митоз, являясь «промоторами» клеточного цикла (Plant propagation ..., 2008). Таким образом, ауксины необходимы для перехода специализированной клетки из фазы G1 в S-фазу клеточного цикла, цитокинины – для завершения этой фазы и прохождения последующих фаз G2, М и цитокинеза (Gahan, 2007). На организменном уровне ауксины обеспечивают поддержание полярности: нормальное развитие эмбрионов, сохранение апикального доминирования, а также формирование адвентивных корней (Friml, 2003). При этом активность ауксинов не только варьирует у растений разных таксонов, но и изменяется на тканевом и клеточном уровнях. Кроме того, активность определяется стадией развития и физиологическим состоянием растения (Davies, 2004). Так, наибольший уровень ИУК у однодольных диагностируется в апексе побега, либо в непосредственной близости к нему и транспортируется к основанию побега, у двудольных наибольшая концентрация эндогенного ауксина отмечается в субапикальной наиболее активно растущей зоне (Law, Davies, 1990). В целом, считается, что независимо от таксономической принадлежности растения, ауксины синтезируются в молодых листьях и апексах побегов и перемещаются по флоэме к корневой системе (полярный транспорт) (Fortes et al., 2010; Garay-Arroyo et al., 2012). Однако есть данные, что помимо верхушки побега ауксины могут синтезироваться непосредственно в корнях (Ikeda et al., 2009; Petersson et al., 2009).

Каллусогенез. Ауксины часто используются для индукции каллуса из тканей первичного экспланта. Это объясняется их способностью вызывать дедифференциацию клеток и последующее деление с потерей тканью специализации. Ауксины (2,4-Д) необходимы для индукции каллуса из тканей первичного экспланта *Narcissus confusus* Pugsley (Sellés et al., 1999), *Allium cepa* L. (Zheng et al., 1998), *A. sativum* L. (Fereol et al., 2002). С. Сузуки и М. Накано было отмечено, что при культивировании листовых эксплантов *Muscari armeniacum* Leichtlin ex Baker образуется два вида каллуса: органогенный желтый зернистый

при добавление 2,4-Д в концентрации 4,5 мкМ и эмбриогенный белый рыхлый каллус при внесении 54,0 мкМ НУК. В этой работе ярко продемонстрирована специфика действия ауксинов в зависимости от типа и концентрации (Suzuki, Nakano, 2001). Несмотря на активный каллусогенез в присутствии 2,4-Д, ее использование может привести к появлению генетической изменчивости, нежелательной в работе с редкими и исчезающими видами, поэтому ряд авторов предпочитает использовать НУК или ИУК (Demeter et al., 2010; Metwally et al., 2014).

Органогенез. Присутствие ауксинов практически всегда необходимо для усиления начального роста меристем. Низкие концентрации ауксинов наиболее эффективны в сочетании с высоким уровнем цитокининов на стадии собственно размножения (Mirici et al., 2005; Demeter et al., 2010). Однако при культивировании редкого растения Западного Кавказа *Panocratium maritimum* L. установлено, что наибольшее количество микролуковиц формировалось в присутствии 0,5 мг/л ИМК (без цитокининов) (Соколов и др., 2013). Подобные результаты были получены К.Й. Пэк и Х.Н. Мурти в работе с *Fritillaria thunbergii* Miq.: для индукции регенерации микролуковичек из сегментов луковичных чешуй наиболее эффективно использование НУК, тогда как наличие цитокининов в питательной среде не обязательно (Paek, Murthy, 2002). Преобладание в среде 2,4-Д над цитокинином 6-бензиламинопурином (БАП) также оказалось более эффективным для индукции регенерации микролуковиц *Lilium pilosiusculum* (Freyn) Miscz., (Набиева, 2008). Культивирование каллуса *Allium chinense* G. Don на питательной среде, дополненной 1,0 мг/л НУК в сочетании с 0,1 мг/л БАП, обеспечивало максимальную частоту регенерации микролуковиц (Yan et al., 2009).

Ауксины играют ключевую роль в организации и поддержании апикальной меристемы корня, поэтому их применяют для индукции ризогенеза *in vitro* (Reed et al., 1998; Garay-Arroyo et al., 2012). Ауксины особенно эффективны, если в тканях растения имеется высокий уровень эндогенных цитокининов. В этом случае экзогенный ауксин необходим, чтобы преодолеть влияние цитокининов и

вызвать образование корней (Plant development ..., 2005). На стадии укоренения довольно часто проявляются генотипические различия культивируемых растений в ответ на действие экзогенных ауксинов. Так, при укоренении адвентивных микролуковичек Восточных гибридов лилий была эффективна ИМК, при этом активность ризогенеза увеличивалась с возрастанием концентрации регулятора роста и была максимальной при 4,8 мкМ ИМК (Liu, Yang, 2012). Для *Tulipa gesneriana* L. образование адвентивных корней отмечалось в присутствии 2,4-Д в питательной среде (Ptak, Bach, 2007).

Эмбриогенез. Для индукции соматического эмбриогенеза у однодольных используют питательные среды, содержащие в основном 2,4-Д: *Allium sativum* (Luciani et al., 2006; Hassan et al., 2014), *A. schoenoprasum* L. (Zdravković-Korać et al., 2010), *Narcissus confusus* (Sellés et al., 1999). Действие ауксинов (в сочетании с цитокининами) состоит в перепрограммировании соматических клеток. Такое перепрограммирование является причиной дедифференциации с последующей дифференциацией клеток и становлением их на новый путь развития. Таким образом, клетки являющиеся, например, частью листа могут стать эмбриогенными и дать начало соматическим эмбриоидам (Plant development ..., 2005). Так, прямой соматический эмбриогенез был получен при культивировании трех видов крокусов (*C. cancellatus* Herb., *C. caspius* Fisch. & C.A. Mey., *C. michelsonii* В. Fedtsch.) на питательной среде, содержащей 21,5 мкМ НУК и 17,8 мкМ БАП (Karamian, 2004). Однако для дальнейшего развития и созревания эмбриоидов, как правило, требуется снижение концентрации ауксинов, либо культивирование на безгормональной среде (Tribulato et al., 1997; Bhagyalakshmi, 1999; Karamian, 2007; Zdravković-Korać et al., 2010).

Цитокинины. Среди всех классов регуляторов роста растений цитокинины обладают наиболее сильным влиянием на процессы регенерации *in vitro* (Magyar-Tabori et al., 2010).

Цитокинины по своей природе являются N⁶-замещенными производными аденина, в свободном виде встречаются в растениях в форме нуклеозидов и нуклеотидов. Существует два основных класса цитокининов, различающихся

химической структурой боковой цепи: изопреноиды (зеатин) и ароматические цитокинины (БАП, кинетин (Кн)) (Werbrouck et al., 1996). Биосинтез цитокининов протекает в апексе корня и по ксилеме регуляторы транспортируются на большие расстояния в другие ткани и органы растения, координируя развитие побегов и корней (Benedetto et al., 2010; Kieber, Schaller, 2014). Наибольшая концентрация цитокининов в растении отмечается в активно пролиферирующих тканях: апикальная меристема побега, молодые листья и незрелые семена (Garay-Arroyo et al., 2012).

Применение цитокининов в культуре изолированных тканей и органов растений способствует делению и дифференциации клеток, снимает апикальное доминирование, стимулирует рост пазушных почек, регулирует развитие проводящей системы, тормозит развитие корней, а также индуцирует адвентивное побегообразование (Selby et al., 1992; Howell et al., 2003; Benedetto et al., 2010; Varshney, Anis, 2014). Недостаток либо отсутствие цитокининов приводит к торможению метафазы митоза и затрудняет кариокинез, так как они опосредованно участвуют в образовании веретена деления (Plant propagation ..., 2008). При этом эффективность цитокининов в культуре *in vitro* зависит от генотипа растения, интенсивности их поглощения, транспорта и метаболизма, а также взаимосвязи с эндогенными регуляторами роста (Strnad et al., 1997; Van Staden et al., 2008).

Органогенез. Успешный подбор типа и концентрации экзогенного цитокинина позволяет индуцировать адвентивное побегообразование из тканей экспланта за 4-6 недель культивирования. Наиболее часто используемым цитокинином является БАП. Содержание в среде 1,0 мг/л БАП приводит к активному органогенезу у *Narcissus confusus*, при этом до 85% рыхлого каллуса образует кластеры побегов, которые развиваются в микролуковицы спустя 6 недель культивирования (Sellés et al., 1999). О.О. Жолобовой с соавторами было отмечено, что комбинация БАП и ИУК не оказывала положительного влияния на количество образующихся побегов, тогда как внесение в культуральную среду только цитокинина сопровождалось интенсификацией побегообразования у

представителей различных семейств (Жолобова и др., 2012). При клональном микроразмножении крокуса было обнаружено, что использование 2-изопентиниладенина и тидиазурона (ТДЗ) является неэффективным, тогда как внесение в питательную среду 22,0 мкМ БАП приводит к формированию большего количества побегов (Majourhay et al., 2007). Однако наиболее эффективно сочетание цитокининов с ауксинами, сбалансированное соотношение концентраций этих регуляторов роста обеспечивает активные процессы органогенеза (Liu, Yang, 2012), что подтверждает концепцию Ф. Скуга и К.О. Миллера. Так, внесение в питательную среду 3,0 мг/л БАП в сочетании с 0,15 мг/л НУК при культивировании тюльпанов позволило получить высокую частоту побегообразования (Ахметова, 2009). Совместное внесение в питательную среду БАП и НУК также оказалось эффективным при культивировании зрелых зиготических зародышей *Sternbergia candida* В. Mathew et T. Baytop, *Fritillaria alburyana* Rix, *F. whittallii* Baker и *Muscari muscarimi* Medikus (Özcan et al., 2007). Сочетание регуляторов роста позволило добиться высокой частоты регенерации этих исчезающих видов. Комбинация ауксинов и цитокининов способствовала побегообразованию также в работе с *Allium sativum* и *A. ampeloprasum* L. (Seabrook, 1994). Положительный эффект совместного использования этих регуляторов роста отмечали и при культивировании *A. sativum* сорта «Ballady», количество формирующихся побегов достигало 48 штук на эксплант (Metwally et al., 2014). Необходимо отметить, что высокая концентрация экзогенных цитокининов может являться причиной развития многочисленных мелких гипергидратированных побегов, которые не развиваются в полноценные растения (Plant development ..., 2005; Vasudevan, Van Staden, 2011). Также высокое содержание цитокининов может ингибировать дальнейший ризогенез, при этом иногда требуется несколько субкультивирований на безгормональной среде, чтобы преодолеть этот эффект (Coste et al., 2011).

Эмбриогенез. В суспензионной культуре гладиолуса П. Ремотти и Г.Д.М. Лоффлер было отмечено образование соматических эмбриоидов в присутствии БАП, при этом первичный эмбриогенез отмечался при 2,5 мкМ, а

концентрация БАП равная 0,5 мкМ вызывала вторичный эмбриогенез (Remotti, Loffler, 1995). Использование 1,0 мг/л Кн оказалось эффективным для индукции соматического эмбриогенеза в культуре *Allium ampeloprasum* var. *porrum* L. (Buiteveld et al., 1993), тогда как для *A. tuberosum* Rottl. наиболее эффективным было сочетание Кн с гибберелловой кислотой (Matsuda, Adachi, 1996). Сочетание ТДЗ и 2,4-Д позволило получить наибольшее количество соматических эмбриоидов в каллусной культуре *A. schoenoprasum* L. при этом было установлено, что на частоту формирования эмбриогенного каллуса влияет лишь концентрация цитокинина в питательной среде (Zdravković-Korać et al., 2010). Использование ТДЗ приводило к образованию как первичных, так и вторичных эмбриоидов при культивировании листовых эксплантов *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume var. *formosa* (Chen, Chang, 2006).

1.4. Системы регенерации геофитов в культуре *in vitro*

Начиная с момента открытия тотипотентности растительной клетки и разработки первых систем регенерации, позволяющих получать большое количество растительного материала из соматических тканей растений, культура изолированных тканей и органов является альтернативным методом быстрого размножения растений (Bhojwani, Dantu, 2013). В последние годы ведутся активные работы по созданию эффективных систем регенерации и размножения *in vitro* многих геофитов. Подобный интерес связан с высокой декоративной, лекарственной и хозяйственной ценностями представителей этой группы растений (Loskutov et al., 1999; Robledo-Paz, et al., 2000; Ziv, Naor, 2006; Çiğ, Başdoğan, 2015). Интерес к разработке систем регенерации вызван еще и тем, что к геофитам относится большое количество редких и эндемичных видов (Fay, 1992; Mirici et al., 2005).

На сегодняшний день проведено множество экспериментов по регенерации геофитов *in vitro*, основанных на индукции адвентивного органогенеза и соматического эмбриогенеза (Hussey, 1975; Xu et al., 2009; Yucesan et al., 2014).

Разработаны протоколы размножения представителей родов *Hyacinthus* L. (Yi et al., 2002; Chung et al., 2006), *Allium* (Hassan et al., 2014; Metwally et al., 2014), *Lilium* (Tribulato et al., 1997; Khawar et al., 2005; Yin et al., 2013), *Narcissus* L. (Sellés et al., 1999; Chen et al., 2005), *Crocus* L. (Sivanesan et al., 2014), *Tulipa* L. (Ptak, Bach, 2007; Maślanka, Bach, 2014), *Gladiolus* L. (Prasad, Dutta Gupta, 2006; Kumar et al., 2011) и прочих. Также имеются работы, описывающие эффективные протоколы микроразмножения редких и исчезающих видов родов *Fritillaria* (Gao et al., 1999; Subotić et al., 2010), *Lilium* (Chang et al., 2000), *Muscari* (Suzuki, Nakano, 2001; Nasircilar et al., 2011), *Crocus* (Demeter et al., 2010).

При разработке систем микроразмножения различных луковичных, клубнелуковичных растений наиболее часто в качестве минеральной основы используют среды по прописи Мурасиге-Скуга (MS) (Murashige, Skoog, 1962), Гамборга-Эвелеге (B₅) (Gamborg, Eveleigh, 1968), а так же специально разработанную для видов лука питательную среду Данстена-Шорта (BDS) (Dunstan, Short, 1977). Как уже отмечалось ранее, основное влияние на процессы регенерации в культуре *in vitro* оказывают экзогенные регуляторы роста. Наиболее часто используемыми регуляторами роста растений при культивировании луковичных геофитов являются цитокинин БАП и ауксины НУК, ИМК, при этом эффективные концентрации данных веществ варьируют в незначительных пределах для разных видов растений. В большинстве работ основным типом эксплантов, позволяющим получать большое количество микрорастений, являются сегменты луковичных чешуй. Так, в ранних исследованиях по микроразмножению представителей родов *Lilium* и *Hyacinthus*, при использовании сегментов чешуй материнской луковицы было получено до 500 микролуковичек за 6 месяцев культивирования (Pierik, Post, 1974; Simmonds, Cumming, 1976; Niimi, Onozawa, 1979).

Среди однодольных геофитов наиболее изученным таксоном можно считать род *Lilium*. Системы регенерации лилий в культуре *in vitro* разрабатываются не одно десятилетие, что объясняется высокой декоративностью представителей данного рода. В работах по размножению лилий *in vitro* активно используют

различные источники эксплантов, включая луковичные чешуи (Lian et al., 2003; Liu, Yang 2012), стебли (Nhut et al., 2002 б; Vacchetta et al., 2003), цветоложе (Nhut et al., 2001; Nhut, 2003 а), листья (Kim et al., 2005; Xu et al., 2009) и прочее. Культивирование изолированных тканей и органов лилий наиболее часто проводят на средах, дополненных БАП в сочетании с НУК или ИУК (Kim et al., 2005; Liu, Yang, 2012). Эффективность данного сочетания регуляторов роста установили Ю. Ниими и Т. Онозава в работе с *L. rubellum* Baker еще в 1979 году (Niimi, Onozawa, 1979). В своей работе исследователи продемонстрировали, что наличие в питательной среде НУК не является обязательным, однако его присутствие усиливает влияние БАП на процессы формирования микролуковичек (Niimi, Onozawa, 1979).

В культуре ткани лилий одинаково часто удается индуцировать как органогенез, так и соматический эмбриогенез. Регенерация адвентивных почек получена для многих видов лилий, среди которых *L. candidum* L. (Khawar et al., 2005), *L. pumilum* Redouté (Jin et al., 2014), *L. philippinensis* (Zamora, Gruezo, 1999). Активный морфогенез в культуре *L. pumilum* наблюдали при использовании основания листа в качестве первичного экспланта (Jin et al., 2014). При этом в зависимости от состава регуляторов роста на поверхности экспланта отмечали образование либо микропобегов (8,88 мкМ БАП и 2,69 мкМ НУК), либо морфогенного каллуса (9,05 мкМ 2,4-Д) с последующим формированием микролуковичек. Прямой геммогенез из тканей листа различных Восточных и Азиатских гибридов лилий также наблюдали З.-Ф. Ёин с соавторами (Yin et al., 2013). Наибольшего коэффициента размножения в данной работе удалось добиться сочетанием 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л ТДЗ (до 7 адвентивных побегов на эксплант), дальнейшее увеличение концентрации цитокинина сопровождалось значительным снижением побегообразования. При этом морфогенные процессы, приводящие к формированию микропобегов (на 14 день культивирования), протекали в субэпидермальных клетках адаксиальной стороны листа (Yin et al., 2013).

Сочетание цитокининов и ауксинов также эффективно при культивировании других луковичных геофитов. Например, культивирование редкого вида *Muscari mirum* на питательной среде MS, дополненной 4,0 мг/л БАП и 0,25 мг/л НУК приводило к образованию в среднем 23 адвентивных микролуковичек на эксплант (Nasircilar et al., 2011). При этом активный геммогенез был получен при использовании луковичных чешуй в качестве первичных эксплантов. Эффективность сочетания этих регуляторов роста отмечали при индукции непрямого геммогенеза *Narcissus confusus* из зрелых зиготических зародышей (Sellés et al., 1999). Присутствие в питательной среде БАП и НУК активизировало регенерацию микролуковичек (7-9 луковичек) в работе с *Nerine sarniensis* (L.) Herb. (Vishnevetsky et al., 2003). При этом формирующиеся микрорастения имели сосудистую связь с тканью материнского экспланта (луковичная чешуя), возникающую спустя 1 месяц инкубирования на питательной среде, что указывает на протекание прямого органогенеза (Vishnevetsky et al., 2003).

Приведенные примеры демонстрируют эффективность совместного влияния регуляторов роста и подтверждают теорию Ф. Скуга и К.О. Миллера (Skoog, Miller, 1957) о влиянии соотношения экзогенных ауксинов и цитокининов на индукцию побегообразования. Подтверждение данной концепция находит также в работах с представителями рода *Hyacinthus* (Kim et al., 1981), а также *Sternbergia fischeriana* (Mirici et al., 2005), *Amaryllis belladonna* L. (De Bruyn et al., 1992).

На сегодняшний день разработано большое количество систем регенерации однодольных геофитов, основанных на индукции соматического эмбриогенеза. В ходе данного процесса параллельно формируются меристемы побега и корня, соединенные элементами проводящей системы, что обеспечивает относительную независимость формирующейся структуры от ткани экспланта (Bassuner et al., 2007). Соматический эмбриогенез является наиболее быстрым методом микроразмножения с получением целого, самостоятельного растения (Bakhshaie et al., 2010).

Комбинация ауксинов и цитокининов часто используется для индукции соматического эмбриогенеза многих луковичных и клубнелуковичных растений, таких как *Alstroemeria* L. (Kim et al., 2006), *Lilium* (Nhut et al., 2002 a), *Narcissus* (Sellés et al., 1999; Malik, 2008) и *Tulipa* (Ptak, Bach, 2007). Имеется ряд работ, в которых для индукции соматического эмбриогенеза (прямого и непрямого) наиболее эффективным было сочетание БАП и НУК (Bakhshae et al., 2010; Demeter et al., 2010; Karamian, Ranjbar, 2010; Nasircilar et al., 2011). При этом, как отмечали Б.Б. Юцесан с соавторами, интенсивность формирования соматических эмбриоидов *Muscari armeniacum* зависела от концентрации БАП и наличия в индукционной среде НУК (Yucesan et al., 2014). Использование 2,4-Д в присутствии БАП приводило к развитию соматических эмбриоидов в культуре *Crocus sativus* L. (Raja et al., 2007) и *Narcissus papyraceus* Ker Gawl. (Hosseini et al., 2013). Однако высокие концентрации экзогенных регуляторов роста значительно снижали частоту формирования соматических эмбриоидов *N. papyraceus* (Hosseini et al., 2013).

Особенностям регенерации и морфогенеза представителей рода *Fritillaria* посвящен ряд исследований (табл. 1). Первая система регенерации была разработана для *F. thunbergii* в 1977 году (Sun et al., 1977). Начиная с этого момента, появлялись работы, описывающие протоколы регенерации *in vitro* различных представителей рода *Fritillaria* (Kukulczanka et al., 1989; Sun, Wang, 1991; Gao et al., 1999; Subotić et al., 2010; Carasso, Mucciarelli, 2014).

При разработке систем регенерации для рода *Fritillaria* часто в качестве первичного экспланта используют луковичные чешуи (Paek et al., 1994; Эрст и др., 2014). На этапе собственно размножения рябчиков используют среды по прописи В₅ и MS, дополненные регуляторами роста – БАП, НУК, ИУК (табл. 1). Сочетание ауксинов и цитокининов приводит к индукции, как органогенеза, так и соматического эмбриогенеза в культуре *Fritillaria* (Kukulczanka et al., 1989; Paek, Murthy, 2002; Вечернина, 2004). При этом, как указывает М. Петрик, на сегодняшний день органогенез описан для 17 видов, а соматический эмбриогенез для 8 видов рода *Fritillaria* (Petrić et al., 2012).

В последние годы наиболее активно разрабатываются протоколы для клонального микроразмножения *F. meleagris* (Subotić et al., 2004, 2010; Nikolić et al., 2006; Petrić et al., 2012). Так, в работах М. Николик с соавторами и М. Петрик с соавторами показано, что культивирование эксплантов на питательной среде MS, дополненной ТДЗ, L-пролином, казеина гидролизатом, аденина сульфатом способствует индукции соматического эмбриогенеза в культуре рябчика шахматного (Nikolić et al., 2006; Petrić et al., 2011). Данное сочетание компонентов среды приводило к формированию соматических эмбриоидов и при использовании в качестве эксплантов зрелых зиготических зародышей (Petrić et al., 2011). Прямой органогенез в культуре *F. meleagris* наблюдался при использовании эксплантов луковичных чешуй вне зависимости от применяемых регуляторов роста. Так, формирование адвентивных микролуковичек непосредственно из тканей экспланта отмечали в своих работах Н.А. Вечернина, В. Ласло с соавторами, М. Петрик с соавторами, при этом исследователи для индукции побегообразования добавляли в среду БАП, ТДЗ, НУК, 2,4-Д, ИМК в различных комбинациях и концентрациях (Вечернина, 2004; Laslo et al., 2011; Petrić et al., 2013).

Прямой геммогенез характерен и для других представителей рода: *F. camtschaticensis*, *F. unibracteata* Р.К. Hsiao et К.С. Hsia, *F. thunbergii*, *F. imperialis*, *F. dagana* (Paek et al., 1994; Otani, Shimada, 1997; Gao et al., 1999; Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2008; Rahimi et al., 2014; Эрст и др., 2014). При этом в подавляющем большинстве работ формирование побегов *de novo* наблюдали при использовании сегментов луковичных чешуй в качестве первичных эксплантов. В своих работах исследователи отмечали, что внесение регуляторов роста в питательную среду активизирует побегообразование. Так, К.Я. Пэк и Х.Н. Мурти установили, что НУК является наиболее эффективным ауксином в индукции формирования луковичек *in vitro* из сегментов луковичных чешуй *F. thunbergii*, при этом максимальная регенерация была получена при сочетании НУК и Кн (Paek, Murthy, 2002). Сочетание невысоких концентраций

НУК и цитокинина также оказалось наиболее оптимальным при культивировании *F. imperialis* (Lukaszewska et al., 1998).

Таблица 1

Индукция морфогенеза в культуре *in vitro* представителей рода *Fritillaria*

Вид	Питательная среда	Эксплант	Тип морфогенеза	Автор
<i>F. camtschaticensis</i>	LS+НУК 0,1 мг/л + пиклорам 0,1 мг/л	Луковичные чешуи, листья	Прямой органогенез	Otani, Shimada, 1997
<i>F. unibracteata</i>	MS+БАП 4,44 мкМ + ИУК 5,71 мкМ	Луковички	Прямой органогенез	Gao et al., 1999
<i>F. thunbergii</i>	MS+Кин 4,65 мкМ + НУК 1,62 мкМ	Луковичные чешуи	Прямой органогенез	Paek, Murthy, 2002
<i>F. verticillata</i> Willd., <i>F. meleagris</i>	B ₅ +БАП 5,0 мкМ + НУК 5,0 мкМ	Луковичные чешуи	Прямой органогенез	Вечернина, 2004
<i>F. meleagris</i>	MS+ТДЗ 1,0 мг/л+L-пролин 250,0 мг/л + казеин гидролизата 250,0 мг/л+аденин сульфат 80,0 мг/л	Стебель	Прямой соматический эмбриогенез, органогенез	Nikolić et al., 2006
		Зрелые зиготические зародыши	Непрямой соматический эмбриогенез	Petrić et al., 2010, 2011, 2013
		Луковичные чешуи	Прямой органогенез	
	MS+ 2,4-Д 1,0 мг/л	Зиготические зародыши, образование листа	Прямой органогенез, соматический эмбриогенез	Subotić et al., 2004; 2010
	MS+НУК 1,0 мг/л + ИМК 1,0 мг/л + аденин сульфат 40,0 мг/л	Луковичные чешуи	Прямой органогенез	Laslo et al., 2011
<i>F. dagana</i>	B ₅ +БАП 5,0 мкМ + НУК 2,0 мкМ	Луковичные чешуи	Прямой органогенез	Эрст, Эрст, 2011
<i>F. sonnikovae</i>	BDS+триптофан 100,0 мг/л+ глутаминовая кислота 200,0 мг/л	Луковичные чешуи	Непрямой соматический эмбриогенез	Эрст и др., 2014

Вид	Питательная среда	Эксплант	Тип морфогенеза	Автор
<i>F. imperialis</i>	MS+БАП 1,0 мг/л + НУК 0,5 мг/л	Луковичные чешуи, стебель	Прямой органогенез	Lukaszewska et al., 1998
	B ₅ +БАП 0,1 мг/л + НУК 0,6 мг/л + ИУК 0,4 мг/л	Листочки околоцветника	Прямой органогенез	Mohammadi- Dehcheshmeh et al., 2007, 2008
			Непрямой соматический эмбриогенез	
	MS+ ТДЗ 1,0 мг/л +ИУК 0,1 мг/л	Луковичные чешуи, листовые примордии	Непрямой органогенез	Rahimi et al., 2013
MS+ ТДЗ 0,5 мг/л	Луковичные чешуи	Прямой органогенез	Rahimi et al., 2014	
<i>F. tubiformis</i> Gren. & Godr.	MS+БАП 8,88 мкМ + НУК 2,68 мкМ	Незрелые зиготические зародыши	Непрямой соматический эмбриогенез	Carasso, Mucciarelli, 2014

Таким образом, проведенный обзор литературы свидетельствует о широком использовании методов биотехнологии для размножения и сохранения *in vitro* различных геофитов, в том числе и представителей рода *Fritillaria*. Однако имеющиеся исследования касаются видов рябчиков, произрастающих преимущественно на территории Европы и Западной Азии, тогда как по видам, произрастающим на территории Алтае-Саянской горной области, встречаются единичные работы. Также имеются лишь несколько исследований, освещающих морфо-гистологические особенности процессов регенерации *in vitro* рябчиков. При этом для разработки эффективных систем клонального микроразмножения необходимо проведение морфо-гистологического анализа, позволяющего выявить пути морфогенеза *in vitro*, тем самым заложить фундаментальную основу для дальнейших исследований по размножению и сохранению в коллекциях *in vitro* редких и эндемичных видов рода *Fritillaria*.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии ФГБУН Центральный сибирский ботанический сад СО РАН в 2012-2015 гг.

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования послужили редкие и эндемичные виды рода *Fritillaria* (сем. Liliaceae (Тахтаджян, 1987)), произрастающие на территории Алтае-Саянской горной области: *F. dagana*, *F. meleagris*, *F. meleagroides*, *F. sonnikovae*. Большинство изучаемых видов относится к редким и занесены в Красную книгу РФ (2008), а также в ряд региональных Красных книг (Алтайского края, 2006; Республики Алтай, 2007; Новосибирской области, 2008; Красноярского края, 2012; Курганской области, 2012). Два вида – *F. dagana* и открытый в 2010 г. вид *F. sonnikovae* являются эндемиками гор Южной Сибири. Также в культуру *in vitro* были введены еще четыре вида рода, не произрастающие в горах Сибири: *F. camschatcensis*, *F. crassifolia* subsp. *crassifolia*, *F. michailovskyi*, *F. ruthenica*.

Представители данного таксона распространены в умеренной и субтропической зонах Северного полушария – в Евразии, Северо-Западной Африке и на западе Северной Америки. На сегодняшний день род насчитывает более 100 видов, при этом районами наибольшего видового разнообразия являются Западная и Центральная Азия, а также Северная Америка (штат Калифорния) (Rix, 1997, 2001). Произрастают представители рода *Fritillaria* преимущественно в горных районах, в местах, где отсутствует избыточное увлажнение – в лесах, предгорьях, на каменистых склонах, высокогорных лугах, редко встречаются в пустынях (Davis, 1947; Иллюстрированная энциклопедия..., 2009). При этом в отличие от остальных родов трибы, имеющих длительный период вегетации, рябчики – весенние эфемероиды (Ротов, 1976; Баранова, 1999).

Первые таксономические исследования рода *Fritillaria*, объединяющие виды по секциям либо подродам, основывались в первую очередь на морфологических признаках и географическом распространении рябчиков. На сегодняшний день существует ряд работ, описывающий систематику исследуемого рода с привлечением помимо морфологических данных результатов генетического анализа, что позволяет более точно распределить таксоны внутри рода (Turrill, Sealy, 1980; Rønsted et al., 2005; Day et al., 2014). Так, недавнее исследование с использованием методов ДНК-маркирования подтвердило разработанную ранее внутривидовую классификацию, выделяющую 8 подродов: *Fritillaria*, *Petilium* (L.) Endl., *Rhinopetalum* Fisch., *Theresia* Koch, *Liliorhiza* (Kellog) Benth. & Hook. f, *Davidii* Rix, *Korolkowia* Rix, *Japonica* Rix (Rix, 2001; Rønsted et al., 2005). При этом типовой подрод *Fritillaria* насчитывает до 60 % видового состава.

Растения рода *Fritillaria* являются поликарпиками с безрозеточным монокарпическим побегом – луковицей. Луковица представляет собой укороченную подземную часть побега, составленную низовыми чешуями, которая ежегодно возобновляется (Баранова, 2000). Надземная удлиненная и облиственная цветоносная часть побега отмирает после завершения вегетации. Из пазушной почки – почки возобновления, находящейся внутри луковицы в основании генеративного побега, формируется новый монокарпический побег следующего года (замещающая луковица) (Баранова, 1999). Таким образом, в своем составе луковицы рябчиков, как правило, не сохраняют побегов прошлых лет. Многочисленные контрактивные (втягивающие) корни некоторых представителей данного рода способны втянуть луковицу на глубину до 25 см и защитить почку возобновления от высыхания.

При этом в пределах рода *Fritillaria* М.В. Барановой на основании строения луковиц, типа чешуй, соотношения числа метамеров надземной и подземной частей побега и прочем выделено четыре группы видов (Баранова, 1999):

- 1) виды с многочешуйчатыми черепитчатыми луковицами без столонов;
- 2) виды с столонообразующими луковицами, составленными мелкими рыхлорасположенными чешуями;

- 3) виды с полутуникатными луковицами, состоящими из 2-3 толстых и широких запасующих свободных в основании чешуй;
- 4) виды с туникатными луковицами из 1-4 сочных сросшихся чешуй.

Строение надземной части растений рода *Fritillaria* имеет характерные черты. Так, для рябчиков свойственны ортотропные стебли с очередным или мутовчатым листорасположением, листья простые продолговато-ланцетные или линейные (Брагина, Тарасова, 2013). Прицветные листья прямостоячие, иногда спирально закрученные, как у *F. ruthenica*. Цветки рябчиков, как правило, одиночные, однако бывают собраны в соцветия (кисть или зонтик). Как и у большинства представителей семейства у видов *Fritillaria* околоцветник простой, актиноморфный, шестилепестный, обычно колокольчатый (Лозина-Лозинская, 1935). Окраска околоцветника у различных видов рябчиков варьирует от белых до почти черных тонов, имеются виды с контрастно окрашенными цветками. У некоторых видов рябчиков листочки околоцветника имеют шахматный рисунок. При этом для большинства видов характерен полихромизм цветков. На внутренней стороне листочков околоцветника в их основании имеются нектарные ямки. Тычинок шесть в два ряда, пыльники прикрепленные. Завязь у рябчиков верхняя, плод шестигранная трехгнездная коробочка с многочисленными плоскими семенами, окрашенными в тона от светло-коричневого до золотисто-желтого.

У подавляющего большинства видов рода преобладает семенное размножение и лишь у столонообразующих восточно-азиатских видов оно почти полностью подавлено и компенсируется вегетативным размножением с помощью большого числа (до 50) легко опадающих чешуй. При этом прегенеративный период у рябчиков при благоприятных условиях занимает 4-7 лет в зависимости от вида, а при вегетативном размножении от одной луковицы за год в среднем можно получить 1-3 дочерних.

Луковицы некоторых представителей рода широко используют в традиционной китайской и тибетской медицине для лечения кашля, выведения мокроты, снятия температуры, восстановления после длительного лечения, а

также для снижения уровня сахара в крови (Saklani et al., 2011; Wajaht et al., 2014). Ценные лекарственные свойства обусловлены наличием разнообразных алкалоидов, получаемых из луковиц рябчиков (Lin et al., 2001). Этим же объясняется и ядовитость многих видов. Помимо лекарственных свойств, многие виды рода *Fritillaria* ценятся за раннее цветение и необычную окраску околоцветника, что позволяет их использовать как в срезке, так и для озеленения (Subotić et al., 2010).

Изучаемые в данной работе виды относятся к двум под родам: *Liliorhiza* (*F. dagana*, *F. sonnikovae*) и *Fritillaria* (*F. meleagris*, *F. meleagroides*) (рис. 5).

Fritillaria dagana Turcz. ex Trautv. – Рябчик дагана

Данный вид является эндемиком гор Южной Сибири и Северной Монголии. На территории России распространен в отдельных районах Сибири, Восточном Саяне и Южном Прибайкалье. Основные местообитания *F. dagana* располагаются на лугах и травянистых склонах горно-лесного и субальпийского поясов (450–1900 м над уровнем моря) (Красная книга Красноярского края, 2012). Рябчик дагана занесен в Красную книгу РФ (2008) в статусе редкого вида (3а).

Растения *F. dagana* средней высоты, стебель 20–35 см, с одной мутовкой из 2–4 продолговато ланцетных листьев, выше мутовки располагается более короткий прицветный лист. Цветки рябчика дагана, как и многих видов рода, поникающие, с шахматным рисунком (Иллюстрированная энциклопедия..., 2009). Листочки околоцветника около 3–4 см длиной, снаружи окрашены в коричнево-фиолетовые тона, внутри желтовато-фиолетовые с мелким светлым крапом (Власова, 1987).

Fritillaria sonnikovae Schauo et A. Erst – Рябчик Сонниковой

Данный вид является эндемиком Западного Саяна, впервые описан в 2010 году на территории Красноярского края на хребте Борус (Шауло, Эрст, 2010). При этом популяции преимущественно произрастают на каменистых склонах южной экспозиции.



Рис.5. Цветущие растения: а – *F. dagana*, б – *F. sonnikovae*,; в – *F. meleagris*; г – *F. meleagroides*

В отличие от *F. dagana* стебель у *F. sonnikovae* несколько длиннее (до 52 см), внизу безлистный, выше середины несет одну-две мутовки по 3-7 листьев. Между цветком и верхней мутовкой имеется один или два одиночных прицветных листа. Листья у рябчика Сонниковой линейно-ланцетные или линейные 7-12 см длиной, темно-зеленые. На генеративном побеге имеется один цветок, на короткой поникающей цветоножке. Цветок окрашен в светлые тона: снаружи светло-зеленовато-желтый с просвечивающим рисунком, внутри ярко-желтый с пурпурным крапом (Шауло, Эрст, 2010). Листочки околоцветника, так же как и остальные части растений, несколько крупнее, чем у *F. dagana* и достигают 4,0-6,5 см. Луковица рябчика Сонниковой имеет характерное строение для подрода *Liliorhiza* и составлена низовыми листьями, сформированными в течение первого года после заложения замещающей луковицы. У данных видов отсутствуют втягивающие корни, и луковицы залегают сразу под поверхностью почвы (до 5 см).

Для рябчика дагана и рябчика Сонниковой, как представителей подрода *Liliorhiza*, характерны столонообразующие луковицы, состоящие из нескольких мелких чешуй (Баранова, 1999). Почка возобновления у растений данной группы закладывается в конце лета внутри луковицы у основания цветоносной части побега, формирующего генеративные органы. В течение следующего года происходит формирование метамеров почки возобновления. При этом по завершению цветения (июль) начинается рост междоузлий почки и формирование stolона, выносящего почку возобновления за пределы материнской луковицы. И уже к августу завершается формирование всех вегетативных органов молодой луковицы – монокарпического побега будущего года, и начинается ее самостоятельный рост. В тоже время в луковичке начинается формирование репродуктивных органов и закладывается новая внучатая почка возобновления. Перед зимним покоем еще сохраняется связь материнской и дочерней луковиц посредством stolона. Однако данная связь разрушается на следующий год к началу очередной вегетации, когда отмирает материнская луковица и stolон. Зацветает растение на третий год после заложения монокарпического побега. Таким образом, малый жизненный цикл монокарпического побега – от заложения до отмирания луковицы – продолжается не менее 30 месяцев.

Несмотря на образование stolонов и более активное вегетативное размножение в сравнении с другими видами рода, у *F. dagana* и *F. sonnikovae* преобладает семенное размножение. Образующиеся в коробочке семена прорастают надземно на следующий год после посева, что объясняется слабой дифференциацией зародыша и глубоким морфофизиологическим типом покоя (Двораковская, 1973; Поздова, Разумова, 1997). В первый год после прорастания помимо семядоли развиваются первые 1-2 низовых листа, в дальнейшем происходит постепенное увеличение числа листьев, и на 3-4 год формируется первый stolон. Смена побеговой системы с розеточной на безрозеточную происходит лишь на 5-7 год, при этом первый надземный побег всегда вегетативный, генеративным становится лишь 2-3 побег. Таким образом, развитие от семени до цветения у этих видов занимает 6-8 лет (Баранова, 1999).

Следующие два изучаемых вида относятся к подроду *Fritillaria* и имеют полтуникатные луковицы, состоящие из 2-3 толстых запасующих чешуй.

Fritillaria meleagris L. – Рябчик шахматный

Данный вид имеет протяженный ареал и произрастает в Европе, Средиземноморье, Средней Азии, при этом восточная граница ареала проходит на территории Алтая. Местообитания связаны с достаточным освещением и увлажнением, встречается рябчик шахматный во влажных разреженных лесах, у подножия склонов, на сырых лугах и луговых болотах. Занесен в ряд региональных Красных книг, а также в Красную книгу РФ (2008) в статусе редкого вида с дизъюнктивным ареалом (Зв).

Растение высотой 20-35 см, стебель гладкий, прямостоячий. Листорасположение очередное, 2-6 ланцетовидно-линейных листьев по 10-13 см длиной. Цветки, как правило, одиночные, колокольчатые, поникающие, 3-4 см длиной. Околоцветник, как у всех представителей рода, простой, листочки темно-фиолетовые, лилово-пурпурные с четким светлым шахматным рисунком (Павлова, 2006). Однако встречаются формы с белой окраской околоцветника. Подобный полихромизм цветков объясняет интерес к данному виду и создание большого количества садовых форм и разновидностей.

Для *F. meleagris*, как типового представителя подрода, характерны полтуникатные луковицы, составленные двумя сочными чешуями. Почка возобновления закладывается в основание формирующегося цветоносного побега материнской луковицы в конце периода вегетации. В течение следующего года происходит развитие монокарпического побега и формирование многочисленных листовых зачатков (25-30 шт.). При этом лишь 2-3 в дальнейшем становятся запасующими и образуют луковицу, большая часть в последствие превратиться в ассимилирующие листья цветоносной части побега. К осени дочерняя луковица (монокарпический побег будущего года) достигает окончательных размеров и полностью замещает материнскую, чешуи которой постепенно высыхают, и побег отмирает. В это же время внутри побега будущего года происходит формирование генеративных органов и заложение внучатой почки возобновления. Вегетация и

цветение дочерней луковицы происходит следующей весной. Таким образом, полный онтогенез побега или малый жизненный цикл рябчика шахматного составляет 23-25 месяцев (Баранова, 1999; Седельникова, 2002).

Fritillaria meleagroides Patrin ex Schult. & Schult. f. – Рябчик малый

Распространен в Европе, Средней Азии, европейской части России и на Алтае (рис. 6). Растет в зоне степей по сырым, иногда солонцеватым лугам. Вид занесен в ряд региональных Красных книг, в том числе в Красную книгу Новосибирской области (2008) в статусе уязвимого вида (2(V)).

Растения рябчика малого несколько крупнее, чем рябчика шахматного, так стебель достигает высоты 50 см. Листорасположение также как у *F. meleagris* очередное, 3-7 листьев по 5-15 см длиной. Однако в отличие от рябчика шахматного у *F. meleagroides* цветки более мелкие поникающие, которых бывает 2-3 на генеративном побеге. Доли околоцветника 2,0-2,5 см длиной, темно-фиолетовые с неясным шахматным рисунком. Цветет рябчик малый, как и большинство исследуемых видов, в первой декаде мая (Власова, 1987; Иллюстрированная энциклопедия..., 2009). Луковица у растений данного вида полутуникатная, состоит из 2 чешуй, шаровидной формы, ежегодно замещающаяся. Снаружи луковица рябчика малого прикрыта пленчатыми чешуями.

Основным способом размножения данной группы видов является семенное, однако благодаря деятельности пазушных меристем виды могут размножаться и вегетативно с образованием луковичек-деток (Баранова, 1999). Семена прорастают через год после посева. В первый год жизни у сеянца развивается лишь семядольный лист, выполняющий функцию воздушного питания, и один низовой лист, запасающий питательные вещества. Ассимилирующие листья появляются со второго года, в это же время увеличивается количество низовых листьев. Надземный вегетативный побег у видов данной группы появляется на 3-4 год после посева, то есть происходит смена розеточной побеговой системы на безрозеточную. Как правило, второй удлиненный надземный побег несет на себе генеративные органы, таким образом, цвести растения данной группы начинают

на 4-5 годы жизни. В целом, онтогенез растений подрода *Fritillaria* с полутуникатными луковицами протекает быстрее на 2-3 года в сравнении с развитием рябчиков подрода *Liliorhiza*.

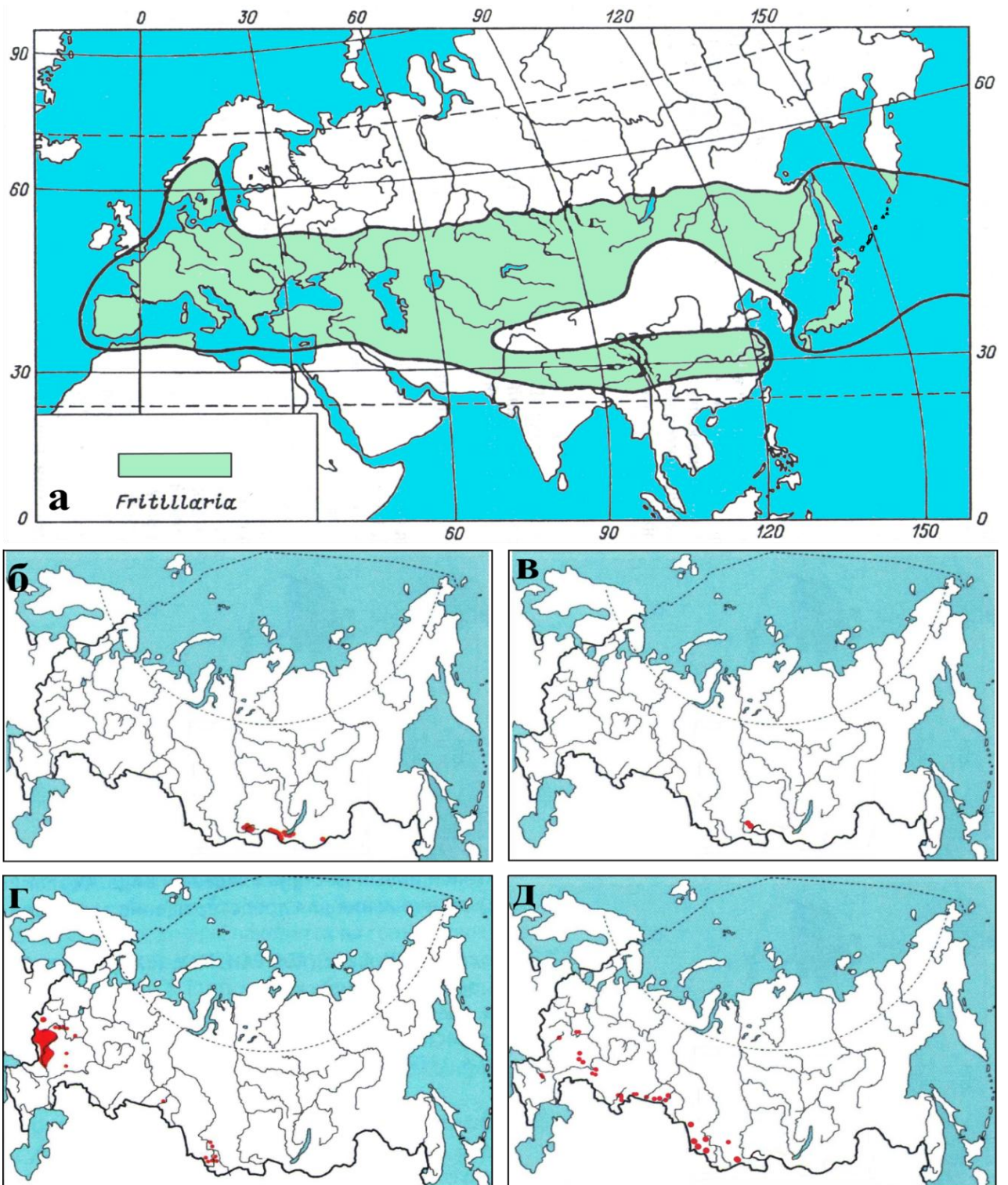


Рис. 6. Ареал рода *Fritillaria* в Европе и Азии (а) (Баранова, 1999 с изменениями); распространение *F. dagana* (б*), *F. sonnikovae* (в), *F. meleagris* (г*), *F. meleagroides* (д) на территории России (*Красная книга РФ, 2008)

Также в культуру *in vitro* были введены другие виды рябчиков, не произрастающие в горах Сибири.

Fritillaria camschatcensis (L.) Ker Gawl. – Рябчик камчатский

Вид произрастает в Северной Америке, Японии и на Дальнем Востоке (п-ов Камчатка, о. Сахалин, Курильские острова). Рябчик камчатский занесен в Красную книгу Приморского края (2008) в статусе уязвимого (VU).

Произрастает в лесах, на лугах, в травянистых зарослях. Растение высокое (до 50 см) с гладким стеблем, на котором мутовчато расположены листья (3-5 шт. в мутовке) овально-ланцетной формы, прицветные листья одиночные. Цветки собраны в кисть (по 2-3), воронковидные, листочки околоцветника длиной 2,5-3,5 см. Цветки темно-бронзовые, пурпурные, с неясным шахматным рисунком.

Рябчик камчатский относится к группе *Liliorhiza* и образует, так же как и рябчик дагана, столоны, выносящие замещающую луковичку за пределы материнской. Однако в отличие от рябчиков Сонниковой и дагана, луковица *F. camschatcensis* состоит из большого количества мелких чешуй, которые рыхло располагаются на донце и легко отделяются от него. Эта особенность строения подземного побега объясняет преобладание вегетативного размножения над семенным.

Fritillaria crassifolia Boiss. & Huet. subsp. *crassifolia* – Рябчик толстолистный

Данный вид является эндемиком Турции (Tekşen, Aytaç, 2011).

Растения рябчика толстолистного являются самыми низкорослыми из всех изучаемых нами видов, произрастают на каменистых склонах, в кустарниковых зарослях. На прямом гладком стебле длиной до 15 см располагаются очередные сидячие листья. При этом форма листьев нижней и верхней формации изменяется от эллиптической до узко-ланцетной, а 1-2 прицветника имеют линейное строение. Цветки (1-2) поникающие, широко-колокольчатые, доли околоцветника окрашены в зеленые тона с коричневато-фиолетовым шахматным рисунком. Луковица шаровидная, прикрыта пленчатыми чешуями.

Fritillaria michailovskyi Fomin – Рябчик Михайловского

Вид распространен на территории Западной Азии (Турция, Армения, Иран). Представители данного вида, как и растения рябчика толстолистного редко превышают 20 см в высоту и предпочитают открытые пространства, встречаются на каменистых склонах. Стебель бороздчатый, несет 3-5 ланцетных листа длиной 6-7 см. Цветок одиночный, колокольчатой формы, доли околоцветника длиной до 3 см. Высокая декоративность *F. michailovskyi* объясняется контрастной окраской околоцветника: бордовые цветки с желтым краем. Луковица некрупная, состоит из 2 мясистых, сочных чешуй.

Fritillaria ruthenica Wikstr. – Рябчик русский

Произрастает на юге Восточной Европы, в Средней Азии, на территории России встречается в Заволжье, восточная граница ареала проходит в Курганской области. Растения данного вида отличаются широким экологическим диапазоном, произрастают в лесостепной и степной зонах, в местах с умеренным увлажнением: по степным и луговым склонам, разреженным лесам, остепненным опушкам, в степях. В Красной книге РФ (2008) *F. ruthenica* имеет статус редкого вида (3б).

Листья, имеющие линейную форму, располагаются на тонком, гладком стебле (15-40 (70) см) супротивно или очередно. При этом прицветные листья нитевидные со спирально закрученной верхушкой и сближены вместе на верхушке побега. Цветки рябчика русского собраны в кисть, в количестве 1-5 шт., некрупные 2,0-3,5 см длиной. Околоцветник имеет темную окраску: коричнево-красный, с неясным более темным крапом, изнутри желтоватый. Луковицы рябчика русского имеют типичное строение для группы *Fritillaria*, как и описанные ранее *F. crassifolia* subsp. *crassifolia* и *F. michailovskyi*.

2.2. Методы исследования

Экспериментальные работы по культивированию изолированных тканей и органов растений проводили по классическим методикам (Бутенко, 1964; Калинин и др., 1980).

Все работы с изолированными тканями и органами выполняли в ламинар-боксе БАВ нп-01-«Ламинар-С»-1,5 (Lamsystems, Россия). Перед началом работы ламинар-бокс облучали бактерицидными ультрафиолетовыми лампами в течение 20 мин. Для стерилизации внутренней поверхности ламинар-бокса и всего вносимого оборудования использовали 70 % этанол. Питательные среды и дистиллированную воду стерилизовали в автоклаве при давлении 1 атм. и температуре 120 °С в течение 20 минут, посуду стерилизовали в сухожарочном шкафу при температуре 220 °С в течение 2 часов.

Стерилизация растительного материала и введение в культуру in vitro

Источниками эксплантов для введения в культуру *in vitro* послужили растения, привезенные из экспедиций сотрудниками лаборатории Гербарий ЦСБС СО РАН (луковицы), а также растения, произрастающие на опытном участке лаборатории Интродукции декоративных растений ЦСБС СО РАН (цветочные бутоны).

В качестве первичных эксплантов для введения в культуру *in vitro* исследуемых видов использовали части луковичных чешуй и флоральные органы растений (листочки околоцветника, завязи, тычинки). Изоляцию первичных эксплантов проводили в асептических условиях.

Луковичные чешуи. Перед введением в культуру *in vitro* интактные луковицы выдерживали при пониженных температурах ($+5\pm 2$ °С) в течение 3-4 недель, чтобы преодолеть период покоя, характерный для всех геофитов. Луковицы исследуемых видов предварительно тщательно очищали от загрязнений, далее промывали в проточной воде в течение 1 часа. Поверхностную стерилизацию луковиц проводили двумя способами:

1) последовательным погружением в 70 % этанол на 30 сек, затем в 0,1 % раствор HgCl_2 с добавлением 1 % Tween 80 на 30 минут,

2) погружением в 25 % раствор «Domestos» на 30 минут.

Завершающим этапом стерилизации являлась 3-кратная промывка стерильной дистиллированной водой.

Стерильные чешуи разрезали на сегменты размером 5×5 мм и использовали в качестве первичных эксплантов. Сегменты чешуй (по 4-5 шт. в каждый культуральный сосуд) помещали раневой поверхностью на питательную среду.

На этапе введения в культуру *in vitro* в качестве индукционных сред использовали среды по прописи B_5 или BDS, дополненные 5,0 мкМ БАП в сочетании с 2,0 мкМ НУК.

Флоральные органы. Стерилизацию нераскрывшихся бутонов проводили в 20 либо 25 % растворе «Domestos» в течение 20 минут, затем бутоны трижды промывали стерильной дистиллированной водой.

После стерилизации листочки околоцветника, завязь и тычинки изолировали от цветоложа и инокулировали на питательные среды. Тычинки и листочки околоцветника (абаксиальной стороной) размещали на питательной среде горизонтально, завязь располагали вертикально, погружая основание в среду. В качестве индукционных использовали среды по прописи B_5 , дополненные 0,1-4,4 мкМ БАП, 3,2 мкМ НУК и 2,3 мкМ ИУК.

В качестве контроля во всех экспериментах служили безгормональные питательные среды.

Для оценки эффективности режима стерилизации рассчитывали процент стерильных эксплантов, как количество незараженных эксплантов к их общему количеству. При этом на этапе инициации культуры *in vitro*, а также при последующих экспериментах оценивали частоту регенерации (процентное соотношение эксплантов с развитыми адвентивными побегами к общему количеству эксплантов) и количество побегов (число хорошо развитых микролуковичек на одном экспланте).

Длительность пассажа на этапе введения в культуру *in vitro* составила 50-60 дней. Полученные адвентивные микролуковички отделяли от тканей первичного экспланта и переносили на среды для размножения.

Собственно размножение

На этапе оптимизации стадии собственно размножения были испытаны различные составы агаризованных питательных сред: MS, B₅ и BDS, дополненные экзогенными регуляторами роста. При приготовлении питательных сред мы всегда использовали растворы витаминов, хлорида кальция (II), хелата железа (II), соответствующие прописи среды MS (табл. 2). Все маточные растворы макро- и микроэлементов, органических веществ, регуляторов роста хранили в бытовом холодильнике при температуре +4 °С. В качестве источника углерода использовали сахарозу в концентрации 30,0 г/л. Для получения твердой питательной среды использовали агар марки «Bactoagar» (Panreac, Испания) в концентрации 6,0 г/л. Перед автоклавированием рН среды доводили до 5,7-5,8.

Ниже приведена методика приготовления питательных сред:

1. В мерный стакан наливали половину нужного объема дистиллированной воды, добавляли навески сахарозы, мезоинозита, необходимый объем макро- и микроэлементов, витаминов и регуляторов роста.
2. Доводили дистиллированной водой до нужного объема и определяли рН среды. Оптимальной являлась рН = 5,7-5,8, если рН превышала эти значения, то добавляли 0,1 н раствор HCl, если была ниже – 0,1 н раствор NaOH. После определения рН в раствор добавляли агар.
3. Приготовленную среду разливали по колбам и автоклавировали.
4. Проавтоклавированные среды разливали по стерильным культуральным сосудам.

На этапе собственно размножения при изучении влияния регуляторов роста на побегообразование использовали ростовые вещества цитокининовой природы: БАП, Кн, ТДЗ в концентрациях 0,1-10,0 мкМ, а так же ауксиновой природы: НУК, ИУК, 2,4-Д в концентрациях 0,2-5,0 мкМ. Культивирование микрорастений проводили в условиях свето-культуральной комнаты при интенсивности

освещения 4 клк и фотопериоде (16 ч свет, 8 ч темнота) при температуре $+23\pm 2$ °С. Продолжительность пассажа составляла 35-40 дней.

Таблица 2

Компонентный состав питательных сред

Компоненты среды	Концентрация (мг/л)		
	MS	B ₅	BDS
Макроэлементы			
NH ₄ NO ₃	1650,0	-	320,0
KNO ₃	1900,0	2500,0	2530,0
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	230,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134,0	134,0
NaH ₂ PO ₄ ×2H ₂ O	-	169,6	172,0
MgSO ₄ ×7H ₂ O	370,0	250,0	247,0
KH ₂ PO ₄	170,0	330,6	-
CaCl ₂ ×2H ₂ O	440,0		
Микроэлементы			
KJ	0,83	0,75	0,75
H ₃ BO ₃	6,2	3,0	3,0
MnSO ₄ ×4H ₂ O	22,3	10,0	13,2
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	8,6	2,0	2,0
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,025	0,025	0,039
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,025	0,025	0,025
FeSO ₄ ×7H ₂ O	27,8		
Na ₂ ЭДТА×2H ₂ O	37,3		
Органические вещества			
Мезоинозит	100,0		
Тиамин	0,1		
Пиридоксин	0,5		
Никотиновая кислота	0,5		
Сахароза	30000,0		
Агар	6000,0		

Укоренение и адаптация к условиям ex vitro

Для укоренения микролуковиц использовали питательные среды BDS, B₅, MS с уменьшенным в два раза содержанием макро- и микросолей, а также содержащие 0,5-1,0 г/л активированного угля. Питательные среды на этапе укоренения дополняли ауксинами НУК, ИУК, ИМК в концентрациях 1,5-5,0 мкМ.

На этапе индукции ризогенеза изучали влияние температур на преодоление покоя и развитие микрорастений, для этого культуры в течение 6-7 недель содержали в условиях фотопериода при различных температурах: при $+23\pm 2$ °C либо в условиях низкой положительной температуры $+7$ °C (холодовая стратификация) в световом термостате (RuMed, Германия). Также на данном этапе оценивали влияние концентрации сахарозы на рост и развитие луковички, для этого в среды вносили различные концентрации сахарозы 40,0; 50,0; 70,0 г/л, контролем являлись среды, содержащие 30,0 г/л сахарозы.

Для оценки эффективности ризогенеза подсчитывали частоту укоренения (процентное соотношение укоренных микролуковичек к общему количеству луковичек, высаженных на среду для индукции ризогенеза), количество образованных корней (шт.), их длину (мм), а также количество чешуй у микролуковички (шт.) и ее размер (мм).

Луковички размером не менее 5,0-5,5 мм с развитой корневой системой адаптировали к нестерильным условиям. На этапе адаптации использовали различные типы субстратов: сфагновый мох, смеси торфа и песка (3:1) либо измельченного кокосового волокна и песка (3:1). При этом пробирочные растения для адаптации высаживали либо сначала в сфагновый мох (1,5-2 месяца), а затем в субстрат, либо сразу в почвенный субстрат. В обоих случаях в течение первых 10-15 суток поддерживали высокую влажность, чтобы избежать увядания листьев.

Акклиматизацию к условиям *ex vitro* проводили 2 способами: в помещении при освещении люминесцентными лампами при температуре $+23\pm 2$ °C либо в условиях теплицы. В теплицу растения-регенеранты переносили в октябре-декабре, средняя температура в теплице в этот период составляла $+5-10$ °C (холодный отсек). На данном этапе также оценивали влияние температурных режимов, применяемых на этапе укоренения, на преодоление покоя луковичками и, как следствие, их прорастание. В том случае, если для развития луковичек требовалось преодолеть период покоя (в отсутствие холодной стратификации на этапе укоренения) применяли чередования теплых и холодных этапов: растения-

регенеранты, находящиеся в субстрате, выдерживали при $+5\pm 2$ °С в течение 4-6 недель затем в комнатных условиях при $+23\pm 2$ °С.

Эффективность адаптации оценивали как процентное соотношение луковичек, у которых развивался ассимилирующий лист при переносе в условия *ex vitro*, к общему количеству луковичек, высаженных в субстрат.

Морфо-гистологические исследования

Морфо-гистологические исследования проводили на базе Центра коллективного пользования ЦСБС СО РАН.

Морфологию структур, полученных при культивировании *in vitro*, и динамику их развития анализировали с помощью стереомикроскопа Stereo Discovery V 12 (Carl Zeiss, Германия). Детальное гистологическое изучение процессов морфогенеза исследуемых видов в культуре *in vitro* проводили на постоянных микроскопических препаратах, подготовленных по методике З.П. Паушевой (Паушева, 1988). Фиксировать растительный материал для последующего морфо-гистологического анализа начинали через 7-10 дней культивирования с периодичностью 3-5 дней. Образцы для дальнейшего изучения фиксировали в FAA – этанол (96 %): формалин (40 %): ледяная уксусная кислота (100:7:7). Промывку и дальнейшее хранение осуществляли в 70 % этаноле. Далее зафиксированный материал подготавливали для заливки в Paraplast (Sigma, США), последовательно применяя растворы этанола, смеси этанола и хлороформа, хлороформ. Тонкие срезы (7-9 мкм) получали на ротационном микротоме Microm HM 325 (Thermo Scientific, США), затем проводили дифференцированное окрашивание гематоксилином по Эрлиху с подкраской анилиновым синим. Гистологический анализ развития растений проводили с помощью светового микроскопа Axioskop-40 (Carl Zeiss, Германия) с программным управлением, оборудованным цифровой камерой AxioCam MRc5.

Статистическая обработка данных

Все эксперименты проводили трижды по 7-10 эксплантов в каждом опыте. Обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета программ Microsoft Office Excel 2007 и Statistica 6.0. Статистический анализ результатов

наблюдений проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа. В таблицах указаны средние арифметические величины, доверительный интервал, критерий Фишера, p -значение. В работе обсуждали различия, достоверные при 95%-ом уровне значимости.

ГЛАВА 3. МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ РЕДКИХ И ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ РОДА *FRITILLARIA* И ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Важным моментом клонального микроразмножения растений является выбор первичного экспланта. При этом необходимо учитывать как морфогенетический потенциал, так и доступность выбранного источника экспланта. Для разработки систем микроразмножения рябчиков в качестве эксплантов используют как надземные (Subotić et al., 2010; Carasso, Mucciarelli, 2014), так и подземные органы растений (Gao et al., 1999; Вечернина, 2004). Чаще для получения асептической культуры представителей рода *Fritillaria* применяют сегменты луковичных чешуй (Paek et al., 1994; Joshi et al., 2007; Эрст, Эрст, 2011) либо целые луковицы (Kukulczanka et al., 1989), что объясняется их высокой регенерационной активностью. При этом в культуре луковичных чешуй наиболее характерным типом морфогенного ответа является прямой органогенез с образованием адвентивных микролуковичек.

Перспективными источниками эксплантов также являются флоральные органы. Однако имеются только две работы, опубликованные одним коллективом авторов, в которых изучается регенерационный потенциал листочков околоцветника *F. imperialis* (Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2007; 2008). В культуре листочков околоцветника рябчика императорского исследователями получен как прямой органогенез побегов, так и непрямой соматический эмбриогенез. При этом для индукции морфогенных процессов в тканях первичных эксплантов необходимо внесение экзогенных регуляторов роста. Исследователями установлено, что прямую регенерацию стимулирует периодическое субкультивирование на безгормональной питательной среде В₅ (Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2008). Учитывая, что системы регенерации из флоральных органов разработаны только для одного вида рябчиков – *F. imperialis*, интерес представляет возможность использования данного типа эксплантов при культивировании других представителей этого таксона.

3.1. Регенерация побегов *de novo* из луковичных чешуй

Введение в культуру in vitro и регенерация побегов из луковичных чешуй

Исследования по введению в культуру *in vitro* рябчиков с использованием луковичных чешуй в качестве первичных эксплантов проводили на четырех видах: *F. dagana*, *F. sonnikovae*, *F. meleagris*, *F. meleagroides*.

Высокая степень контаминации подземных органов привела к необходимости использовать жесткие режимы стерилизации. В ходе работы было установлено, что последовательное использование 70 % этанола (30 сек) и 0,1 % хлорида ртути (II) с добавлением Tween 80 (30 мин) с последующим промыванием стерильной водой обеспечивает высокий процент стерильности первичных эксплантов. Так, применяемый режим стерилизации луковичных чешуй оказался эффективным, выход неинфицированных эксплантов варьировал в пределах 87-96 %.

На этапе инициации культуры *in vitro* использовали агаризованные питательные среды по прописи BDS и B₅, дополненные 5,0 мкМ БАП в сочетании с 2,0 мкМ НУК. Установлено, что использование питательных сред, содержащих регуляторы роста растений, стимулировало процессы регенерации в тканях первичных эксплантов представителей рода *Fritillaria* в сравнении с контрольной безгормональной средой (Кульханова и др., 2014). Частота регенерации адвентивных микролуковичек на средах, дополненных регуляторами роста, была в диапазоне от 49,0 до 76,9 %, а среднее количество формирующихся *de novo* микролуковичек – от 2,0 до 3,6 шт./эксп. На данном этапе выявлено, что сегменты чешуй *F. meleagroides* обладают меньшим регенерационным потенциалом среди других исследуемых видов (табл. 3).

Выявлены видовые различия по скорости морфогенного ответа. Так, первые изменения на поверхности луковичной чешуи – незначительное разрастание ткани экспланта – отмечали через 15-17 дней культивирования *F. sonnikovae*, при культивировании *F. meleagris* – на 20-27 день, *F. meleagroides* – на 30-35 день, а *F. dagana* – на 51-56 день после инокуляции на питательные среды. В среднем

регенерация адвентивных побегов – от появления выпячивания на поверхности экспланта до формирования луковички – занимала 12-17 дней.

Таблица 3

Влияние компонентов питательной среды на регенерацию адвентивных луковичек из тканей луковичных чешуй

Вид	B ₅		B ₅ + 5,0 мкМ БАП + 2,0 мкМ НУК		BDS + 5,0 мкМ БАП + 2,0 мкМ НУК	
	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.
<i>F. dagana</i>	-	-	66,7	3,6±0,4	52,3	3,2±0,9
<i>F. sonnikovae</i>	41,8	2,9±0,5	49,4	2,9±0,7	58,6	3,5±0,5
<i>F. meleagris</i>	62,5	1,8±0,7	69,7	2,6±0,5	-	-
<i>F. meleagroides</i>	39,9	2,2±0,3	50,3	2,0±0,7	49,0	2,3±0,5

Примечание: «-» – нет данных

Развития каллусной ткани на этапе инициации культуры *in vitro* не происходило, регенерация микролуковичек исследуемых видов протекала по пути прямого органогенеза. Закладку почек отмечали на неповрежденной части чешуи, выступающей над поверхностью питательной среды, однако их формирование чаще происходило близко к раневой поверхности (рис. 7). При этом разделение луковичной чешуи на сегменты, то есть поранение тканей, стимулировало процессы регенерации. Подобные результаты положительного влияния поранений исследователи объясняют активацией клеточных делений в области повреждений, что составляет одну из основ регенерации (Tanaka et al., 2000; Song et al., 2011). В естественных условиях формирование адвентивных почек на чешуях луковиц происходит также в результате деятельности раневой или вторичной латеральной меристем (Баранова, 2000). Однако не отмечено более активной регенерации в области донца. При этом наши результаты отличаются от данных, полученных другими исследователями. Так, согласно С.К. Джоши с соавторами при культивировании сегментов луковичных чешуй *F. roylei* Hook базальная часть чешуи отличалась более высоким морфогенетическим потенциалом в сравнении с дистальной (Joshi et al., 2007). Подобные результаты получены и для других

геофитов, например, *Lilium longiflorum* (Marinangeli et al., 2003) и декоративных видов лука подрода *Melanocrommyum* Webb et Berthel. (Полубоярова, 2011). В целом, морфогенез протекал асинхронно: на поверхности экспланта имелись, как только закладывающиеся почки, так и хорошо сформированные микролуковички, состоящие из 2-4 чешуй.

Исследовано влияние холодной стратификации ($+5\pm 2$ °C) интактных луковиц на активацию регенерационных процессов в тканях первичных эксплантов. На примере *F. meleagris* показано, что при предварительном выдерживании интактных луковиц при пониженных температурах морфогенные реакции отмечали на 20-25 день. В отсутствие холодной стратификации регенерация начиналась на 5-7 дней позже. Среднее количество адвентивных микролуковичек в обоих случаях было одинаковым – 2,4-2,6 шт./эксп. Однако отсутствие предварительного этапа холодной стратификации приводило к прекращению роста образовавшихся микролуковичек уже во втором пассаже и торможению дальнейшего побегообразования на этапе собственно размножения. У микроклонов рябчика шахматного, которые были получены из чешуй, прошедших холодную стратификацию, подобной остановки адвентивного побегообразования не наблюдали.

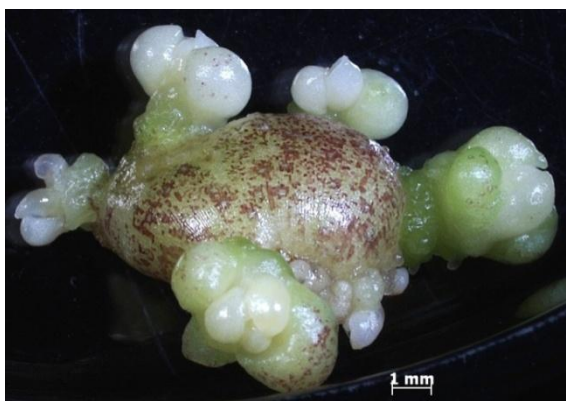


Рис. 7. Регенерация микролуковичек *F. sonnikovae* на поверхности первичного экспланта на среде BDS, дополненной 5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК, 47 день культивирования

Влияние минерального состава питательной среды и регуляторов роста на морфогенез на этапе собственно размножения

Подбор оптимальных питательных сред по минеральному составу, концентрации и комбинации регуляторов роста является ключевым фактором,

способствующим развитию имеющихся у растения меристем или закладке их *de novo* (Бутенко, 1964).

Fritillaria sonnikovae. Основным типом морфогенного ответа в культуре ткани *F. sonnikovae* был прямой органогенез побегов. При этом регенерация микропобегов рябчика Сонниковой на стадии собственно размножения проходила синхронно: к концу пассажа в одном конгломерате микролуковички имели схожие размеры и количество луковичных чешуй (рис. 8). На 35-40 день культивирования микропобеги достигали 3,0-4,5 мм в диаметре и состояли из 3-4 чешуй. Для дальнейшего роста луковичек достаточно было увеличить длительность пассажа до 50-55 дней либо пересадить их на свежую безгормональную среду.

На основании данных дисперсионного анализа не удалось выявить наиболее значимых факторов, оказывающих влияние на количество образующихся побегов на этапе собственно размножения (табл. 4). Однако для сред BDS и B₅ были характерны сходные показатели частоты регенерации микрорастений рябчика Сонниковой, в то время как на среде MS отмечали ее снижение. Учитывая это, дальнейшую работу проводили с использованием минеральных основ BDS и B₅ (табл. 4). Подобные результаты были получены и при культивировании других исследуемых видов.



Рис. 8. Конгломерат микролуковичек *F. sonnikovae* на среде BDS без регуляторов роста, 29 день культивирования

Влияние минерального состава питательной среды и регуляторов роста
на регенерацию луковичек *F. sonnikovae* в культуре *in vitro*

Регуляторы роста, мкМ	Минеральная основа					
	BDS		B ₅		MS	
	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.
Контроль (безгормональная среда)	42,7	4,1±0,2	17,1	3,5±0,9	40,5	3,3±0,4
БАП 0,1	61,3	4,1±0,7	55,4	4,5±0,9	-	
БАП 0,5	58,8	4,3±1,5	26,1	3,3±1,0	-	
БАП 5,0	33,7	3,3±0,6	40,7	3,7±0,6	-	
БАП 5,0+НУК 2,0	56,3	4,6±0,4	41,1	3,4±0,7	30,3	3,2±0,6
БАП 10,0+НУК 2,0	66,2	4,0±0,8	60,0	3,7±0,4	-	
ТДЗ 0,1	-		61,3	4,1±0,6	-	
ТДЗ 0,5	76,5	3,1±1,2	53,8	4,2±0,5	-	
ТДЗ 5,0	-		56,9	4,2±0,9	25,0	2,9±0,4
ТДЗ 5,0+НУК 2,0	30,3	3,9±1,4	58,1	3,6±0,9	-	
ТДЗ 10,0+НУК 2,0	42,9	3,6±1,2	53,6	4,7±1,1	-	
Кн 0,5	67,9	3,7±0,5	-		-	
БАП 2,2+2,4-Д 0,5	47,6	2,9±0,6	-		-	
БАП 0,4 +НУК 3,2+ ИУК 2,3	59,2	3,3±0,6	51,3	3,5±0,6	-	
БАП 4,4+НУК 0,3+ ИУК 0,2	-		62,9	3,9±0,8	-	
Фактор			<i>F</i>	<i>p</i>		
Минеральная основа			0,017	0,8970	недостовверно	
Регуляторы роста			1,672	0,0819	недостовверно	
Минеральная основа × Регуляторы роста			1,387	0,1802	недостовверно	

Примечание: $p \leq 0,05$; «-» – нет данных

Высокие показатели роста и развития микролуковичек наблюдали на контрольной безгормональной среде BDS (регенерация – 42,7 %, количество побегов – 4,1±0,2 шт./эксп.) на протяжении длительного периода культивирования (два года). Это можно объяснить накоплением в луковичных

чешуях регуляторов роста, используемых на этапе инициации культуры *in vitro* (Кульханова и др., 2015). В целом, внесение в питательную среду экзогенных регуляторов роста на стадии собственно размножения сопровождалось незначительным увеличением активности побегообразования *F. sonnikovae* в культуре *in vitro*. Однако в некоторых вариантах активность регенерации была ниже, чем на контрольной среде.

Установлено, что добавление в питательную среду BDS регуляторов роста 5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК индуцировало формирование адвентивных почек на 12-15 день культивирования, тогда как на безгормональной питательной среде BDS этот период составлял 22-25 дней. Данная комбинация регуляторов роста обеспечивала активную регенерацию микролуковичек и может считаться оптимальной: среднее количество луковичек на эксплант – $4,6 \pm 0,4$ шт., частота регенерации – 56,3 %. Высокие показатели роста и развития также наблюдали на питательной среде BDS, дополненной 10,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК: частота регенерации достигала 66,2 %, при этом образовывалось $4,0 \pm 0,8$ адвентивных луковичек на эксплант.

Использование низких концентраций БАП, Кн и ТДЗ (0,1 и 0,5 мкМ) вне зависимости от минерального состава среды приводило к формированию желтого, морфогенного каллуса. При этом частота образования морфогенного каллуса не превышала 38,0 %. Формирование почек на поверхности каллуса наблюдали только через 5 недель культивирования, что значительно позднее, чем на средах дополненных цитокининами и ауксинами. В дальнейшем эти почки давали начало микролуковичкам, то есть протекал непрямой органогенез. Однако только 28,0 % заложившихся почек развивались в микролуковички (рис. 9). Данная тенденция особенно ярко прослеживалась на питательной среде BDS, дополненной 0,5 мкМ ТДЗ: несмотря на высокий процент регенерации и количество закладывающихся почек (до 11 шт.), в результате развития конгломерата удавалось получить лишь $3,1 \pm 1,2$ шт. хорошо сформированных луковичек.

Хотя дисперсионный анализ не выявил значительного влияния факторов среды на количество формирующихся микропобегов, нами установлено, что

добавление в питательную среду BDS 5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК способствует ускорению регенерации почти в два раза в сравнении с контролем и средами, дополненными только цитокининами.

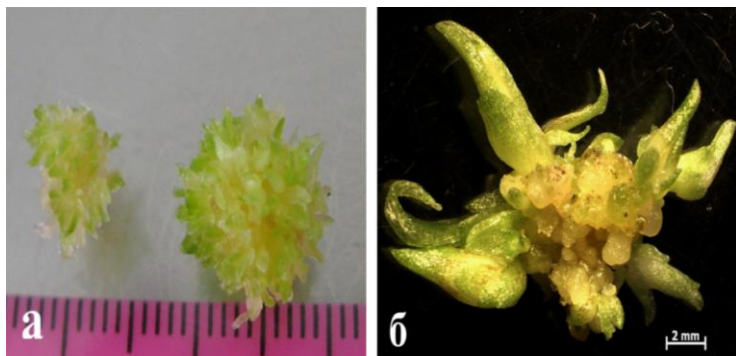


Рис. 9. Непрямая регенерация *F. sonnikovae* на поверхности морфогенного каллуса: а – массовая закладка почек на среде BDS, дополненной 0,5 мкМ ТДЗ, 42 день культивирования; б – конгломерат луковичек на среде V_5 , дополненной 0,1 мкМ ТДЗ, 51 день

Fritillaria dagana. В ходе исследования не выявлено влияние минерального состава питательных сред (V_5 и BDS) на активность регенерации микролуковичек *F. dagana* (табл. 5). При этом установлено значительное влияние регуляторов роста на количество образующихся адвентивных побегов. Более эффективными были низкие концентрации БАП и ТДЗ (0,1 и 0,5 мкМ). Внесение в среду по прописи V_5 0,1 мкМ БАП приводило к разрастанию ткани экспланта и формированию на его поверхности наибольшего количества адвентивных луковичек ($5,0 \pm 1,5$ шт./эксп.) с частотой 56,5 %, что позволяет рассматривать эту среду как оптимальную (рис. 10). На данной питательной среде, также как при культивировании рябчика Сонниковой, отмечали образование желто-зеленого

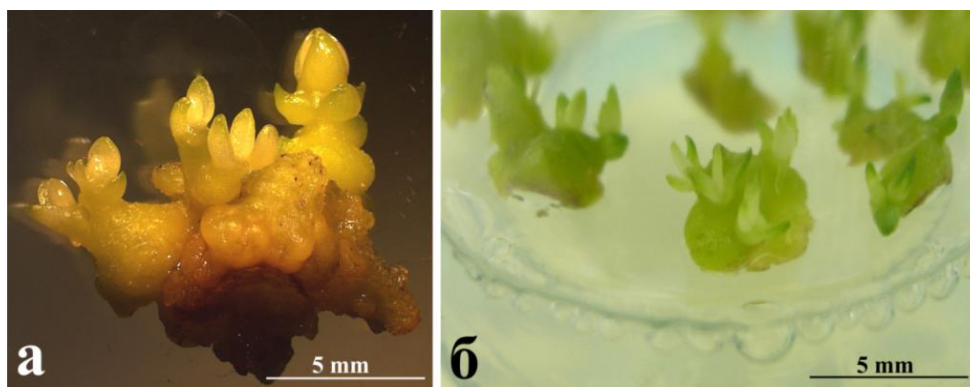


Рис. 10. Адвентивные луковички *F. dagana*: а – луковички на поверхности морфогенного каллуса, среда BDS, дополненная 0,5 мкМ БАП, 31 день культивирования; б – луковички, формирующиеся на разросшейся ткани экспланта, среда V_5 , дополненная 0,1 мкМ БАП, 23 день

морфогенного каллуса (37 %), длительное пассирование (более 40 дней) которого приводило к закладке адвентивных микропочек. Однако частота регенерации побегов на поверхности морфогенного каллуса не превышала 32 %. Следовательно, на данной среде отмечали как прямую, так и непрямую регенерацию.

Увеличение концентрации цитокининов (БАП и ТДЗ) в среде более 0,5 мкМ угнетало побегообразование. При этом Кн (0,5 мкМ) обладал наименьшей морфогенной активностью из всех используемых цитокининов.

Таблица 5

Влияние минерального состава питательной среды и регуляторов роста на регенерацию луковичек *F. dagana* в культуре *in vitro*

Регуляторы роста, мкМ	Минеральная основа			
	BDS		B ₅	
	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.
Контроль (безгормональная среда)	33,1	2,3±0,6	30,2	2,4±0,4
БАП 0,1	-		56,5	5,0±1,5
БАП 0,5	55,0	3,2±1,1	44,7	2,7±0,5
БАП 5,0	41,9	2,6±0,9	30,0	3,7±0,9
БАП 5,0+НУК 2,0	44,4	2,1±0,4	55,3	2,1±0,4
БАП 10,0+НУК 2,0	19,0	1,3±0,5	31,7	1,8±0,5
ТДЗ 0,1	51,7	3,5±1,2	21,8	3,4±1,1
ТДЗ 0,5	40,1	3,5±0,6	50,4	2,5±0,4
ТДЗ 5,0	28,0	2,7±0,8	26,2	3,7±1,7
ТДЗ 10,0+НУК 2,0	52,0	2,4±0,7	35,0	2,4±0,8
Кн 0,5	31,5	2,9±0,7	-	
БАП 2,2+2,4-Д 0,5	35,7	2,3±0,5	-	
БАП 0,4+НУК 3,2+ИУК 2,3	-		36,5	2,7±0,5
Фактор				
Минеральная основа		F	p	
Минеральная основа		0,2320	0,6303	недостаточно
Регуляторы роста		2,9838	0,0028	достаточно
Минеральная основа × Регуляторы роста		1,6453	0,1097	недостаточно

Примечание: $p \leq 0,05$; «-» – нет данных

Сочетание высокой концентрации БАП (10,0 мкМ) и НУК (2,0 мкМ) снижало коэффициент размножения до $1,3 \pm 0,5$ луковички на эксплант, а частоту регенерации до 19 %. Интересно, что данная комбинация регуляторов роста оказалась эффективной для микроразмножения *F. sonnikovae*.

Fritillaria meleagris. Регенерация побегов *F. meleagris* проходила по пути прямого органогенеза. Культивирование на средах, дополненных регуляторами роста, стимулировало побегообразование в сравнении с контролем, при этом частота регенерации увеличивалась с 50,0 до 75,3 % (табл. 6). Наиболее эффективным было использование питательной среды В₅, содержащей 5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК. На данной среде получены максимальные частота регенерации и количество адвентивных луковичек на эксплант.

Таблица 6

Влияние регуляторов роста на регенерацию луковичек *F. meleagris*
в культуре *in vitro*, среда В₅

Регуляторы роста, мкМ	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.
Контроль (безгормональная среда)	50,0	$1,8 \pm 0,7$
БАП 5,0+НУК 2,0	75,3	$2,5 \pm 0,6$
БАП 0,4 +НУК 3,2 +ИУК 2,3	66,8	$2,2 \pm 0,4$

Fritillaria meleagroides. При культивировании растений *F. meleagroides* на питательных средах различного минерального и гормонального состава отмечали интенсивный рост каллусной ткани (100 %), при этом развивались луковички с обводненными чешуями (рис. 11). Формирующийся каллус был рыхлый, зернистый, имел цвет от желтого до буро-зеленого, характерным было накопление пигментов в поверхностных слоях клеток и обводненность каллусной ткани. Сравнение различных цитокининов показало, что независимо от используемого регулятора роста в культуре рябчика малого протекает каллусогенез, объясняемый генотипическими особенностями.

На этапе собственно размножения использовали питательную среду В₅, дополненную 5,0 мкМ БАП и 5,0 мкМ НУК, которая ранее была рекомендована Н.А. Вечерниной для клонального микроразмножения растений данного вида

(Вечернина, 2004) (табл. 7). Однако положительных результатов при культивировании *F. meleagroides* на данной питательной среде получено не было: частота регенерации не превышала 16,1 %, а количество адвентивных микролуковичек $2,1 \pm 0,3$ шт./эксп. В тоже время, замена ауксина с НУК на ИУК и минеральной основы с B_5 на BDS приводила к увеличению частоты побегообразования до 57,9 % и активации непрямого геммогенеза с образованием в среднем $2,8 \pm 0,9$ луковичек на эксплант. Однако при сравнении всех вариантов питательных сред установлено, что частота регенерации микролуковичек выше на минеральной основе B_5 , при этом более эффективно использование сред, содержащих цитокинины совместно с ауксинами, позволяющее получить до 3 луковичек на эксплант (Кульханова и др., 2014). Результаты дисперсионного анализа также подтвердили комплексное влияние минеральной основы и регуляторов роста на количество формирующихся *de novo* побегов (см. табл. 7). Оптимальным являлось культивирование микрорастений на питательной среде B_5 , дополненной 0,4 мкМ БАП в сочетании с 3,2 мкМ НУК и 2,3 мкМ ИУК: частота регенерации 80%, количество адвентивных луковичек $2,1 \pm 0,5$ шт./эксп.

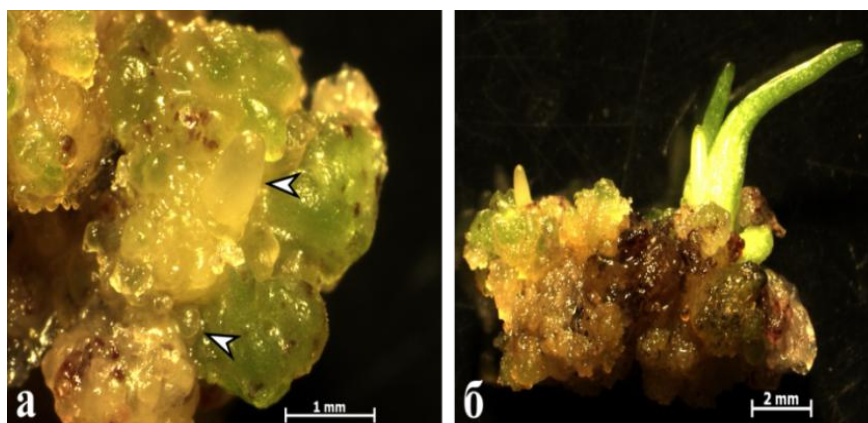


Рис. 11. Морфогенный каллус *F. meleagroides* на питательной среде BDS, дополненной 5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК, конец пассажа: а – закладка почек, б – луковичка на поверхности каллуса

Было отмечено, что использование только цитокининов в низких концентрациях (0,1 и 0,5 мкМ), вызывающих пролиферацию побегов в культуре *F. dagana* и *F. sonnikovae*, снижало активность побегообразования у микрорастений рябчика малого.

Влияние минерального состава питательной среды и регуляторов роста на регенерацию луковичек *F. meleagroides* в культуре *in vitro*

Регуляторы роста, мкМ	Минеральная основа			
	BDS		B ₅	
	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.
Контроль (безгормональная среда)	33,3	2,5±0,3	52,9	1,6±0,3
БАП 0,1	-	-	25,7	1,8±0,3
БАП 0,5	-	-	67,0	1,8±0,3
БАП 5,0	45,8	2,1±0,3	37,5	2,0±0,9
БАП 5,0+НУК 2,0	57,9	2,3±0,5	36,6	2,4±0,6
БАП 5,0+НУК 5,0	-	-	16,1	2,1±0,3
ТДЗ 0,1	-	-	38,5	1,5±0,3
ТДЗ 0,5	18,2	1,8±0,5	29,0	2,3±0,3
ТДЗ 5,0	-	-	8,0	1,7±0,4
ТДЗ 5,0+НУК 2,0	-	-	78,6	2,0±0,6
Кн 0,5	21,4	1,6±0,5	-	-
БАП 5,0+ИУК 5,0	57,9	2,8±0,9	-	-
БАП 0,4+НУК 3,2+ИУК 2,3	-	-	80,0	2,1±0,5
Вариант		<i>F</i>	<i>p</i>	
Минеральная основа		0,3348	0,5636	недостаточно
Регуляторы роста		0,7427	0,5282	недостаточно
Минеральная основа × Регуляторы роста		3,0124	0,0320	достаточно

Примечание: $p \leq 0,05$; «-» – нет данных

Для микрорастений *F. meleagroides* характерно медленное формирование луковичек *in vitro*: дифференциацию луковички с развитыми чешуями наблюдали лишь через 3-4 месяца культивирования. При этом пересадка микролуковичек для дальнейшего развития на безгормональные среды приводила к некрозу тканей. В целом, среди всех исследуемых видов для рябчика малого характерно самое низкое количество адвентивных микролуковичек, формирующихся за один пассаж.

Итак, в нашем исследовании показана высокая морфогенная активность луковичных чешуй, как первичных эксплантов, в культуре *in vitro*. При этом для инициации и заложения структур *de novo* необходимо воздействие на ткани

экспланта регуляторов роста (БАП и НУК) и длительный начальный период культивирования до развития первых адвентивных побегов. Внесение регуляторов роста на стадии собственно размножения исследуемых видов стимулировало побегообразование. При этом луковички из культуры *in vitro* легко включались в последующие циклы микроразмножения. Необходимо отметить, что высокий морфогенетический потенциал у исследуемых видов сохранялся на протяжении длительного выращивания в культуре *in vitro* (2 года).

Как правило, к концу 2-3 пассажей микрорастения имели 1-2 ассимилирующих листа с развитой листовой пластинкой и соответствовали виргинильным растениям 2-го года развития (рис. 12). Это является свидетельством ускорения развития рябчиков в культуре *in vitro*, так как в природных условиях первый ассимилирующий лист (розеточный) у *F. meleagris* появляется лишь на 2 год при посадке из семян (Седельникова, 2002). Ускорение онтогенеза в культуре *in vitro* отмечалось также у лилии кудреватой (*L. martagon* L.) (Мухаметвафина, Ишмуратова, 2007) и различных декоративных видов лука (Полубоярова, 2011).



Рис. 12. Луковички *F. sonnikovae* с развитыми ассимилирующими листьями на питательной среде BDS, дополненной 0,4 мкМ БАП + 3,2 мкМ НУК + 2,3 мкМ ИУК, 33 день культивирования

Установленное нами положительное действие совместного использования цитокининов и ауксинов при клональном микроразмножении рябчиков ранее отмечали во многих публикациях (Otani, Shimada, 1997; Gao et al., 1999; Joshi et al., 2007; Wang et al., 2009). Согласно литературным данным для стимуляции побегообразования *in vitro* большинства представителей рода *Fritillaria* применяют регуляторы роста, традиционно БАП, НУК, ИУК. Однако в ходе

работы исследователи получали значительные различия в количестве образующихся побегов – от 1,2 до 10,5 шт./эксп., что можно объяснить, как влиянием применяемых экзогенных регуляторов роста, так и видовыми особенностями культивируемых растений.

На этапе собственно размножения изучаемых видов в культуре луковичных чешуй проявлялась видоспецифичность морфогенного ответа изучаемых рябчиков на действие регуляторов роста при использовании минеральных сред различного состава. Так, для клонального микроразмножения *F. dagana* оказалось оптимальным внесение 0,1 мкМ БАП в питательную среду по прописи В₅. Комбинация 5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК и минеральной основы BDS была наиболее эффективной для микроразмножения *F. sonnikovae*. Данная комбинация регуляторов роста на питательной среде В₅ стимулировала побегообразование в культуре *F. meleagris*. Высокую частоту геммогенеза *F. meleagroides* отмечали на питательной среде В₅ при сочетании 0,4 мкМ БАП с 3,2 мкМ НУК и 2,3 мкМ ИУК. Однако общим для исследуемых видов являлась большая эффективность БАП в сравнении с другими цитокининами. Несмотря на то, что использование ТДЗ (0,1-10,0 мкМ) для индукции побегообразования на этапе собственно размножения сопровождалось закладкой адвентивных почек на поверхности каллуса, частота развития побегов из этих почек была низкой у всех исследуемых видов. Закладка почек также происходила медленнее (на 3-3,5 недели), чем на других изучаемых средах. При этом часто формировались гипергидратированные почки со слабой дифференциацией листовых примордиев. Ранее негативное влияние ТДЗ на регенерацию различных видов и сортов лилий, выражающееся в морфологических аномалиях побегов и замедлении их развития, отмечали Л. Бакчетта с соавторами (Bacchetta et al., 2003) и А. Парик с соавторами (Parić et al., 2011).

Необходимо отметить, что при культивировании рябчика Сонниковой и рябчика дагана наблюдали как прямой, так и непрямой органогенез. В культуре *F. meleagroides* на стадии собственно размножения наблюдали исключительно

непрямой органогенез на всех вариантах питательных сред, что можно объяснить видовыми особенностями.

Установлено, что в культуре луковичных чешуй *F. dagana* и *F. meleagroides* на количество образующихся адвентивных побегов значительно влияют регуляторы роста либо минеральная основа совместно с регуляторами роста. Однако при клональном микроразмножении *F. sonnikovae* не удалось выявить наиболее значимых факторов по отношению к количеству образующихся побегов. Тем не менее, использование среды дополненной регуляторами роста (5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК) способствовало ускорению процессов регенерации в культуре рябчика Сонниковой.

3.2. Регенерация побегов *de novo* из флоральных органов

Исследования по определению морфогенетического потенциала флоральных эксплантов проводили на растениях *F. meleagris* с белой и фиолетовой окраской околоцветника (рис. 13).



Рис. 13. Бутоны *F. meleagris*, используемые в качестве источников первичных эксплантов (а), цветок с частично удаленными долями околоцветника (б)

Введение в культуру in vitro и регенерация побегов из флоральных эксплантов

При использовании цветочных бутонов в качестве источников первичных эксплантов помимо обеспечения высокой степени стерильности, необходимо снизить повреждающее действие стерилизующего агента. При использовании 25 % раствора «Domestos» наблюдали некроз ткани листочков околоцветника

через 4-7 дней после инокуляции на питательные среды. Поверхностная стерилизация цветочных бутонов 20 % раствором «Domestos» (20 мин) оказалась более щадящей, при этом выход асептических эксплантов достигал 91-98 %, жизнеспособность составила 76 %.

Листочки околоцветника. Через 5-8 дней после инокуляции листочков околоцветника на питательные среды отмечали разрастание ткани в базальной части листочка (Кульханова, Новикова, 2014). На 23-25 дни с начала эксперимента в данной зоне наблюдали появление первых выпячиваний, дающих начало почкам, при этом разросшаяся ткань основания листочка приобретала зеленый цвет (рис. 14, а). Позднее листочек темнел и засыхал, морфогенные реакции протекали только в тканях его основания. При этом формирования каллусной ткани при использовании листочков околоцветника в качестве первичных эксплантов не происходило. Отмечена асинхронность в регенерации побегов: одновременно наблюдали как формирование почек, так и побеги размером 4-6 мм (рис. 14, б). Через 35-46 дней после введения в культуру *in vitro* отмечали образование хорошо сформированных микролуковичек с 1-2 чешуйками и развивающимися листьями (рис. 14, в).

Морфогенез исключительно в основании листочка можно объяснить активностью вставочных меристем, которые обеспечивают рост органов цветка, не успевших закончить свое развитие и сохранивших морфогенный потенциал (Wuka et al., 2006). Кроме того, близость к нектарникам способствует высокой интенсивности питания тканей в данной области, что увеличивает регенерационный потенциал (Gibson, 2005).

Наибольшая доля жизнеспособных эксплантов и морфогенная активность были характерны для листочков нераскрытых бутонов рябчика шахматного. Подобные результаты были получены С.Д. Палмер и В.А. Келлер в работе с лепестками *Hypericum perforatum* L. (Palmer, Keller, 2011). Каллусогенез и регенерацию побегов с частотой 100 % наблюдали при использовании в качестве источника первичных эксплантов нераскрытых бутонов, у которых лепестки частично выступают из-под чашелистиков. Низкую морфогенную активность

лепестков раскрытых бутонов авторы объясняют старением клеток (Palmer, Keller, 2011).

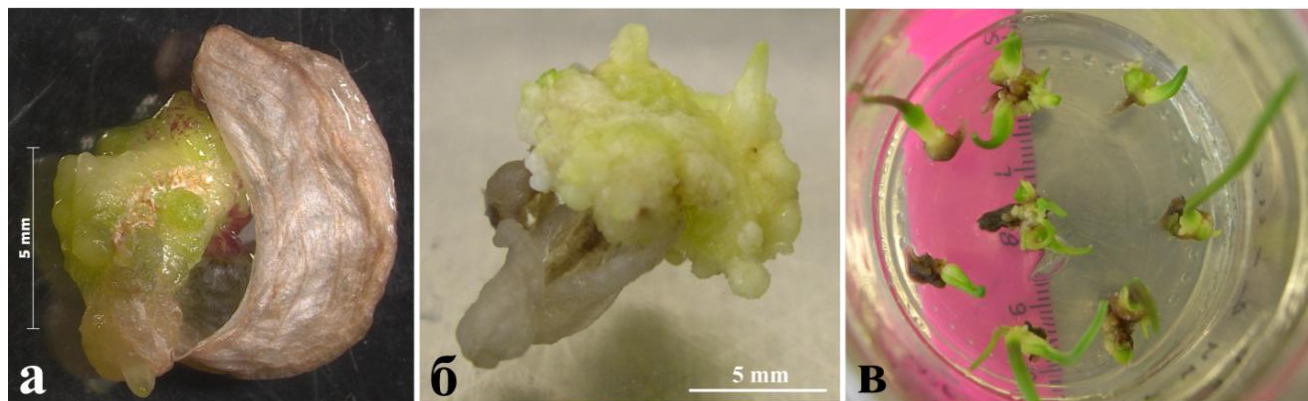


Рис. 14. Морфогенез *F. meleagris* в культуре листочков околоцветника на питательной среде В₅, дополненной 0,4 мкМ БАП + 3,2 мкМ НУК + 2,3 мкМ ИУК: а – разрастание базальной части листочка, формирование выпячиваний, 25 день культивирования; б – развитие микропочек на поверхности разросшейся ткани экспланта, 34 день; в – сформированные *de novo* микролуковички через 65 дней

Нами установлено, что активность морфогенных процессов в тканях первичного экспланта зависела от гормонального состава индукционных сред. На контрольной безгормональной среде регенерация побегов не происходила, а ткань листочков подвергалась некрозу. Использование только БАП (без ауксинов) в концентрациях 0,1 и 0,4 мкМ не приводило к побегообразованию, листочки на данных средах засыхали через 13-20 дней культивирования. Культивирование на питательной среде В₅, дополненной 0,4 мкМ БАП в сочетании с 3,2 мкМ НУК и 2,3 мкМ ИУК, стимулировало морфогенез в тканях листочков околоцветника (табл. 8). На данной среде регенерация достигала 56,3 %, в среднем образовывалось $4,4 \pm 0,5$ луковички на эксплант. При этом на питательной среде с такой же концентрацией ауксинов, но увеличенной в 10 раз концентрацией цитокинина (4,4 мкМ БАП) регенерационный ответ был значительно ниже. Следовательно, для индукции морфогенеза из тканей листочков околоцветника в культуре *in vitro* необходимо присутствие в питательной среде ауксинов.

Влияние регуляторов роста на регенерацию адвентивных луковичек *F. meleagris*
из флоральных эксплантов, среда В₅

Регуляторы роста, мкМ	Листочки околоцветника		Тычинки		Завязь	
	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.
Контроль (безгормональная среда)	0	0	0	0	0	0
БАП 0,1	0	0	-	-	-	-
БАП 0,4	0	0	-	-	-	-
БАП 0,4+НУК 3,2 + ИУК 2,3	56,3	4,4±0,5	36,2	2,5±0,3	41,0	2,2±0,3
БАП 4,4+НУК 3,2+ ИУК 2,3	16,4	1,2±0,8	10,0	0,9±0,6	8,3	1,1±0,3

Примечание: «-» – нет данных

Тычинки. При использовании тычинок (тычиночная нить и пыльник) в качестве первичных эксплантов первые изменения наблюдали на 21-25 день культивирования: разрастание основания тычиночной нити и каллусогенез в зоне поранения с последующим органогенезом. Образующийся каллус был средней плотности, зернистый, окрашен в зеленый цвет. Регенерационной способностью обладала лишь базальная часть тычиночной нити, остальная часть нити и пыльник отмирали в процессе культивирования (рис. 15). Побегообразование протекало синхронно, формирующиеся луковички через 35-42 дней культивирования достигали 2-3 мм.

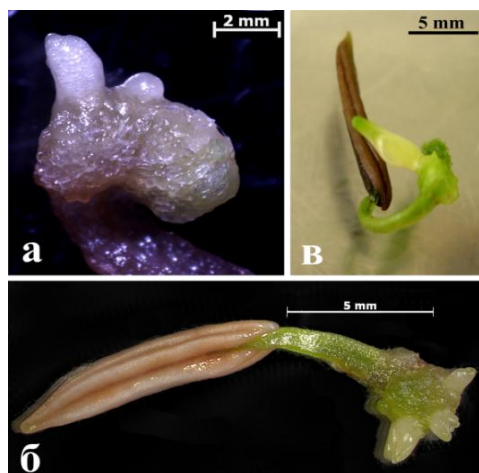


Рис. 15. Стадии морфогенеза микролуковичек *de novo* из тканей тычиночной нити *F. meleagris* на питательной среде В₅, дополненной 0,4 мкМ БАП + 3,2 мкМ НУК + 2,3 мкМ ИУК: а – закладка почек на поверхности морфогенного каллуса, 21 день культивирования, б – развивающиеся микропочки, в – сформированная микролуковичка, 36 день

Завязь. В работе по введению в культуру *in vitro* использовали как завязь с тычинками, так и изолированную завязь (рис. 16). В обоих случаях наблюдали разрастание стенок основания завязи, а также отмирание рыльца и столбика. Отмечали увеличение основания тычиночной нити при использовании совместно завязи и тычинок, как и в случае изолированных тычинок. Установлено, что морфогенной являлась вся поверхность завязи. Помимо разрастания ткани наблюдали образование светло-зеленого каллуса, на поверхности которого в дальнейшем протекал органогенез.

Регенерация побегов в культуре завязи проходила асинхронно. При сравнении с другими типами эксплантов формирование побегов из тканей завязи протекало медленнее, и появление первых выпячиваний отмечали лишь через 36-45 дней после введения в культуру *in vitro*.

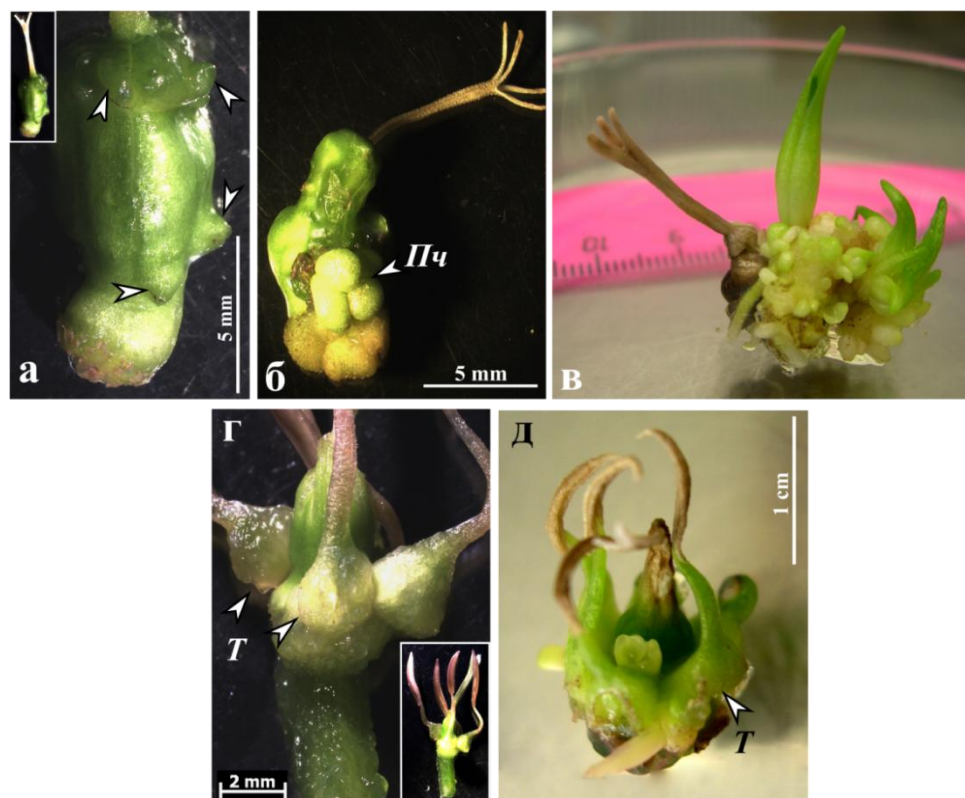


Рис. 16. Регенерация микролуковичек *F. meleagris* в культуре завязи, среда В₅, дополненная 0,4 мкМ БАП + 3,2 мкМ НУК + 2,3 мкМ ИУК: а – закладка микропочек (стрелки) на стенке завязи, 38 день культивирования, б – почка в основании завязи, в – конгломерат микропобегов, находящихся на разной стадии развития, 64 день, г – разрастание основания тычиночной нити и завязи, 30 день, д – микропобеги, формирующиеся в основании тычинки, 44 день; а-в – завязь без тычинок, г-д – завязь совместно с тычинками; Пч – почка, Т – основание тычиночной нити

При культивировании тычинок и завязей также выявлено влияние экзогенных регуляторов роста на процессы регенерации. Оптимальной для инициации морфогенных процессов в тканях данных эксплантов являлась питательная среда В₅, дополненная 0,4 мкМ БАП в сочетании с 3,2 мкМ НУК и 2,3 мкМ ИУК (см. табл. 8). При этом частота регенерации и количество образующихся побегов в культуре завязей и тычинок были почти в два раза ниже, чем при использовании листочков околоцветника в качестве первичных эксплантов (на данной питательной среде).

Таким образом, морфогенетический потенциал флоральных эксплантов *F. meleagris* возрастает в ряду: тычинки – завязь – листочки околоцветника. Учитывая, что для листочков околоцветника также характерно наибольшее количество закладывающихся побегов, их следует считать более эффективными первичными эксплантами флоральной природы.

Влияние минерального состава питательной среды и регуляторов роста на морфогенез на этапе собственно размножения

Микролуковички, полученные из различных типов эксплантов на стадии инициации культуры *in vitro*, отделяли от первичного экспланта и культивировали на питательных средах (В₅ и BDS) с целью оптимизации стадии собственно размножения. Наибольшее влияние на количество адвентивных микролуковичек оказывали регуляторы роста, а также их взаимодействие с минеральной основой питательной среды (табл. 9). При оценке влияния регуляторов роста на адвентивное побегообразование *F. meleagris* установлено, что максимальное количество побегов формируется на питательной среде В₅, дополненной 0,4 мкМ БАП в сочетании с 3,2 мкМ НУК и 2,3 мкМ ИУК (Мурасева и др., 2015). Такое сочетание минеральной основы и регуляторов роста с преобладанием ауксинов способствовало формированию в среднем $3,9 \pm 0,3$ адвентивных микролуковичек на эксплант, частота регенерации при этом составляла 80,2 %.

Из таблицы 9 видно, что использование только ауксинов, или только цитокининов на стадии размножения приводило к снижению формирования микролуковичек *de novo*. Сходные результаты были получены при

культивировании *Lilium davidii* Duch. ex Elwes 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, Niederwieser, 1999), что нередко способствовало появлению соматклональной изменчивости.

Таблица 9

Влияние минерального состава питательной среды и регуляторов роста на регенерацию луковичек *F. meleagris* в культуре *in vitro*

Регуляторы роста, мкМ	Минеральная основа			
	BDS		B ₅	
	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.
Контроль (безгормональная среда)	40,6	2,2±0,3	71,0	2,6±0,2
БАП 0,1	58,5	2,1±0,3	-	
БАП 0,5	48,2	2,4±0,8	81,0	3,2±0,3
БАП 5,0	-		79,7	2,3±0,3
БАП 5,0+НУК 2,0	43,1	2,7±0,4	77,0	3,1±0,3
БАП 10,0+НУК 2,0	100,0	1,9±0,4	73,3	2,1±0,3
ТДЗ 0,1	48,9	2,5±0,4	-	
ТДЗ 0,5	38,2	3,0±0,4	85,7	2,6±0,3
ТДЗ 10,0+НУК 2,0	41,9	3,1±0,5	72,2	2,8±0,7
БАП 2,2+2,4-Д 0,5	73,0	3,2±0,8	67,9	2,3±0,2
БАП 0,4+НУК 3,2+ИУК 2,3	-		80,2	3,9±0,3
НУК 3,2+ИУК 2,3	-		47,4	3,0±0,5
НУК 0,3+ИУК 0,2	-		57,1	2,8±0,3
БАП 4,4+НУК 0,3	-		58,6	2,1±0,2
БАП 4,4+НУК 0,3+ИУК 0,2	-		40,9	2,5±0,3
Фактор				
		<i>F</i>	<i>p</i>	
Минеральная основа		1,148	0,2842	недостаточно
Регуляторы роста		4,879	0,0000	достаточно
Минеральная основа × Регуляторы роста		3,017	0,0064	достаточно

Примечание: $p \leq 0,05$; «-» – нет данных

При увеличении концентрации БАП до 10,0 мкМ в сочетании с 2,0 мкМ НУК на среде BDS отмечали 100 % регенерацию из тканей экспланта, однако происходило снижение активности побегообразования ($1,9 \pm 0,4$ побега на эксплант), а также увеличение периода, необходимого для регенерации микролуковичек. На контрольных безгормональных средах также наблюдали регенерацию адвентивных побегов, что можно объяснить последствием накопленных в тканях экспланта экзогенных регуляторов роста используемых на стадии введения в культуру *in vitro*.

В настоящей работе установлено влияние минерального состава питательной среды на частоту регенерации *F. meleagris* в культуре *in vitro*. Так, культивирование на среде В₅ способствовало более активной регенерации вне зависимости от вносимых регуляторов роста. Использование сред различного минерального состава, но дополненных одинаковыми регуляторами роста (5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК) также позволило выявить различные пути морфогенеза в культуре ткани: культивирование микролуковичек на среде В₅ приводило к побегообразованию, а на среде BDS отмечали разрастание тканей чешуй микролуковичек и активный каллусогенез (72,0-87,0 %). При этом на поверхности каллуса формировались структуры, напоминающие соматические эмбриониды (Мурасева и др., 2015). Из этого можно предположить, что минеральный состав питательной среды оказывает определяющее действие на путь морфогенеза *F. meleagris*.

Первыми и единственными работами, в которых в качестве эксплантов для инициации культуры *in vitro* рябчиков использовали листочки околоцветника, являются исследования М. Мохаммади-Дехчешмех с соавторами (Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2007; 2008). Исследования проводилось на цветочных бутонах *F. imperialis*. Применение среды В₅, дополненной 0,1 мг/л БАП в сочетании с 0,6 мг/л НУК и 0,4 мг/л ИУК, оказалось оптимальным для введения в культуру рябчика императорского. Эффективность данной минеральной основы и регуляторов роста подтверждена также нашими результатами при культивировании *F. meleagris*. Как и в нашей работе, использование высокой

концентрации цитокинина (1,0 мг/л БАП) с ауксинами угнетало побегообразование. При этом авторы отмечали, что периодическое субкультивирование на безгормональных питательных средах стимулировало прямую регенерацию луковичек *F. imperialis* (Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2008). М. Мохаммади-Дехчешмех с соавторами на данной среде была получена как прямая регенерация адвентивных микропобегов, так и непрямой соматический эмбриогенез (Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2007; 2008).

Итак, наиболее оптимальной средой как для введения в культуру ткани, так для размножения *F. meleagris* в культуре листочков околоцветника является питательная среда В₅, дополненная 0,4 мкМ БАП в сочетании с 3,2 мкМ НУК и 2,3 мкМ ИУК. Выявлено влияние минерального состава питательной среды на путь морфогенеза рябчика шахматного в культуре *in vitro*: использование минеральной основы В₅ сопровождалось активным геммогенезом, а на минеральной основе по прописи BDS отмечали каллусогенез и формирование эмбриоподобных структур.

Важное значение минеральных компонентов питательной среды на морфогенез *in vitro* отмечали в своем обзоре К.М. Рамаг и Р.Р. Вильямса (Ramage, Williams, 2002). Очень часто при разработке систем регенерации исследователи активно используют различные регуляторы роста для индукции и стимуляции морфогенеза в тканях экспланта, но при этом не учитывают важную роль минеральных компонентов среды. Однако на активность регенерации в равной степени влияют как экзогенные регуляторы роста, так и минеральный состав среды. Так, азот, фосфор и кальций важны для морфогенеза и роста растений, в то время как ионы калия, магния и серы играют вспомогательные роли (Ramage, Williams, 2002). При этом, как отмечал Д.Е. Прис, сбалансированный минеральный состав питательной среды позволяет снизить эффективные концентрации регуляторов роста (Preece, 1995).

Ввиду морфологической схожести структур на ранних этапах развития при органогенезе и соматическом эмбриогенезе изучения только морфологии

недостаточно. Поэтому для уточнения путей морфогенеза в культуре *in vitro* рябчика шахматного необходимо проведение гистологических исследований.

3.3. Изучение морфогенеза *in vitro* с использованием световой микроскопии

Для детального анализа путей морфогенеза в тканях экспланта применяются гистологические методы исследования (Haensch, 2004; Woo, Wetzstein, 2008). Гистологический анализ позволяет на тканевом уровне выявить особенности формирования соматических эмбриоидов и адвентивных почек. При этом формирование корневого апекса на глобулярной стадии является наиболее характерным признаком соматических эмбриоидов, который позволяет отличить их от почек.

Геммогенез в культуре луковичных чешуй F. dagana, F. sonnikovae и F. meleagris

Различия между изучаемыми видами проявились по срокам регенерации. Так, на питательных средах дополненных 5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК первые видимые изменения на поверхности экспланта (выпячивания) у *F. meleagris* отмечались на 25-31 дни культивирования, у *F. dagana* на 21-25 дни, а у *F. sonnikovae* на 12-15 день, что на 1,5-2 недели раньше, чем у других видов. Локализацию процессов регенерации в тканях эксплантов отмечали в местах поранений, а также на неповрежденной части луковичных чешуй (рис. 17, 18).

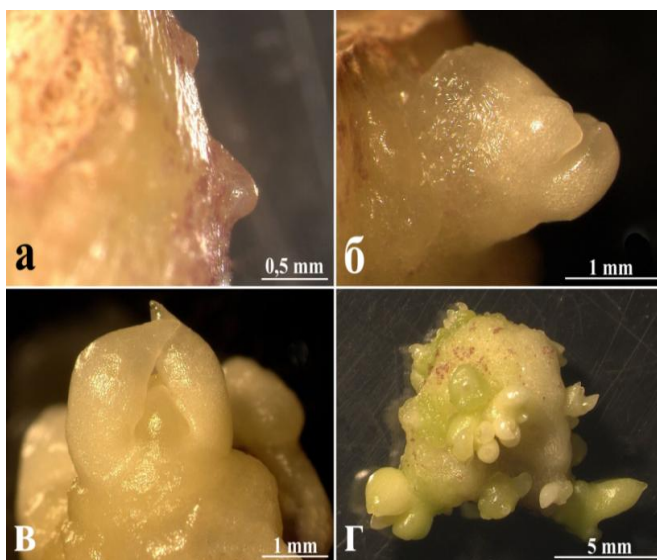


Рис. 17. Регенерация микролуковичек *F. sonnikovae* из тканей экспланта (сегменты луковичных чешуй) на среде BDS, дополненной 5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК: а – формирование почек, 15 день культивирования; б – микропочка, 19 день; в – микролуковички с развивающимися чешуями, 24 день; г – микропобеги, находящиеся на разной стадии развития, 31 день

Через 2,5-5 недель после инокуляции на питательные среды все формирующиеся на эксплантах микропочки исследуемых видов были этиолированы и состояли из 2-3 листовых зачатков. По мере развития листовые примордии оформлялись в чешуйки и приобретали более округлую форму, образуя микролуковицу, при этом в ходе морфогенеза образовывалось 2-5 луковичных чешуй (в конце пассажа). Для дальнейшего роста микрорастений было характерно окрашивание чешуй в зеленый цвет.

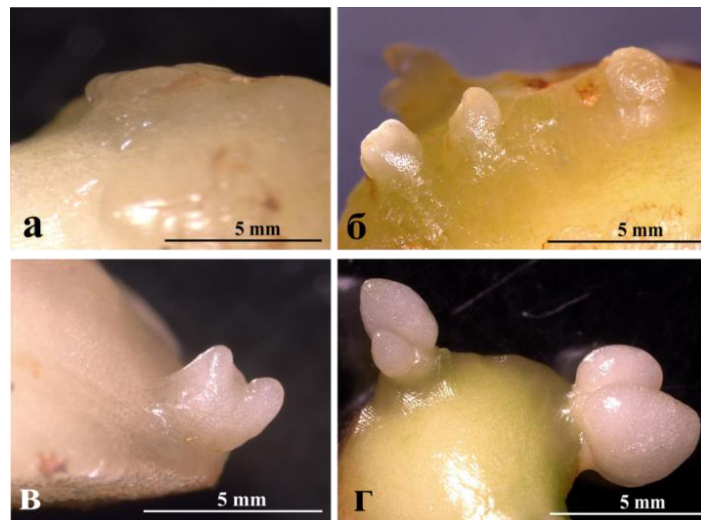


Рис. 18. Прямой геммогенез *F. meleagris* на поверхности луковичной чешуи, питательная среда В₅, дополненная 5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК: а – выпячивания на поверхности экспланта, 25 день культивирования, б – формирующиеся микропочки на 31 день, в – микропочка с развивающимися листовыми примордиями, 35 день, г – микролуковички с развитыми луковичными чешуями, 48 день

Основываясь на сходстве процессов органогенеза *in vitro* у *F. dagana*, *F. sonnikovae* и *F. meleagris*, детальное гистологическое изучение морфогенеза побегов проводили на микрорастениях *F. sonnikovae*, используя данный вид как модельный объект.

Гистологическое изучение динамики регенерации микролуковичек позволило установить, что первые клеточные деления, дающие начало меристематическому центру, происходили в эпидерме луковичной чешуи на 9-12 дни культивирования (рис. 19, а). В этот период отдельные эпидермальные клетки экспланта в результате дедифференцировки приобретали меристематическую

активность, объясняемую тотипотентностью растительных клеток. При этом клетки меристематического очага (меристемоида) отличались от соседних плотной цитоплазмой, а также относительно крупным ядром. На этом этапе развития наблюдали многочисленные делящиеся клетки, находящиеся на стадиях метафазы и анафазы митоза. К 12-15 дням культивирования за счет активных митотических делений (периклиналильных и антиклиналильных) значительно увеличивалось число клеточных слоев меристематического центра, что способствовало появлению протуберанцев на поверхности экспланта *F. sonnikovae* (рис. 19, б, в). Дальнейшая пролиферация клеток приводила к формированию микропочек (рис. 19, г, д). Рост и развитие меристемы сопровождалось образованием 1-2-слойной туники и многочисленных слоев клеток корпуса, составляющих апекс побега (рис. 19, ж). К 15-19 дням усиление периклиналильных делений на периферии способствовало развитию листовых примордиев почки, окружающих конус нарастания (рис. 19, е, ж). При этом листовые примордии располагались накрест-супротивно, каждый новый листовой зачаток был прикрыт предыдущим. На стадии развития 2-3 листовых зачатков, в паренхиме почки появлялись вытянутые в длину клетки прокамбия, которые позднее давали начало проводящим пучкам. Так, в чешуях микрорастений к 30 дню культивирования были видны хорошо сформированные сосуды первичной проводящей системы (рис. 19, з). Еще через 10 дней чешуи микролуковичек приобретали зеленую окраску и более округлую форму (Кульханова и др., 2015).

Изучение дальнейшей динамики развития микропобегов показало, что в ходе морфогенеза не происходит заложения апекса корня, а формирующаяся *de novo* структура имеет сосудистую связь с тканью первичного экспланта. Формирование подобной монополярной структуры без стадии каллусообразования свидетельствует о том, что развитие *F. sonnikovae* в культуре *in vitro* идет по пути прямого геммогенеза.

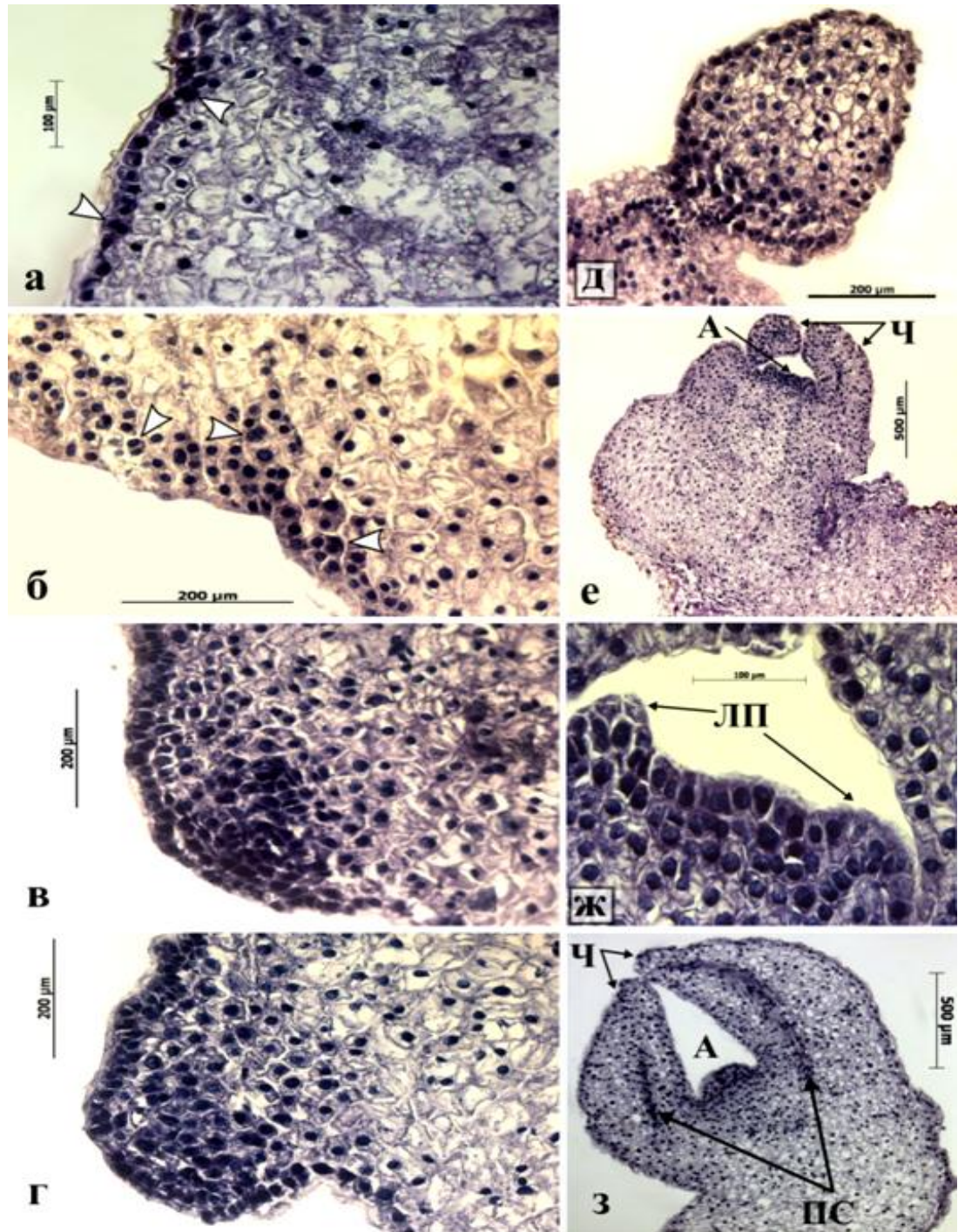


Рис. 19. Динамика развития микропобега *F. sonnikovae* в культуре *in vitro*, среда BDS, дополненная 5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК: а – пролиферация клеток в эпидерме луковичной чешуи (первая неделя культивирования); б – формирование субэпидермальных слоев меристематического центра, 12 день культивирования; в – появление протуберанца на поверхности экспланта; г – формирующаяся почка, 15 день; д – почка на 17 день культивирования; е – продольный срез микропобега с развивающимися чешуями (Ч) и апикальной меристемой (А); ж – апикальная меристема побега, видны листовые примордии (ЛП), 20 день; з – микролуковичка с развитыми чешуями (Ч) и сосудами первичной проводящей системы (ПС), 26 день; стрелки – клеточные деления

Адвентивные микропобеги подобной морфологии наблюдали и на поверхности морфогенного каллуса в культуре *F. sonnikovae* и *F. dagana* на средах, дополненных цитокининами в низкой концентрации (0,1 и 0,5 мкМ). Схожесть морфологии микропобегов, формирующихся непосредственно на поверхности экспланта и каллуса, позволяет предположить, что в данных условиях протекает непрямой геммогенез.

Таким образом, наиболее характерным морфогенным ответом в культуре *in vitro* для *F. dagana*, *F. sonnikovae* и *F. meleagris* является прямой геммогенез – образование адвентивных почек. При этом у исследуемых видов прямая регенерация адвентивных луковичек *in vitro* протекала сходным путем.

Гемморизогенез в культуре луковичных чешуй F. meleagris

На стадии собственно размножения *F. meleagris* наблюдали два типа морфогенных ответов: прямой геммогенез (см. *Геммогенез в культуре луковичных чешуй F. dagana, F. sonnikovae и F. meleagris*) и активный каллусогенез с образованием структур, морфологически напоминающих соматические эмбриониды. При этом тип ответа зависел от минеральной основы питательной среды и не зависел от регуляторов роста. Так, культивирование микролуковичек на питательной среде BDS приводило к формированию морфогенного светло-зеленого каллуса. По мере роста каллусной массы на ее поверхности наблюдали образование эмбриоподобных структур (рис. 20, а, б). Для детального анализа пути морфогенеза *F. meleagris* в культуре *in vitro* было проведено морфогистологическое исследование каллуса и структур, формирующихся на его поверхности, на стадии собственно размножения на питательной среде BDS, дополненной 5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК.

По своей морфологии структуры, образующиеся на поверхности каллуса рябчика шахматного, отличались от адвентивных микролуковичек, формирующихся в результате геммогенеза из тканей чешуй других исследуемых видов. В противоположность адвентивным луковичкам они имели удлиненную форму, долгое время были составлены только из двух листовых зачатков и не формировали луковичных чешуй (рис. 20, в, г). Так как, стереоскопические

наблюдения не позволили достоверно определить тип морфогенного ответа, в дальнейшем было проведено гистологическое исследование.

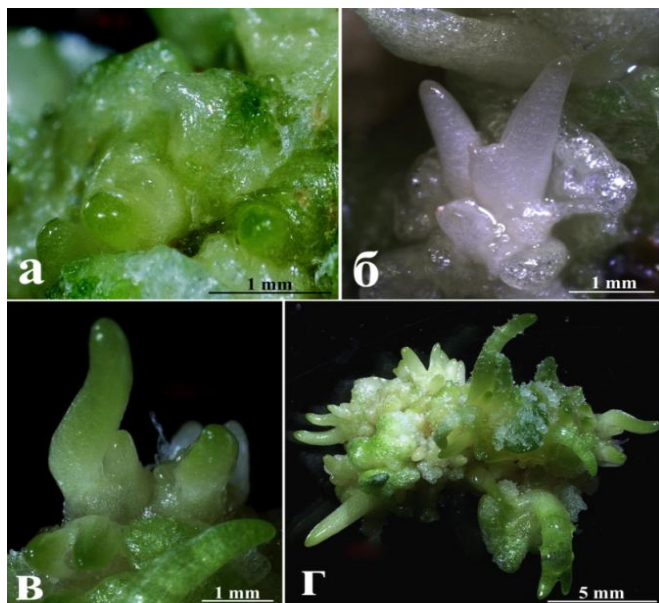


Рис. 20. Развитие эмбриоподобных структур *F. meleagris* на питательной среде BDS, дополненной 5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК: а – выпячивания на поверхности морфогенного каллуса, б – развивающиеся эмбриоподобные структуры, 25 день, в – микропобег на 32 день культивирования, г – конгломерат микропобегов на поверхности каллуса

Гистологический анализ строения морфогенного каллуса показал, что закладка меристем, дающих начало эмбриоподобным структурам, происходит не на поверхности каллуса, а в более глубоких клеточных слоях (эндогенно). На основании проведенного исследования было выявлено наличие апексов побега и корня, однако формирование меристемы корня наблюдалось лишь у структур с развитыми листовыми примордиями (рис. 21, а, б). В паренхиме отмечали закладку прокамбиальных клеток. Дальнейшая пролиферация этих клеток приводила к появлению тяжей первичной проводящей системы, соединяющих листовые зачатки и апекс корня, формирование которых наблюдалось к 35-42 дням культивирования (рис. 21, в). Апикальная меристема была организована по типу туника-корпус, также была отчетливо видна протодерма (рис. 21, г). Наличие на поздних этапах морфогенеза хорошо развитых корневых апексов у микропобегов указывает на образование адвентивных корней (рис. 21, в, д). При этом одновременную закладку двух корешков можно объяснить развитием придаточных корней, характерных для всех луковичных геофитов (Мурасева и др., 2015).

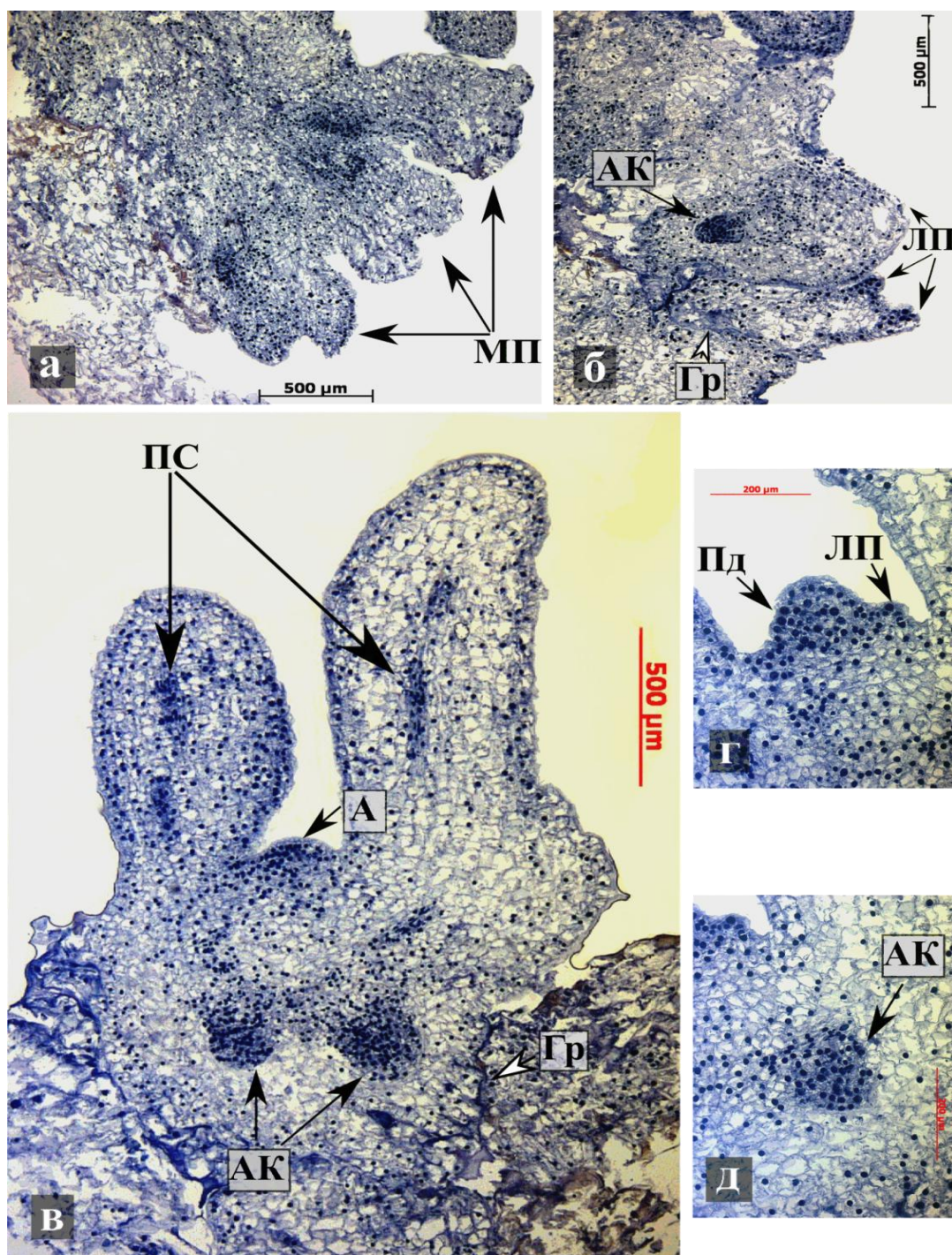


Рис. 21. Гистологический анализ процессов непрямого гемморизогенеза *F. meleagris* в культуре *in vitro* на среде BDS, дополненной 5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК: а – развитие микропочек в каллусной ткани, 30 день культивирования, б – почки с хорошо развитым корневым апексом и листовыми примордиями, в – сформированный микропобег с развитыми апексами побега и корня, отчетливо видна граница между тканями каллуса и побега, а также первичная проводящая система, 40 день, г – апекс побега, видна организация по типу туника-корпус и заложение очередного листового примордия, 43 день, д – апекс корня; А – апекс побега, АК – апекс корня, Гр – граница между тканями каллуса и побега, ЛП – листовых примордий, МП – микропочка, Пд – протодерма, ПС – сосуды первичной проводящей системы

Несмотря на наличие корневых и стеблевых апексов, нам не удалось выявить процессы соматического эмбриогенеза в каллусной ткани *F. meleagris* ввиду отсутствия биполярности на самых ранних этапах морфогенеза *in vitro*. Следовательно, регенерация *F. meleagris* на поверхности каллуса проходит по пути непрямого гемморизогенеза с последовательной закладкой меристем побега и адвентивных корней. Необходимо отметить, что развитие структур *de novo* происходило асинхронно: одновременно наблюдали как закладывающиеся почки, так и развитые побеги.

Значимость гистологических исследований для определения путей морфогенеза отмечают во многих публикациях (Yancheva et al., 2003; Delporte et al., 2014). В настоящей работе процессы регенерации изучаемых видов в культуре *in vitro* впервые исследованы с использованием морфо-гистологического подхода. Использование этого метода помогло установить два пути морфогенеза, протекающих в культуре *in vitro* у исследуемых таксонов – геммогенез и гемморизогенез. Согласно литературным данным наиболее распространенным типом морфогенного ответа среди представителей рода *Fritillaria* является органогенез или образование адвентивных микролуковичек (геммогенез) (Lukaszewska et al., 1998; Gao et al., 1999; Rahimi et al., 2014). При этом нам не встречались работы, описывающие гемморизогенез рябчиков в культуре *in vitro*.

Прямой геммогенез *in vitro* характерен для рябчика дагана, рябчика Сонниковой и рябчика шахматного. Согласно концепции М.Л. Христиансона и Д.А. Ворника удалось выделить последовательные стадии компетенции и дедифференциации, детерминации и собственно морфогенез (Christianson, Warnick, 1983, 1984) в ходе органогенеза побегов рябчика Сонниковой. Первые деления, приводящие к закладке меристемы *de novo* и образованию в дальнейшем адвентивных микропобегов, отмечали в эпидерме луковичных чешуй. В результате приобретения клетками компетенции и последующей дедифференциации с 9 по 12 дни с начала культивирования наблюдали формирование меристематических центров. Детерминация клеток меристематического очага приводила к закладке апекса побега и листовых

примордиев почки к 15-17 дню. Дальнейшее их развитие и формирование микролуковички на поверхности экспланта, то есть стадия морфогенеза, протекала с 17 по 30 дни. У других исследуемых видов процессы геммогенеза протекали на 1,5-2 недели позже, что объясняется их генотипическими особенностями. Помимо прямого органогенеза мы наблюдали и непрямой органогенез побегов в культуре морфогенного каллуса *F. dagana* и *F. sonnikovae*.

Прямая регенерация адвентивных побегов из тканей луковичных чешуй характерна для многих рябчиков, в том числе *F. camtschaticensis* (Otani, Shimada, 1997), *F. unibracteata* (Gao et al., 1999), *F. roylei* (Joshi et al., 2007). Как отмечали в своей работе К.Я. Пэк и Х.Н. Мурти, появление первых почек на поверхности луковичной чешуи *F. thunbergii* происходило через 4 недели культивирования, еще через 14 дней у микропобегов формировались листья и корни (Paek, Murthy, 2002). При сравнении этих данных с результатами настоящего исследования можно заключить, что в тканях исследуемых нами видов процессы прямого геммогенеза протекают быстрее на 10-14 дней. Регенерацию микролуковичек на поверхности чешуи отмечали также в работах с другими геофитами: *Lilium bosniacum* (G. Beck) G. Beck ex Fritsch (Parić et al., 2011), *Muscari mirum* (Nasircilar et al., 2011), *Tulipa gesneriana* (Podwyszyńska et al., 2014). В целом, прямая регенерация наблюдается довольно часто при культивировании луковичных растений из разных типов эксплантов (Chow et al., 1993; Marinangeli et al., 2003; Yin et al., 2013).

Как отмечалось ранее, методы световой микроскопии позволяют выявить различия в строении соматических эмбриоидов и адвентивных почек. Так, при работе с модельным объектом *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Б.М. Бассунер с соавторами удалось выявить процессы органогенеза и соматического эмбриогенеза на основании отсутствия или наличия меристемы корня. Соматический эмбриогенез является другим широко распространенным типом морфогенного ответа геофитов в культуре *in vitro*. При этом, как отмечают исследователи, в работах, проведенных без гистологического анализа

формирующихся структур, утверждения о протекании процессов соматического эмбриогенеза могут вызывать сомнения (Bassuner et al., 2007).

Структуры, формирующиеся на поверхности светло-зеленого каллуса *F. meleagris*, морфологически напоминали соматические эмбриониды. Однако в результате проведенного гистологического исследования установлено отсутствие сопряженного формирования апексов побега и корня на начальных этапах морфогенеза (глобулярная стадия). Более позднее развитие нескольких корневых апексов, разобщенное по времени с развитием апекса побега, у микроклонов рябчика шахматного указывает на процессы непрямого гемморизогенеза в каллусной культуре исследуемого вида. При этом эндогенное формирование адвентивных корней отмечали в базальной части развивающегося побега.

Как и в случае с соматическим эмбриогенезом, гемморизогенез приводит к образованию целого организма из тканей экспланта, но за более длительный срок (Батыгина, 1997 а). Тем не менее, активный каллусогенез, как в нашем исследовании, резко повышает риск возникновения соматической изменчивости, что является нежелательным в работе с редкими видами.

ГЛАВА 4. УКОРЕНЕНИЕ И АДАПТАЦИЯ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ К УСЛОВИЯМ *EX VITRO*

Укоренение многих луковичных геофитов проводят как на средах дополненных ауксинами (Nhut, 2003; Yin et al., 2013), так и на безгормональных питательных средах (Slabbert et al., 1995; Nasircilar et al., 2011). Из ауксинов для стимуляции ризогенеза у однодольных геофитов часто используют ИМК и НУК (Vacchetta et al., 2003; Liu, Yang, 2012).

Завершающим этапом размножения *in vitro* является адаптация растений-регенерантов к нестерильным условиям. Основные трудности адаптации обусловлены развитием у пробирочных растений морфо-анатомических особенностей, связанных с гетеротрофным питанием и высокой влажностью при выращивании в культуральных сосудах: слабое развитие мезофилла, низкая фотосинтетическая активность, несовершенство процессов транспирации и проводящих элементов (Hazarika, 2006). Подобные особенности строения растений, выращиваемых *in vitro*, требуют постепенного снижения влажности и повышения освещенности при переносе их в условия *ex vitro*.

При работе с луковичными растениями одним из ключевых факторов, обеспечивающим успешную адаптацию, является также формирование и рост луковицы, так как это способствует активному укоренению и акклиматизации растений к полевым условиям (Podwyszyńska, 2012). Этапы формирования луковицы (ее дифференциация) и преодоления периода покоя обусловлены морфо-физиологическими особенностями геофитов (Marinangeli, Curvetto, 1997; De Klerk, 2012). После окончательного развития луковицы, как *in vivo*, так и *in vitro*, геофитам, в том числе и растениям рода *Fritillaria*, необходимо преодолеть покой (Paek, 1996; Langens-Gerrits et al., 2003 б). В природных условиях низкие температуры в зимние месяцы способствуют преодолению покоя и прорастанию луковиц геофитов весной следующего года (Sun, Wang, 1991; Langens-Gerrits et al., 2003 а; Benkeblia, Shiomi, 2004). В течение холодного периода происходит мобилизация крахмала и накопление в луковицах углеводов. Сахароза и фруктоза

в дальнейшем используются в качестве источников энергии при прорастании и развитии фотосинтетического аппарата (Miller, Langhans, 1990; Zhang et al., 2011). Рядом авторов получены результаты, указывающие на стимулирующий эффект низких температур на ризогенез и преодоление покоя луковиц, развивающихся *in vitro* (Jevremović et al., 2010; Эрст и др., 2014).

Разработку систем укоренения и адаптации проводили на трех изучаемых видах: *F. dagana*, *F. meleagris*, *F. sonnikovae*.

Дифференциация луковицы и укоренение in vitro

Для преодоления покоя, стимуляции роста микролуковичек, а также развития корней мы применили метод холодной стратификации, выдерживая микролуковицы при низкой положительной температуре (+7 °C) на фотопериоде в течение 6-7 недель. Микролуковицы высаживали на питательные среды $\frac{1}{2}$ BDS, $\frac{1}{2}$ B₅ и $\frac{1}{2}$ MS без регуляторов роста либо дополненные ауксинами (НУК, ИМК, ИУК). Также оценивали влияние сахарозы на рост и развитие луковиц *in vitro*.

Следует отметить, что растения исследуемых видов легко укоренялись как на гормональных, так и на безгормональных средах. Средняя частота укоренения на всех испытанных средах составила 81,3 % (рис. 22). У микрорастений *F. dagana* 100 % укоренение было получено лишь при наличии в среде ауксинов – НУК, ИУК, ИМК в концентрации 5,0 мкМ на минеральных основах $\frac{1}{2}$ BDS и $\frac{1}{2}$ MS. Установлено, что 100 % укоренение микролуковичек *F. sonnikovae* удалось получить на питательных средах $\frac{1}{2}$ BDS без регуляторов роста и $\frac{1}{2}$ MS, содержащей 5,0 мкМ ИУК. Для индукции ризогенеза *F. meleagris* наиболее эффективным было использование среды $\frac{1}{2}$ B₅, дополненной 5,0 мкМ НУК (табл. 10, рис. 23, а, б, в).

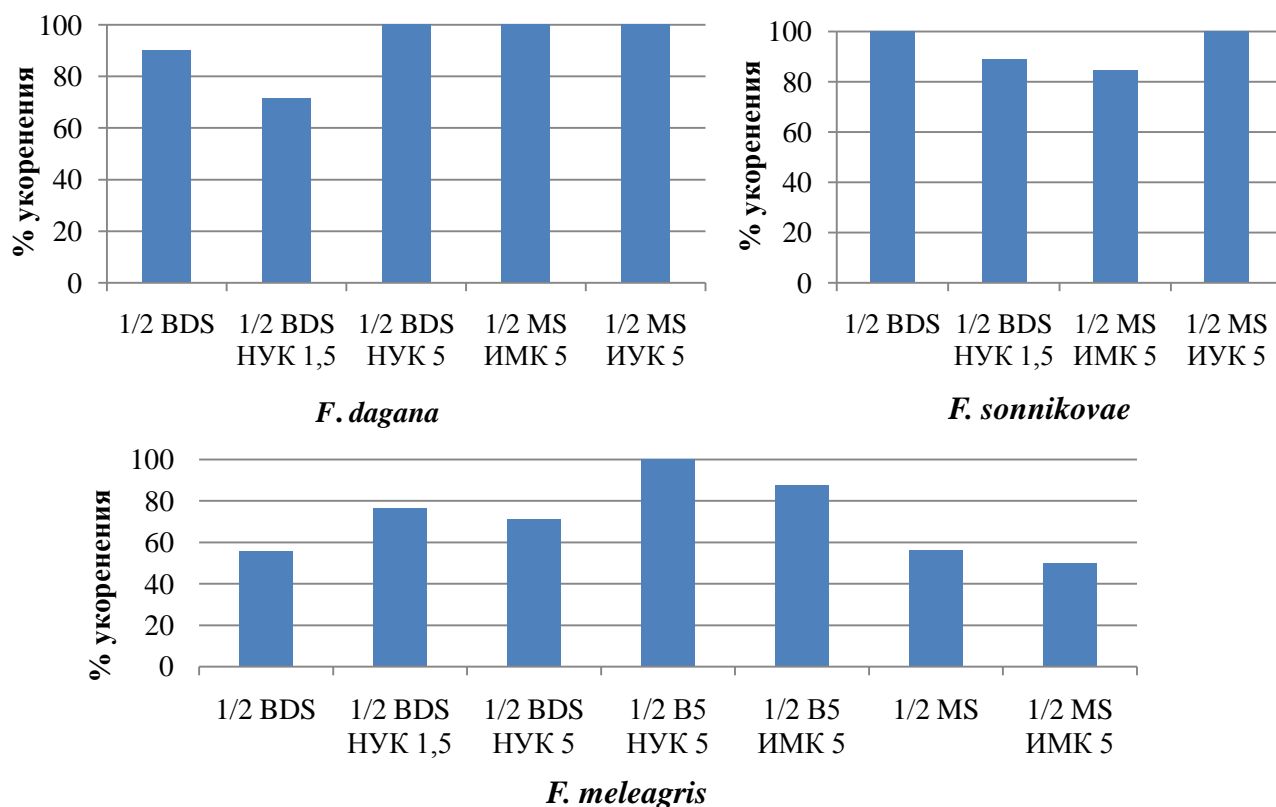


Рис. 22. Частота ризогенеза микролуковичек исследуемых видов рода *Fritillaria*, укореняемых при +7 °С

Тип используемых ауксинов не оказывал влияния на активность ризогенеза. Можно лишь указать, что присутствие в питательной среде 5,0 мкМ НУК, ИУК либо ИМК стимулировало образование корней в сравнении с безгормональными средами и средами с низким содержанием НУК (1,5 мкМ).

Таблица 10

Показатели роста и развития растений-регенерантов рода *Fritillaria* на средах, индуцирующих 100% укоренение, культивируемых при +7 °С

Вид	Среда	Количество корней, шт.	Длина корней, мм	Количество чешуй, шт.	Размер луковицы, мм
<i>F. dagana</i>	½ BDS НУК 5,0 мкМ	4,2±0,9	19,4±1,7	4,3±0,6	6,9±0,6
	½ MS ИМК 5,0 мкМ	6,2±1,3	17,0±2,5	4,0±0,4	6,5±0,9
	½ MS ИУК 5,0 мкМ	3,5±0,8	15,1±2,6	4,5±0,5	5,6±0,8
<i>F. sonnikovae</i>	½ BDS	4,4±0,2	11,0±0,7	4,3±0,2	7,9±0,4
	½ MS ИУК 5,0 мкМ	8,0±1,9	17,4±2,8	5,3±1,0	7,9±1,2
<i>F. meleagris</i>	½ B ₅ НУК 5,0 мкМ	4,2±1,4	27,5±7,2	2,8±0,2	6,0±0,8

В таблице 11 приведены показатели роста и развития исследуемых видов при двух температурных режимах укоренения. Из полученных данных видно, что длина корней в 1,5-2,5 раза больше при температуре $+23\pm 2$ °С. При этом остальные показатели роста не зависели от температурного режима.

Таблица 11

Показатели роста и развития растений-регенерантов рода *Fritillaria*,
укореняемых при $+7$ и $+23\pm 2$ °С, среда $\frac{1}{2}$ BDS

Вид	Количество корней, шт.		Длина корней, мм		Количество чешуй, шт.		Размер луковицы, мм	
	$+7^\circ\text{C}$	$+23\pm 2^\circ\text{C}$	$+7^\circ\text{C}$	$+23\pm 2^\circ\text{C}$	$+7^\circ\text{C}$	$+23\pm 2^\circ\text{C}$	$+7^\circ\text{C}$	$+23\pm 2^\circ\text{C}$
<i>F. dagana</i>	3,6 \pm 0,7	4,4 \pm 1,0	10,6 \pm 1,5	21,2 \pm 4,1	4,7 \pm 0,4	4,8 \pm 0,6	7,2 \pm 0,6	7,2 \pm 1,5
<i>F. sonnikovae</i>	4,4 \pm 0,2	4,0 \pm 0,7	11,0 \pm 0,7	16,1 \pm 1,7	4,3 \pm 0,2	4,2 \pm 0,6	7,9 \pm 0,4	6,7 \pm 0,9
<i>F. meleagris</i>	2,5 \pm 0,7	3,1 \pm 1,3	8,4 \pm 4,5	20,8 \pm 6,5	4,1 \pm 0,5	3,0 \pm 0,5	6,6 \pm 0,8	5,1 \pm 1,3

При укоренении микролуковичек рябчика шахматного периодически наблюдали развитие корней, имеющих необычную морфологию: формировались толстые, ломкие, спирально закрученные корни, достигающие в длину 1,5-2,0 см (рис. 23, г). Учитывая, что для видов подрода *Fritillaria* в естественных условиях характерно наличие контрактивных корней, втягивающих луковицу на глубину и защищающих ее от высыхания, можно предположить, что корни, развивающиеся при культивировании *in vitro*, являются контрактивными. Интересно, что корни подобной морфологии не развивались у микролуковичек других видов, относящихся к данному подроду.

Еще одним явлением, вызвавшим интерес при культивировании микрорастений, было формирование столонов у микролуковиц рябчика дагана (рис. 23, д). Развитие столонов отмечали на этапе укоренения лишь у 3 микролуковиц, культивируемых на среде $\frac{1}{2}$ B₅ с повышенным содержанием сахарозы, однако все они имели одинаковую морфологию. На верхушке сформированного столона располагалась почка возобновления – дочерняя луковичка, которая выносилась за пределы материнской и в дальнейшем могла заменить ее. Так же в основании дочерней луковички начинали формироваться

придаточные корешки. Таким образом, в культуре *in vitro* у микрорастений рябчика дагана развиваются характерные для подрода *Liliorhiza* черты строения подземных органов. Формирование stolона является дополнительным свидетельством ускорения онтогенеза, так как при посеве из семян первый stolон развивается лишь на 3-4 год жизни сеянца (Баранова, 1999). Из приведенных выше наблюдений можно заключить, что на стадии укоренения проявляются различия на уровне подрода.



Рис.23. Растения-регенеранты, укореняемые при +7 °С в конце пассажа: а – *F. sonnikovae* на среде $\frac{1}{2}$ MS, дополненной 5,0 мкМ ИУК, б – *F. dagana* на среде $\frac{1}{2}$ BDS, дополненной 5,0 мкМ НУК, в – *F. meleagris* на среде $\frac{1}{2}$ B₅, дополненной 5,0 мкМ ИМК, г – контрактивные корни *F. meleagris*, среда $\frac{1}{2}$ B₅, дополненная 5,0 мкМ НУК, д – stolон *F. dagana*

Размер луковичек полученных *in vitro* определяет успешную адаптацию растений-регенерантов к нестерильным условиям в дальнейшем (Marinangeli, Curvetto, 1997). Ряд исследователей отмечал положительный эффект высоких концентраций сахарозы в питательной среде на рост луковичек *in vitro* (Takayama, Misawa, 1979; De Klerk et al., 1992). Для оценки влияния концентрации сахарозы на рост и развитие микролуковичек на стадии укоренения мы использовали безгормональные питательные среды $\frac{1}{2}$ BDS, содержащие 30,0 (контроль), 40,0; 50,0 и 70,0 г/л сахарозы. Установлено, что повышение концентрации сахарозы (до

70,0 г/л) приводит к усилению роста луковичек у растений *F. sonnikovae*, при этом незначительная активация роста характерна и для микрорастений *F. dagana* (рис. 24). Однако при анализе влияния концентрации сахарозы на рост луковиц *F. meleagris* отмечено, что на контрольной среде (30,0 г/л) рост протекает активнее.

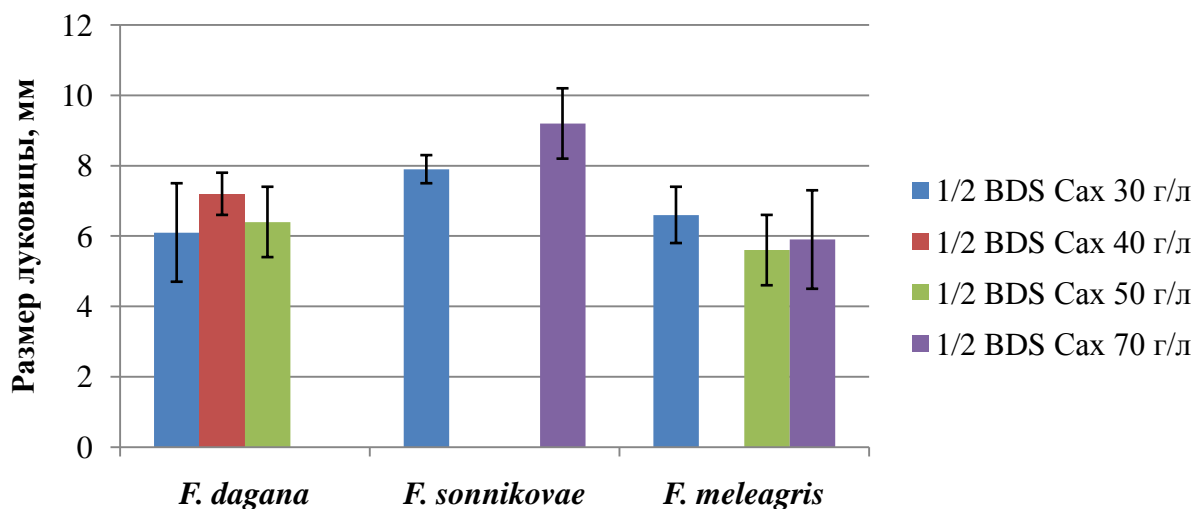


Рис. 24. Влияние концентрации сахарозы на размер луковичек исследуемых видов

Установлено, что этап холодной стратификации на стадии укоренения стимулирует ризогенез и рост луковичек, а также способствует быстрому прорастанию и развитию растений-регенерантов при последующем переносе их в условия *ex vitro* (Мурасева и др., 2015). Положительный эффект холодной стратификации (+4 и +15 °С) на преодоление покоя ранее отмечали в своей работе М. Петрик с соавторами у растений-регенерантов *F. meleagris* (Petrić et al., 2013).

Адаптация к условиям ex vitro

Для адаптации к нестерильным условиям отбирали луковички размером не менее 5,0-5,5 мм с развитой корневой системой. При этом в качестве субстратов использовали сфагновый мох, смеси торфа и песка (3:1), измельченного кокосового волокна и песка (3:1).

Адаптация регенерантов исследуемых видов в комнатных условиях на стеллажах при температуре +23±2 °С и фотопериоде не сопровождалась развитием новых листьев и приводила к замедлению роста луковицы. Подобный

результат наблюдали независимо от используемого субстрата и наличия холодной стратификации на этапе укоренения. То есть при адаптации луковичек в условиях с температурным режимом $+23\pm 2$ °С отмечали развитие покоя.

Использование сфагнового мха подходит только в качестве предварительного этапа адаптации, что связано с необходимостью повторной пересадки луковиц в почвенный субстрат для дальнейшего роста в условиях теплицы либо открытого грунта. В данном субстрате наблюдали увеличение длины корней и появление корневых волосков, однако не отмечали отрастания листьев в течение 4-5 месяцев (рис. 25). Также наблюдали загнивание луковиц, адаптируемых в комнатных условиях при температуре $+23\pm 2$ °С.



Рис. 25. Луковицы *F. sonnikovae* (а), *F. dagana* (б), *F. meleagris* (в) после адаптации в сфагновом мхе

Использование смесей торфа и песка, а также измельченного кокосового волокна и песка было более эффективно. При этом преодолеть покой, развившийся при переносе растений-регенерантов на адаптацию в комнатные условия, удалось чередованием высоких и низких температур. Так, выдерживание луковиц, высаженных в субстрат, при $+5\pm 2$ °С в темноте в течение 4-6 недель и дальнейший их перенос в условия с температурным режимом $+23\pm 2$ °С приводило к преодолению покоя и появлению ассимилирующих листьев, при этом листья развивались лишь у луковиц с развитой корневой системой. Стоит отметить, что при выращивании в комнатных условиях даже после холодной стратификации происходило быстрое отмирание листа и повторный период покоя луковицы. Это можно объяснить относительно высокой температурой и сухостью воздуха.

Преодолеть вторичный покой удавалось переносом высаженных на адаптацию растений в теплицу.

Адаптацию растений-регенерантов в теплице (в холодном отсеке) осуществляли с установлением отрицательных температур воздуха (октябрь-декабрь). Отрастание первого листа в обоих вариантах субстрата отмечали в феврале-марте, средняя температура воздуха в этот период в холодном отсеке теплицы составляла $+8,5 \pm 1,4$ °С. Активация ростовых процессов растений-регенерантов при низких положительных температурах (в теплице) отражает нормальный сезонный ритм развития весеннецветущих геоэфемероидов, для которых характерно отрастание при переходе температуры через $+5$ °С (Седельникова, 2004). При этом для всех исследуемых видов характерно синхронное прорастание луковиц. Степень адаптации растений оценивали по количеству луковиц с листьями, образованными *ex vitro* (табл. 12). Согласно полученным данным наиболее оптимальным субстратом для адаптации растений-регенерантов исследуемых видов является смесь кокосового волокна и песка (3:1), позволяющая получить до 82,7 % акклиматизированных растений с хорошо развитыми листьями и корневой системой.

Таблица 12

Эффективность адаптации растений-регенерантов исследуемых видов
к условиям *ex vitro* (в теплице)

Вид	Адаптация, %	
	Торф и песок (3:1)	Косовое волокно и песок (3:1)
<i>F. dagana</i>	41,6	71,9
<i>F. sonnikovae</i>	41,0	73,4
<i>F. meleagris</i>	-	82,7

Примечание: «-» – нет данных

Тип субстрата оказывал влияние и на степень развития листового аппарата растений. Так, при использовании смеси торфа и песка (3:1) появление первых листьев у исследуемых видов отмечали через 4 месяца выращивания, для каждой луковицы было характерно наличие 1 листочка. При этом процент успешно

адаптированных луковиц, имеющих ассимилирующие листья, не превышал 41,6 %. Период вегетации составил 3 месяца, от отрастания первого листочка и до отмирания последнего. По истечению указанного периода луковицы приобретали типичную для вида форму, так у растений рябчика Сонниковой луковица становилась веретеновидной и состояла из 1 крупной чешуи и 1-2 мелких (рис. 26).

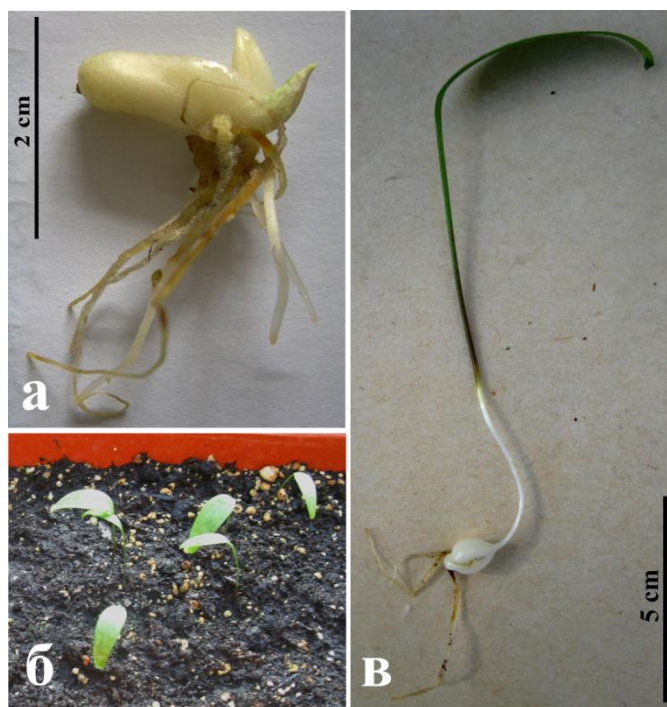


Рис. 26. Адаптация растений-регенерантов *F. sonnikovae* в смеси торфа и песка (3:1): а – растения перед адаптацией, б – развитие первого листа в холодном отсеке теплицы, в – луковица *F. sonnikovae* после 6 месяцев с начала адаптации *ex vitro*

При использовании смеси измельченного кокосового волокна и песка (3:1) эффективность адаптации всех исследуемых видов варьировала от 71,9 до 82,7 %. Отрастание первого ассимилирующего листа в зависимости от вида отмечали через 5-9 недель после переноса укорененных *in vitro* луковичек в нестерильные условия (холодный отсек теплицы). Выращивание регенерантов в условиях с температурным режимом $+8,5 \pm 1,4$ °C способствовало развитию 1-3 ассимилирующих листьев ланцетной либо линейной формы в зависимости от вида (рис. 27). Дальнейшее выращивание растений проводили на опытном

участке лаборатории биотехнологии. При этом прекращение периода вегетации отмечали через 3,5-4 месяца после появления первого листа.

На данном этапе было установлено влияние холодной стратификации (+7 °С) на стадии укоренения микролуковичек *in vitro*. Наличие периода низких температур стимулировало развитие луковиц *ex vitro*: отрастание первого листа у *F. meleagris* наблюдали на 48-56 день от начала адаптации в смеси кокосового волокна и песка. В случае отсутствия низкотемпературной обработки отрастание происходило в два раза медленнее – через 89-94 дня. Следовательно, низкие положительные температуры способствуют преодолению покоя луковиц и их прорастанию при переносе в условия *ex vitro*. Период покоя необходим для нормального развития геофитов, при его отсутствии в течение годичного цикла рост луковицы замедляется, также не происходит развития генеративных органов (De Hertogh, Le Nard, 1993; Kamenetsky et al., 2003). Подбор оптимальной продолжительности низкотемпературного периода способствует ускоренному развитию листьев и корней, причем сроки этого периода видоспецифичны (Langens-Gerrits et al., 2001, 2003 a).



Рис. 27. Адаптация растений-регенерантов *F. meleagris* в смеси кокосового волокна и песка (3:1): а – укорененные микролуковички перед адаптацией, б – прорастающие луковицы, холодный отсек теплицы, в – луковица *F. meleagris* после 5 месяцев с начала адаптации *ex vitro*

Таким образом, режим культивирования при низкой положительной температуре (+7 °С) на этапе укоренения и формирования луковиц является наиболее эффективным, так как позволяет получить растения-регенеранты с развитой корневой системой (3,5-8,0 корней у луковички) и крупной луковицей (размер луковицы 5,4-8,5 мм). При этом использование питательных сред, дополненных ауксинами (5,0 мкМ НУК или ИМК), способствует формированию более развитой корневой системы у *F. dagana*, *F. sonnikovae* и *F. meleagris*. Изменение концентрации сахарозы в питательной среде не оказывает значительного влияния на рост и развитие микрорастений на этапе укоренения.

В ходе исследования установлено, что культивирование при низких температурах способствует не только более интенсивному ризогенезу, но и быстрому прорастанию и развитию растений-регенерантов при переносе их в условия *ex vitro*. При этом наиболее оптимальным субстратом для адаптации растений-регенерантов *F. dagana*, *F. sonnikovae* и *F. meleagris* является смесь измельченного кокосового волокна и песка (3:1), позволяющая получить высокий процент (до 82,7 %) акклиматизированных растений.

ГЛАВА 5. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ И СОЗДАНИЯ КОЛЛЕКЦИИ *IN VITRO* ВИДОВ РОДА *FRITILLARIA*

Одной из задач представленного исследования являлось использование разработанных нами систем микроразмножения редких и эндемичных видов рода *Fritillaria*, произрастающих на территории Алтае-Саянской горной области, для введения в культуру *in vitro* и воспроизводства четырех видов из изучаемого таксона, а именно *F. camschatcensis*, *F. crassifolia* subsp. *crassifolia*, *F. michailovskyi*, *F. ruthenica*.

Клональное микроразмножение некоторых представителей рода Fritillaria

Для получения асептической культуры использовали сегменты луковичных чешуй, при этом применяли метод эффективной поверхностной стерилизации, разработанный нами ранее для сибирских видов – 70 % этанол (30 сек) + 0,1 % HgCl₂ с добавлением Tween 80 (30 мин). Стерильность первичных эксплантов достигала 81-88 %.

Стерильные сегменты луковичных чешуй (5×5 мм) исследуемых видов помещали на агаризованные питательные среды В₅ и BDS, дополненные регуляторами роста ауксиновой и цитокининовой природы (табл. 13). В ходе культивирования первичных эксплантов на индукционных средах отмечали незначительное разрастание ткани чешуи и в редких случаях образование каллуса. Появление первых выпячиваний на поверхности первичного экспланта отмечали на 15-17 день после инокуляции на питательную среду, хорошо оформленные микролуковички (до 3,5 мм) наблюдали спустя еще 2,5-3 недели. Регенерацию адвентивных почек отмечали близко к раневой поверхности, при этом развитие микропобегов исследуемых видов протекало асинхронно. Изучение морфологии адвентивных структур указывает на процессы прямого геммогенеза в тканях луковичных чешуй.

Влияние компонентов питательной среды на регенерацию адвентивных луковичек исследуемых видов рода *Fritillaria* из тканей луковичных чешуй

Среда	<i>F. camschatcensis</i>		<i>F. crassifolia</i> subsp. <i>crassifolia</i>		<i>F. michailovskyi</i>		<i>F. ruthenica</i>	
	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.
B ₅ +БАП 5,0+ НУК 2,0	51,2	2,5±0,5	-		65,4	2,1±0,7	-	
B ₅ +БАП 0,4+ НУК 3,2+ ИУК 2,3	48,4	2,8±0,7	39,3	1,7±0,8	42,1	1,9±0,9	-	
BDS+БАП 5,0 +НУК 2,0	-		-		-		50,3	2,3±0,5

Примечание: «-» – нет данных

На этапе инициации культуры *in vitro* были обнаружены различия в интенсивности образования адвентивных микролуковичек. Минимальное количество образующихся *de novo* побегов из тканей первичных эксплантов характерно для *F. crassifolia* subsp. *crassifolia* (1,7±0,8 шт./эксп.).

Полученные на этапе инициации культуры *in vitro* микролуковички включали в работу по оптимизации клонального микроразмножения исследуемых видов. Для этого на стадии собственно размножения использовали питательные среды различного минерального и гормонального состава, отмеченные как наиболее оптимальные для клонального микроразмножения сибирских видов рода *Fritillaria*.

При культивировании *F. camschatcensis* не было выявлено существенного влияния компонентов питательной среды на количество образующихся микролуковичек (табл. 14). На всех исследуемых средах в среднем образовывалось 2,5 адвентивных побега на эксплант. Незначительное снижение побегообразования наблюдали на питательной среде по прописи BDS, содержащей 5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК.

При анализе зависимости частоты регенерации от компонентов среды установлено, что использование минеральной основы В₅ приводило к более активной регенерации микролуковичек. Максимальная частота побегообразования (63,6 %) отмечена на среде В₅, дополненной 0,1 мкМ БАП. Данный вариант питательной среды оказался оптимальным также для микроразмножения рябчика дагана.

Регенерация *F. camschatcensis* на стадии собственно размножения протекала по пути прямого геммогенеза. В конце пассажа микролуковичка состояла из 2-3 округлых чешуй и имела 1-2 ассимилирующих ланцетных листа. Для формирующихся адвентивных луковичек было характерно спонтанное укоренение на средах для размножения с образованием 3-4 корешков, имеющих корневые волоски.

Таблица 14

Влияние компонентов питательной среды на регенерацию адвентивных микролуковичек *F. camschatcensis*

Питательная среда	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.
BDS (контроль)	30,9	2,7±0,6
BDS+0,1 мкМ БАП	28,8	2,4±0,3
BDS+5,0 мкМ БАП+2,0 мкМ НУК	30,0	1,9±0,3
В ₅ (контроль)	21,0	2,5±0,5
В ₅ +0,1 мкМ БАП	63,6	2,6±0,6
В ₅ +0,4 мкМ БАП + 3,2 мкМ НУК+2,3 мкМ ИУК	43,4	2,6±0,5
В ₅ + 3,2 мкМ НУК+2,3 мкМ ИУК	53,5	2,6±0,4

На этапе собственно размножения *F. crassifolia* subsp. *crassifolia* и *F. michailovskyi* использовали среды, на которых наблюдали наибольший регенерационный потенциал при микроразмножении сибирских видов рода *Fritillaria* (табл. 15). Более активная регенерация микролуковичек характерна для рябчика Михайловского, при этом большинство микроразмножений к концу пассажа имело хорошо оформленную луковицу с развитыми адвентивными корнями. У

микрорастений рябчика толстолистного не происходило дифференциации луковичных чешуй и спонтанного ризогенеза на данном этапе.

Таблица 15

Влияние компонентов питательной среды на регенерацию адвентивных микролуковичек *F. crassifolia* subsp. *crassifolia* и *F. michailovskyi*

Вид	Количество побегов, шт./эксп.	
	BDS+5,0 мкМ БАП+ 2,0 мкМ НУК	B ₅ +0,4 мкМ БАП + 3,2 мкМ НУК+2,3 мкМ ИУК
<i>F. crassifolia</i> subsp. <i>crassifolia</i>	1,9±0,6	-
<i>F. michailovskyi</i>	2,7±0,9	2,8±0,6

Примечание: «-» – нет данных

Сравнивая эффективность применения различных минеральных основ при размножении микрорастений *F. ruthenica*, отмечали более активный геммогенез на питательных средах по прописи BDS. На всех испытанных средах наблюдали адвентивное побегообразование. Использование ТДЗ как в сочетании с ауксинами, так и без них оказалось более эффективным по сравнению с БАП. Однако максимальная частота регенерации (100 %) была получена на питательной среде B₅, дополненной 5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК, такое сочетание регуляторов роста обеспечивало образование 2,9±1,1 микролуковичек на эксплант (табл. 16, рис. 28). Данная комбинация регуляторов роста оказалась эффективной и для микроразмножения растений *F. sonnikovae*. При этом в отличие от других исследуемых видов более эффективным было использование высоких концентраций цитокининов (5,0 и 10,0 мкМ). Увеличение длительности пассажа приводило к угнетению роста и пожелтению листьев. На этапе собственно размножения не происходило дифференциации луковицы – развивающиеся побеги имели многочисленные видоизмененные низовые листья с зеленой листовой пластинкой и расширенным основанием (см. рис. 28). Дальнейшее пассирование на свежих питательных средах приводило к отрастанию ассимилирующих листьев, имеющих удлиненное основание и зеленую листовую пластинку ланцетной формы. Развитие округлых запасующих чешуй наблюдали лишь на стадии укоренения и адаптации.



Рис. 28. Прямая регенерация адвентивных побегов *F. ruthenica* на питательной среде В₅, дополненной 5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК

Таблица 16

Влияние компонентов питательной среды на регенерацию адвентивных микролуковичек *F. ruthenica*

Регуляторы роста, мкМ	Минеральная основа			
	BDS		В ₅	
	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.	Частота регенерации, %	Количество побегов, шт./эксп.
Контроль (безгормональная среда)	21,1	1,3±0,5	40,8	2,1±0,3
БАП 0,1	-	-	14,8	1,8±0,5
БАП 0,5	53,8	2,5±0,9	-	-
БАП 5,0+НУК 2,0	53,8	2,1±0,5	100,0	2,9±1,1
ТДЗ 0,1	37,1	2,0±0	42,4	1,9±0,4
ТДЗ 0,5	57,1	3,4±1,5	-	-
ТДЗ 5,0	54,5	2,7±0,7	-	-
ТДЗ 10,0+НУК 2,0	40,9	4,0±1,9	10,0	2,1±0,5
БАП 0,4+ НУК 3,2+ ИУК 2,3	-	-	21,9	2,7±1,0

Примечание: «-» – нет данных

В дальнейшем предполагается проводить укоренение и адаптацию к условиям *ex vitro* полученных на этапе собственно размножения микролуковичек исследуемых видов с целью создания коллекционных насаждений.

В результате проведенной работы нами получены жизнеспособные микрорастения четырех исследуемых видов рябчиков. Это доказывает возможность использования разработанных ранее протоколов клонального микроразмножения для культивирования других представителей рода *Fritillaria*. Использование сегментов луковичных чешуй в качестве эксплантов позволило получить через 12 месяцев культивирования от одной луковицы растения-донора

F. camschatcensis, *F. crassifolia* subsp. *crassifolia*, *F. michailovskyi* и *F. ruthenica* не менее 30 микролуковичек каждого вида.



Рис. 29. Микрорастения в конце пассажа, полученные на стадии собственно размножения: а – *F. camschatcensis* на среде BDS, дополненной 0,1 мкМ БАП, б – *F. crassifolia* subsp. *crassifolia* на среде BDS, содержащей 5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК, в – *F. michailovskyi* на среде В₅ без регуляторов роста, г – *F. ruthenica* на среде В₅, дополненной 0,4 мкМ БАП + 3,2 мкМ НУК + 2,3 мкМ ИУК

Создание коллекции in vitro

В результате разработанных систем клонального микроразмножения в лаборатории биотехнологии ЦСБС СО РАН создана коллекция *in vitro* 8 видов рода *Fritillaria*, среди которых редкие и эндемичные виды, занесенные в Красную книгу Российской Федерации (2008).

Культуры исследуемых видов поддерживаются в условиях активного роста при температуре $+23\pm 2$ °С и фотопериоде, при этом длительность пассажа составляет 35-40 дней. Более 3 лет поддерживается коллекция микролуковичек *F. camschatcensis*, *F. dagana*, *F. meleagris*, *F. meleagroides*, *F. ruthenica*, *F. sonnikovae*, в течение 1 года культивируются микроклоны *F. crassifolia* subsp. *crassifolia*, *F. michailovskyi*. На протяжении всего этого периода интенсивность регенерационных процессов сохраняется на постоянном уровне. На сегодняшний день коллекция *in vitro* в общей сложности насчитывает более 3000 микролуковичек исследуемых видов.

Нами также поддерживается коллекция микроклонов рябчика дагана и рябчика Сонниковой в условиях замедленного роста при температуре $+7$ °С на фотопериоде, культивируемая на безгормональных питательных средах $\frac{1}{2}$ BDS или $\frac{1}{2}$ В₅, содержащих 30,0 г/л сахарозы и 0,5-1,0 г/л активированного угля.

Пониженная температура воздуха позволяет увеличить длительность беспересадочного субкультивирования до 9-12 месяцев с сохранением жизнеспособности и регенерационного потенциала. Жизнеспособность микроклонов после длительного хранения остается на высоком уровне и достигает 87 %. По завершении этапа хранения при +7 °С микроклоны переносили на свежие питательные среды и культивировали при +23±2 °С, при этом наблюдали активную регенерацию микропобегов. В последующем при необходимости начинали очередной цикл хранения.

Для микрорастений, находящихся в режиме длительного депонирования, характерны следующие черты: гипергидратация луковичных чешуй, отмирание имеющихся листьев, продолжение роста луковицы и увеличение ее размеров в 2 раза к концу субкультивирования. На протяжении всего пассажа (9 месяцев и более) наблюдали закладку единичных адвентивных побегов в базальной части луковички, однако частота побегообразования не превышала 11,0 %. Длительность депонирования ограничивалась не только жизнеспособностью микроклонов, но также истощением питательной среды и, как следствие, уменьшением ее объема, что указывает на необходимость постоянного контроля объема питательной среды в культуральных сосудах.

Для оценки регенерационного потенциала тканей хранящихся луковичек проводили культивирование сегментов чешуй в стандартных температурных условиях (+23±2 °С). В эксперименте использовали среды, отмеченные как наиболее оптимальные на этапе собственно размножения. Так, культивирование сегментов чешуй микролуковичек рябчика Сонниковой на питательной среде BDS, дополненной 5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК, стимулировало регенерацию в тканях луковичных чешуй в первом пассаже, следующим за циклом хранения. На данной питательной среде наблюдали высокие частоту регенерации (92,8 %) и активность побегообразования (6,9±1,7 микролуковичек на эксплант). Высокий морфогенетический потенциал так же отмечали и на безгормональной питательной среде BDS – частота регенерации 75,9 %, количество адвентивных побегов – 4,7±0,7 шт./эксп. В том и другом случае происходило разрастание ткани

луковичной чешуи и образование плотных конгломератов побегов, при этом формировались мелкие луковички размером не более 2-3 мм. Однако при дальнейшем субкультивировании активность регенерации снижалась и к 3 пассажу достигала уровня, соответствующего частоте регенерации перед длительным депонированием.

Согласно литературным данным наиболее доступными способами создания коллекций растений *in vitro*, находящихся в состоянии замедленного роста, являются снижение температуры культивирования и уменьшение концентрации питательных веществ в среде (Engelmann, 2011). Так, подобные меры (температура +4-6 °С, 1 % сахара) позволили сохранить в беспересадочной культуре микроклоны рябчика шахматного в течение 18 месяцев (Вечернина, 2006). Так же имеются работы, свидетельствующие об успешном длительном хранении представителей родов *Allium* и *Lilium* при температуре -2 °С (Keller, 1992; Bonnier, Van Tuyl, 1996).

В итоге, на основе разработанных систем клонального микроразмножения на сегодняшний день создана коллекция *in vitro* восьми представителей рода *Fritillaria*. Культуры хранятся в условиях активного и замедленного роста на агаризованных питательных средах. При этом коллекция насчитывает более 3000 микрорастений в состоянии активного роста, и более 100 микролуковичек в состоянии замедленного роста. В процессе изучения особенностей длительного хранения *in vitro* нам удалось увеличить период беспересадочного субкультивирования до 9-12 месяцев, используя только самые доступные приемы по замедлению ростовых процессов – снижение температуры культивирования и уменьшение концентрации минеральных компонентов питательной среды.

Таким образом, в результате подбора наиболее оптимальных питательных сред и условий культивирования нами разработана схема, позволяющая использовать биотехнологический подход для размножения и сохранения редких и эндемичных видов рода *Fritillaria*. Схема включает выбор первичного экспланта, размножение и депонирование микролуковичек *in vitro*, укоренение и дальнейшую адаптацию пробирочных растений к условиям *ex vitro* (рис. 30).

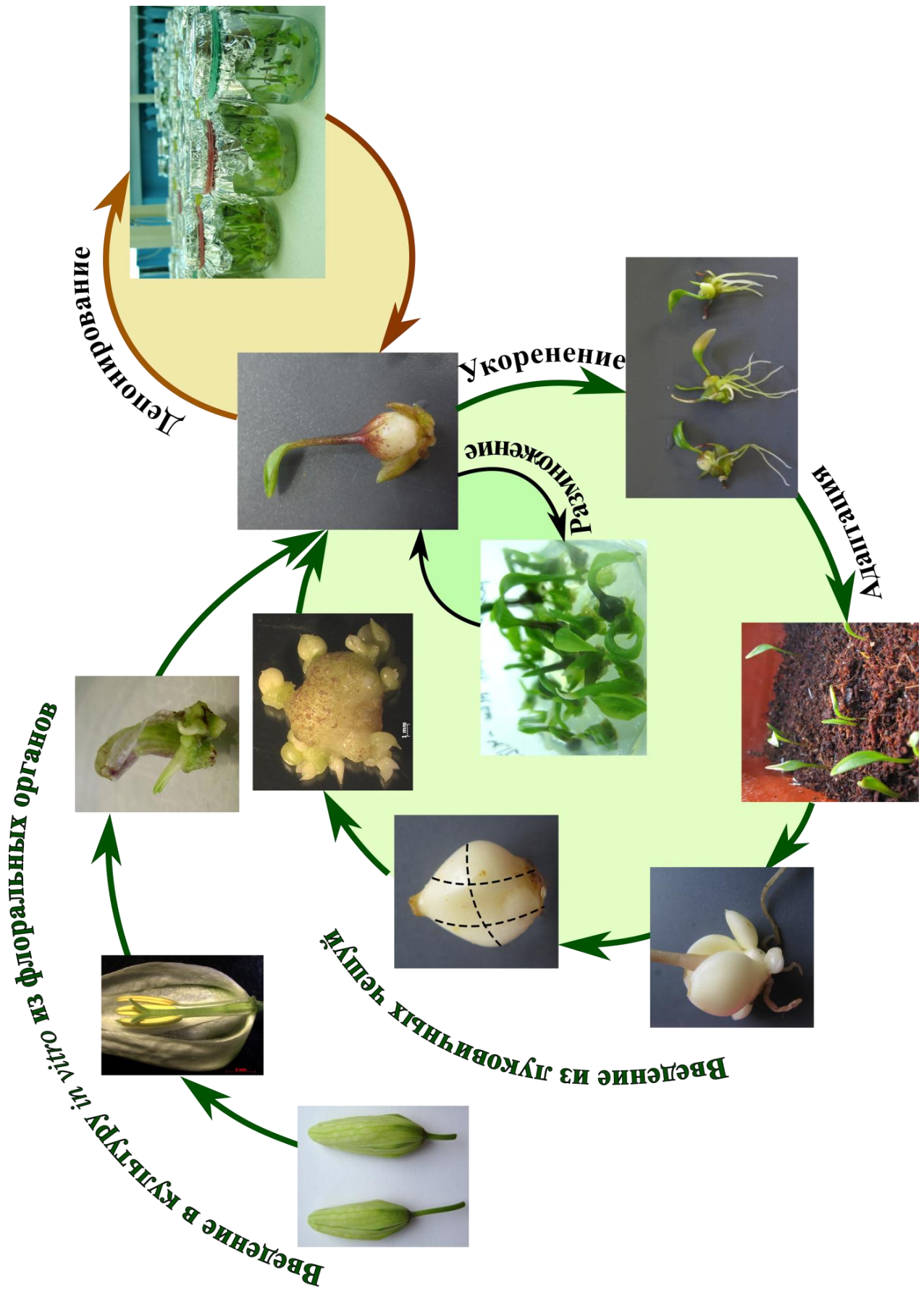


Рис. 30. Схема процесса размножения исследуемых видов рода *Fritillaria* в культуре *in vitro*

ВЫВОДЫ

1. Выявлены видовые различия по скорости индукции морфогенного ответа при использовании в качестве первичных эксплантов сегментов луковичных чешуй: при культивировании *F. sonnikovae* первые морфогенетические изменения наблюдали через 15-17 дней, в культуре *F. meleagris* – на 20-27 день, *F. meleagroides* – на 30-35 день, а *F. dagana* – на 51-56 день после инокуляции на питательные среды.

2. Регенерация адвентивных микролуковичек в культуре органов цветка *F. meleagris* происходит в базальной части листочков околоцветника и тычинок, а также по всей поверхности завязи. Наибольшим морфогенетическим потенциалом среди флоральных эксплантов обладают листочки околоцветника, а наименьшим – тычинки.

3. Показана видоспецифичность морфогенного ответа изучаемых рябчиков на действие регуляторов роста при использовании минеральных сред различного состава. Подобраны оптимальные среды для собственно размножения изучаемых видов: для *F. dagana* эффективным является внесение 0,1 мкМ БАП в питательную среду по прописи В₅, для *F. sonnikovae* – использование среды BDS, содержащей 5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК, для *F. meleagris* и *F. meleagroides* – питательная среда В₅, дополненная 0,4 мкМ БАП, 3,2 мкМ НУК и 2,3 мкМ ИУК. Наиболее эффективным цитокинином на стадии собственно размножения является БАП по сравнению с ТДЗ и Кн.

4. Установлено, что для *F. dagana*, *F. sonnikovae* и *F. meleagris* на стадии собственно размножения характерна прямая регенерация микролуковичек – геммогенез, а для *F. meleagroides* – непрямой геммогенез.

5. Впервые показано влияние минерального состава среды на путь морфогенеза *F. meleagris* при использовании одинаковой комбинации регуляторов роста: культивирование сегментов чешуй на В₅ вызывает прямой геммогенез, а использование BDS – непрямой гемморизогенез. Заложение

меристем *de novo* при прямом геммогенезе происходит в эпидерме эксплантов, а при непрямом гемморизогенезе – эндогенно, в глубоких клеточных слоях каллуса.

6. Культивирование при низких положительных температурах (+7 °С) на стадии укоренения способствует более интенсивному ризогенезу и росту луковичек, а также ускорению прорастания и развития растений-регенерантов при последующем переносе их в условия *ex vitro*. Наиболее оптимальным режимом адаптации микрорастений исследуемых видов является акклиматизация в условиях теплицы с использованием в качестве субстрата смеси измельченного кокосового волокна и песка (3:1), что обеспечивает высокую частоту адаптации (до 82,7 %).

7. Установлено, что в культуре *in vitro* происходит ускорение онтогенетического развития исследуемых видов рябчиков по сравнению с естественными условиями.

8. На основании проведенных исследований разработаны эффективные протоколы размножения *in vitro* восьми редких и эндемичных видов рода *Fritillaria*. С целью создания банка культур *in vitro* подобраны условия для длительного беспересадочного субкультивирования (до 9-12 месяцев), включающее пассирование на питательных средах с уменьшенным в два раза содержанием макро- и микрокомпонентов, дополненных 0,5-1,0 г/л активированного угля при температуре +7 °С на фотопериоде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Амельченко, В.П. Интродукция редких и исчезающих растений Сибири в Сибирском ботаническом саду ТГУ / В.П. Амельченко, А.С. Прокопьев, А.Н. Некратова // Современная ботаника в России. Труды XIII Съезда Русского ботанического общества и конференции «Научные основы охраны и рационального использования растительного покрова Волжского бассейна» (Тольятти, 16-22 сентября 2013 г.). – Т. 3. Охрана растительного мира. Ботаническое ресурсосведение. Культурные растения. Интродукция растений. Экологическая физиология растений. Ботаническое образование. – Тольятти: Кассандра, 2013. – С. 106-108.

Андреев, Л.Н. Роль ботанических садов России в сохранении биологического разнообразия растений / Л.Н. Андреев, Ю.Н. Горбунов // Биологическое разнообразие. Интродукция растений: Материалы III Международной научной конференции (Санкт-Петербург, 23-25 сентября 2003 г.). – СПб.: БИН РАН, 2003. – С. 5-7.

Ахметова, А.Ш. Интродукция и размножение тюльпанов *in vivo* и *in vitro* в лесостепной зоне Башкирского Предуралья: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.05 / Ахметова Альбина Шамсуновна. – Оренбург, 2009. – 18 с.

Баранова, М.В. Луковичные растения семейства Лилейных (география, биоморфологический анализ, выращивание) / М.В. Баранова. – СПб.: Наука, 1999. – 229 с.

Баранова, М.В. Луковица / М.В. Баранова // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3. Системы репродукции (Ред. Т.Б. Батыгина). – СПб.: Мир и семья, 2000. – С. 321-327.

Батыгина, Т.Б. Эмбриогения / Т.Б. Батыгина // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2. Семя (Ред. Т.Б. Батыгина). – СПб.: Мир и семья, 1997 а. – С. 624-648.

Батыгина, Т.Б. Эмбриология цветковых растений: Терминология и концепции. Т. 2. Семя (Ред. Т.Б. Батыгина). – СПб.: Мир и семья, 1997 б. – 823 с.

Батыгина, Т.Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей / Т.Б. Батыгина // Физиол. растений. – 1999. – Т. 6, № 6. – С. 884-898.

Батыгина, Т.Б. Эмбриология цветковых растений: Терминология и концепции. Т. 3. Системы репродукции (Ред. Т.Б. Батыгина). – СПб.: Мир и семья, 2000. – 639 с.

Батыгина, Т.Б. От микроспоры – к сорту / Т.Б. Батыгина, Н.Н. Круглова, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдимирова. – М.: Наука, 2010. – 174 с.

Брагина, А.С. Семейство Лилейные (Liliaceae) [Электронный ресурс] / А.С. Брагина, А.А. Тарасова // Научный электронный архив. – Режим доступа: <http://econf.rae.ru/article/5237>.

Бутенко, Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1964. – 272 с.

Ветчинкина, Е.М. Биологические особенности культивирования *in vitro* семян и зародышей редких видов растений: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.01 / Ветчинкина Екатерина Михайловна. – Москва, 2010. – 22 с.

Ветчинкина, Е.М. Сохранение редких видов растений в генетических коллекциях *in vitro* / Е.М. Ветчинкина, И.В. Ширнина, С.Ю. Ширнин, О.И. Молканова // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. – 2012. – Вып. 7. – С. 109-118.

Вечернина, Н.А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений: монография / Н.А. Вечернина. – Барнаул: Изд-во Алт. унта, 2004. – 205 с.

Вечернина, Н.А. Сохранение биологического разнообразия редких, исчезающих видов, уникальных форм и сортов растений методами биотехнологии: автореф. дис. ... док. биол. наук: 03.00.05, 03.00.12 / Вечернина Нина Александровна. – Новосибирск, 2006. – 32 с.

Власова, Н.В. 10. *Fritillaria* L. – Рябчик / Н.В. Власова // Флора Сибири. Araceae – Orchidaceae (Ред. Л. И. Малышев). – Новосибирск: Наука, 1987. – С. 99-101.

Высоцкий, В.А. Регенерация вегетативных органов листовыми дисками и другими эксплантами рода *Rubus in vitro* / В.А. Высоцкий, М.Т. Упадышев // Физиология растений. – 1992. – Т.39, №3. – С. 584-591.

Данилова, Н.С. Размножение некоторых редких и исчезающих растений / Н.С. Данилова, С.З. Борисова, А.Ю. Романова, Т.Ю. Рогожина, А.Е. Петрова, Н.С. Иванова // Вестник Северо-Восточного Федерального университета им. М.К. Аммосова. – 2005. – № 1, Т. 2. – С. 84-90.

Двораковская, В.М. Ритм развития всходов и ювенильных растений некоторых видов рода *Fritillaria* / В.М. Двораковская // Науч. Докл. Высшей Школы. Биол. Науки. – 1973. – №8. – С. 58-63.

Жолобова, О.О. Сохранение редких и исчезающих видов растений при помощи методов биотехнологии [Электронный ресурс] / О.О. Жолобова, О.И. Коротков, Г.Н. Сафронова А.В., Буганова, О.А. Сорокопудова // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 1. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/101-5341>.

Журавлев, Ю.Н. Морфогенез у растений *in vitro* / Ю.Н. Журавлев, А.М. Омелько // Физиология растений. – 2008. – Т. 55, № 5. – С. 643-664.

Иллюстрированная энциклопедия растительного мира Сибири (Ред. В.П. Седельников). – Новосибирск: Арта, 2009. – 392 с.

Калинин, Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – Киев: Наук. думка, 1980. – 488 с.

Конвенция о биологическом разнообразии, 1992 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.un.org/ru/documents/decl_conv/conventions/biodiv.shtml.

Красная книга Алтайского края. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений. – Барнаул: ОАО «ИПП «Алтай», 2006. – 262 с.

Красная книга Красноярского края. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений и грибов / Гл. ред. Н.В. Степанов. – Изд. 2, Т.2.– Красноярск: Изд-во Сибирского фед. ун-та, 2012. – 576 с.

Красная книга Курганской области / Гл. ред. В.Н. Большаков, отв. ред. В.П. Стариков, Н.И. Науменко. – Изд. 2. – Курган: Изд-во Курганского гос. ун-та, 2012. – 448 с.

Красная книга Новосибирской области / Департамент природных ресурсов и охраны окружающей среды Новосибирской области. – Изд. 2. – Новосибирск: Арта, 2008. – 528 с.

Красная книга Приморского края: Растения. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов / Биолого-почвенный институт ДВО РАН. – Владивосток: АВК «Апельсин», 2008. – 688 с.

Красная книга Республики Алтай: растения / Отв. ред. И.М. Красноборов. – Горно-Алтайск: ОАО «Горно-Алтайская типография», 2007. – 272 с.

Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / Отв. ред. Л.В. Бардунов, В.С. Новиков. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 885 с.

Круглова, Н.Н. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*: цитогистологические аспекты / Н.Н. Круглова, О.А. Сельдимирова. – Уфа: АН РБ, Гилем, 2011. – 124 с.

Кульханова, Д.С. Введение в культуру *in vitro* редкого вида *Fritillaria meleagris* L. / Д.С. Кульханова, Т.И. Новикова // Перспективы развития и проблемы современной ботаники: Материалы III (V) Всероссийской молодежной конференции с участием иностранных ученых (Новосибирск, 10-14 ноября 2014 г.). – Новосибирск: Изд-во "Академиздат", 2014. – С. 156-157.

Кульханова, Д.С. Размножение редких видов рода *Fritillaria* методами биотехнологии / Д.С. Кульханова, А.А. Эрст, Т.И. Новикова // Материалы «Международной конференции по биологии и биотехнологии растений» (Алматы, 28-30 мая 2014 г.). – Алматы: ИББР, 2014. – С. 16, 261.

Кульханова, Д.С. Регенерация эндемичного вида *Fritillaria sonnikovae* из луковичных чешуй в культуре *in vitro* / Д.С. Кульханова, А.А. Эрст, Т.И. Новикова // Онтогенез. – 2015. – Т. 46, №4. – С. 259-266.

Лозина-Лозинская, А.С. Род 271. Рябчик – *Fritillaria* L. / А.С. Лозина-Лозинская // Флора СССР. Т. 4. (Ред. В.Л. Комаров) /. – Л.: Изд-во АН СССР, 1935. – С. 302-320.

Митрофанова, И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур: автореф. дис. ... док. биол. наук: 03.00.20 / Митрофанова Ирина Вячеславовна. – Ялта, 2007. – 30 с.

Митрофанова, И.В. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения культурных растений / И.В. Митрофанова // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 6. – С. 496-508.

Мокшин, Е.В. Морфо-физиологические особенности клонального микроразмножения *in vitro* различных сортов лилий (*Lilium* L.) и гладиолусов (*Gladiolus* L.): автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.12 / Мокшин Евгений Владимирович. – Саранск, 2005. – 20 с.

Молканова, О.И. Генетические банки растений: проблемы формирования, сохранения и использования / О.И. Молканова, О.И. Коротков, Е.М. Ветчинкина, Н.А. Мамаева, О.Г. Васильева // Вестник Удмуртского университета. – 2010. – Вып. 3. – С. 33-39.

Мулдашев, А.А. Опыт реинтродукции редкого реликтового вида *Allium humenorrhizum* Ledeb. (сем. Alliaceae) на Южном Урале / А.А. Мулдашев, Н.В. Маслова, А.Х. Галеева, О.А. Елизарьева // Современная ботаника в России. Труды XIII Съезда Русского ботанического общества и конференции «Научные основы охраны и рационального использования растительного покрова Волжского бассейна» (Тольятти, 16-22 сентября 2013 г.). – Т. 3. Охрана растительного мира. Ботаническое ресурсоведение. Культурные растения. Интродукция растений. Экологическая физиология растений. Ботаническое образование. – Тольятти: Кассандра, 2013. – С. 149-150.

Мурасева, Д.С. Размножение и сохранение *in vitro* редкого вида *Fritillaria meleagris* L. из флоральных эксплантов / Д.С. Мурасева, Т.И. Новикова, А.А. Эрст // Сибирский экологический журнал. – 2015. – №6. – С. 909-919.

Мухаметвафина, А.А. Онтогенез лилии кудреватой (*L. martagon* L.) / А.А. Мухаметвафина, М.М. Ишмуратова // Онтогенетический атлас растений: научное издание. Т. V. – Йошкар-Ола: МарГУ, 2007. – С. 292-296.

Набиева, А.Ю. Сохранение и размножение в культуре *in vitro* генотипов редких видов лилий азиатской части России: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.05./ Набиева Александра Юрьевна. – Новосибирск, 2008. – 17 с.

Николаева, М.Г. Биология семян / М.Г. Николаева, И.В. Лянгузова, Л.М. Поздова. – СПб.: НИИ химии СПбГУ, 1999. – 232 с.

Новикова, Т.И. Использование биотехнологических подходов для сохранения биоразнообразия растений / Т.И. Новикова // Растительный мир Азиатской России. – 2013. – №2(12). – С. 119-128.

Новикова, Т.И. Сохранение редких и полезных растений в коллекции Центрального сибирского ботанического сада / Т.И. Новикова, А.Ю. Набиева, Т.В. Полубоярова // Вестн. ВОГиС. – 2008. – Т. 12, № 4. – С. 564-572.

Павлова, М.А. Анализ успешности интродукции декоративных луковичных геофитов природной флоры в Донецком ботаническом саду НАН Украины / М.А. Павлова // Промышленная ботаника. – 2006. – Вып.6. – С. 79-82.

Паушева, З.П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.

Перегудова, И.В. Возможности сохранения редких и исчезающих видов растений в генетических банках *in vitro* / И.В. Перегудова, С.Ю. Ширнин // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира: материалы II Всерос. науч.-практ. конф. (Волгоград, 19–21 августа, 2008 г.). – Белгород: Изд-во БелГУ, 2008. – С. 73-76.

Поздова, Л.М. Покой семян / Л.М. Поздова, М.В. Разумова // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2. Семя. (Ред. Т.Б. Батыгина). – СПб.: Мир и семья, 1997. – С. 656-667.

Полубоярова, Т.В. Особенности морфогенеза некоторых видов луков подрода *Melanocrommyum* в культуре *in vitro*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.01 / Полубоярова Татьяна Владимировна. – Новосибирск, 2011. – 17 с.

Ротов, Р.А. Морфо-биологические особенности луковичных эфемероидов на примере рода *Fritillaria* L. и других близких родов семейства Лилейных / Р.А. Ротов // Труды Московского общества испытателей природы. – 1976. – Т. XLII. – С. 186-193.

Седельникова, Л.Л. Биоморфология геофитов в Западной Сибири / Л.Л. Седельникова. – Новосибирск: Наука, 2002. – 308 с.

Седельникова, Л.Л. Биологические закономерности развития луковичных и клубнелуковичных геофитов при интродукции в лесостепную зону Западной Сибири: автореф. дис. ... док. биол. наук: 03.00.05 / Седельникова Людмила Леонидовна. – Новосибирск, 2004. – 33 с.

Седельникова, Л.Л. Интродукция корневищных, луковичных и клубнелуковичных декоративных многолетников в Центральном Сибирском ботаническом саду / Л.Л. Седельникова // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века: Материалы всероссийской конференции (Петрозаводск, 22–27 сентября 2008 г.). Часть 6: Экологическая физиология и биохимия растений. Интродукция растений. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2008. – С. 320-323.

Сикура, И.И. Сохранение *ex situ – in vitro* биологического разнообразия различных видов мировой флоры в Институте клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины / И.И. Сикура, В.Б. Белокурова, Е.Н. Шиша, Н.В. Кучук // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира: материалы II Всерос. науч.-практ. конф. (Волгоград, 19–21 августа, 2008 г.). – Белгород: Изд-во БелГУ, 2008. – С. 137-142.

Слепченко, Н.А. Редкие и исчезающие виды семейства *Amaryllidaceae* Jaume Saint-Hilaire на черноморском побережье России и стратегия их сохранения: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08, 03.02.01 / Слепченко Наталья Александровна. – Махачкала, 2013. – 23 с.

Соколов, Р.Н. Введение в культуру *in vitro* некоторых редких и исчезающих видов флоры Западного Кавказа / Р.Н. Соколов, Т.М. Коломиец, В.И. Маляровская // Научный журнал КубГАУ. – 2013. – №94(10). – С. 1-17.

Тахтаджян, А.Л. Система магнолиофитов / А.Л. Тахтаджян. – Л.: Наука, 1987. – 439 с.

Чайлахян, М.Х. Терминология роста и развития высших растений / М.Х. Чайлахян, Р.Г. Бутенко, О.Н. Кулаева. – М.: Наука, 1982. – 96 с.

Чурикова, О.А. Некоторые особенности морфогенеза лилий и гиацинтов при клональном микроразмножении *in vitro* / О.А. Чурикова // «Морфофизиология специализированных побегов многолетних травянистых растений»: тез. докл. Всероссийс. совещ. (Сыктывкар, 3-5 октября 2000 г.). – Сыктывкар: Изд-во Коми НЦ УрО РАН, 2000. – С. 171-172.

Шауло, Д.Н. Новый вид рода *Fritillaria* L. (Liliaceae) с Западного Саяна / Д.Н. Шауло, А.С. Эрст // *Turczaninowia*. – 2010. – №13(3). – С. 46-49.

Шевелуха, В.С. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.З. Кочиева (Ред. В.С. Шевелуха). – Изд. 3. – М.: Высш. шк., 2008. – 710 с.

Эрст, А.А. Размножение *in vitro* редкого вида *Fritillaria dagana* Turcz. ex Trautv. из луковичных чешуй / А.А. Эрст, А.С. Эрст // *Turczaninowia*. – 2011. – №14(4). – С. 90-93.

Эрст, А.А. Сохранение и размножение *in vitro* редких видов рода *Fritillaria* (Liliaceae) / А.А. Эрст, А.С. Эрст, Д.Н. Шауло, Д.С. Кульханова // Растительный мир Азиатской России. – 2014. – №1(13). – С. 64-70.

Akin-Idowu, P.E. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops / P.E. Akin-Idowu, D.O. Ibitoye, O.T. Ademoyegun // *Afri J Biotechnol*. – 2009. – Vol. 8. – P. 3782-3788.

Asthana, P. Micropropagation of *Sapindus trifoliatus* L. and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD analysis / P. Asthana, V.S. Jaiswal, U. Jaiswal // *Acta Physiol Plant*. – 2011. – Vol. 33. – P. 1821-1829.

Azadi, P. Micropropagation of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss as affected by plant growth regulator, sucrose concentration, harvesting season and cold treatments / P. Azadi, M. Khosh-Khui // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2007. – Vol. 10, No.4. – P. 582-591.

Bacchetta, L. Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stem nodes of *Lilium* / L. Bacchetta, P.C. Remotti, C. Bernardini, F. Saccardo // *Plant Cell Tiss Org Cult.* – 2003. – Vol. 74. – P. 37-44.

Bakhshaie, M. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss., an endangered species / M. Bakhshaie, M. Babalar, M. Mirmasoumi, A. Khalighi // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2010. – Vol. 102. – P. 229-235.

Bassuner, B.M. Auxin and root initiation in somatic embryos of *Arabidopsis* / B.M. Bassuner, R. Lam, W. Lukowitz, E.C. Yeung // *Plant Cell Rep.* – 2007. – Vol. 26. – P. 1-11.

Bekheet, S.A. *In vitro* conservation of date palm germplasm / S.A. Bekheet // *Date palm biotechnology* (Eds. S.M. Jain, J.M. Al-Khayri, D.M. Johnson). – Dordrecht: Springer, 2011. – P. 337-360.

Bell, R.L. *In vitro* tissue culture of pear: Advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation / R.L. Bell, B.M. Reed // *Proc. 8th IS on Pear.* – 2002. – P. 412-418.

Benedetto, D. Biomass production in ornamental foliage plants: crop productivity and mechanisms associated with exogenous cytokinin supply / D. Benedetto, J. Tognetti, C.R. Galmarini // *Amer J Plant Scien Biotech.* – Vol. 4, Is. 1. – 2010. – P. 1-22.

Benkeblia, N. Chilling effect on soluble sugars, respiration rate, total phenolics, peroxidase activity and dormancy of onion bulbs / N. Benkeblia, N. Shiomi // *Sci Agric (Piracicaba Braz).* – 2004. – Vol. 61. – P. 281-285.

Benson, E.E. *Plant Conservation Biotechnology* / E.E. Benson. – London, Philadelphia, PA: Taylor & Francis, 2002. – 309 p.

Bhagyalakshmi, N. Factors influencing direct shoot regeneration from ovary explants of saffron / N. Bhagyalakshmi // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 1999. – Vol. 58. – P. 205-211.

Bhatia, P. Effects of genotype, explants orientation, and wounding on shoot regeneration in tomato / P. Bhatia, N. Ashwath, D. Midmore // *In Vitro Cell Dev Biol – Plant.* – 2005. – Vol. 41. – P. 457-464.

Bhojwani, S.S. Plant tissue culture: An introductory text / S.S. Bhojwani, P.K. Dantu . – New Delhi: Springer, 2013. – 309 p.

Bi, R.M. Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum* / R.M. Bi, M. Kou, L.G. Chen, S.R. Mao, H.G. Wang // *Plant Breed.* – 2007. – Vol. 126(1). – P. 9–12.

Boltenkov, E.V. Effect of phytohormones on plant regeneration in callus culture of *Iris ensata* Thunb. / E.V. Boltenkov, L.N. Mironova, E.V. Zarembo // *Biology Bulletin.* – 2007. – Vol. 34, No. 5. – P. 446-450.

Bonnier, F.J.M. Freezing of vegetative germplasm of lily for 0 to 4 yr. / F.J.M. Bonnier, J.M. Van Tuyl // *Acta Hort.* – 1996. – Vol. 414. – P. 169-173.

Buiteveld, J. Callus induction and plant regeneration from explants of commercial cultivars of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum* L.) / J. Buiteveld, P. Van der Valk, J. Jansen, J. Creemers-Molenaar, C.M. Colijn-Hooymans // *Plant Cell Rep.* – 1993. – Vol. 12. – P. 431-434.

Carasso, V. Temperature control of seed germination in *Fritillaria tubiformis* subsp. *moggridgei* (Liliaceae) a rare endemic of the South-West Alps / V. Carasso, F.R. Hay, R.J. Probert, M. Mucciarelli // *Seed Science Research.* – 2011. – Vol. 21. – P. 33-38.

Carasso, V. *In vitro* bulblet production and plant regeneration from immature embryos of *Fritillaria tubiformis* Gren. & Godr. / V. Carasso, M. Mucciarelli // *Propagation of Ornamental Plants.* – 2014. – Vol. 14, № 3. – P. 101-111.

Chang, C. A tissue culture protocol for propagation of a rare plant, *Lilium speciosum* Thunb. var. *gloriosoides* Baker / C. Chang, C.-T. Chen, Y.-C. Tsai, W.-C. Chang // *Bot. Bull. Acad. Sin.* – 2000. – Vol. 41. – P. 139-142.

Chen, J. The effects of storage condition on starch metabolism and regeneration potentials of twin-scales and inflorescence stem explants of *Narcissus tazetta* / J. Chen, M. Ziv // *In Vitro Cell Dev Biol – Plant.* – 2005. – Vol. 41. – P. 816-821.

Chen, J.T. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis* / J.T. Chen, W.C. Chang // *Biologia plantarum*. – 2006. – Vol. 50 (2). – P. 169-173.

Chen, L.J. Efficient callus induction and plant regeneration from anther of Chinese narcissus (*Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem) / L.J. Chen, X.Y. Zhu, L. Gu, J. Wu // *Plant Cell Rep.* – 2005. – Vol. 24. – P. 401-407.

Chow, Y.N. Basal plate tissue in narcissus bulb and shoot clamp culture: its structure and role in organogenic potential of single leaf cultures / Y.N. Chow, C. Selby, T.W. Fraser, B.M.R. Harvey // *Annals of botany*. – 1993. – Vol. 71. – P. 437-443.

Christianson, M.L. An embryogenic culture of soybean: towards a general theory of somatic embryogenesis / M.L. Christianson // *Tissue culture in forestry and agriculture* (Eds. R.R. Henke, K.W. Hughes, M.J. Constantin, A. Hollaender). – New York: Plenum Press, Springer, 1985. – P. 83-103.

Christianson, M.L. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis / M.L. Christianson, D.A. Warnik // *Developmental Biology*. – 1983. – Vol. 95(2). – P. 288-293.

Christianson, M.L. Phenocritical times in the process of *in vitro* shoot organogenesis / M.L. Christianson, D.A. Warnik // *Dev. Biol.* – 1984. – Vol. 101. – P. 382-390.

Chung, C.H. Effects of storage temperature and sucrose on bulblet growth, starch and protein contents in *in vitro* cultures of *Hyacinthus orientalis* / C.H. Chung, Y.M. Chung, S.J. Yang, E.K. Ko, S.J. Jeong, J.S. Nam, G.T. Kim, Y.B. Yi // *Biologia plantarum*. – 2006. – Vol. 50 (3). – P. 346-351.

Çiğ, A. *In vitro* propagation techniques for some geophyte ornamental plants with high economic value / A. Çiğ, G. Başdoğan // *International journal of secondary metabolite*. – 2015. – Vol. 2, Is 1. – P. 27-49.

Cordeiro, S.Z. *In vitro* conservation of *Mandevilla moricandiana* (Apocynaceae): short-term storage and encapsulation–dehydration of nodal segments / S. Z. Cordeiro, N. K. Simas, A. B. Henriques, A. Sato // *In Vitro Cell Dev Biol – Plant*. – 2014. – Vol. 50. – P. 326-336.

Coste, A. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum* / A. Coste, L. Vlase, A. Halmagyi, C. Deliu, G. Coldea // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2011. – Vol. 106, Is 2. – P. 279-288.

Cruz-Cruz, C.A. Biotechnology and conservation of plant biodiversity / C.A. Cruz-Cruz, M.T. González-Arno, F. Engelmann // *Resources.* – 2013. – Vol. 2. – P. 73-95.

Davies, P.J. Regulatory factors in hormone action: Level, location and signal transduction / P.J. Davies // *Plant Hormones* (Eds. P.J. Davies), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. – P. 16-35.

Davis, P. Fritillaries in the Eastern Mediterranean / P. Davis // *Lily Year Book.* – 1947. – № 11. – P. 141-144.

Day, P.D. Evolutionary relationships in the medicinally important genus *Fritillaria* L. (Liliaceae) / P.D. Day, M. Berger, L. Hill, M.F. Fay, A.R. Leitch, L.J. Kelly, I.J. Leitch // *Molecular Phylogenetics and Evolution.* – 2014. – Vol. 80. – P. 11-19.

De Almeida, M. Plant morphogenesis: theoretical bases / M. De Almeida, E.M. Graner, G.E. Brondani, L.S. De Oliveira, F.A. Artioli, L.V. De Almeida, G.F. Leone, F.J.B. Baccarin, P. De Oliveira-Antonelli, G.M. Cordeiro, G.P.J. Oberschelp, K. Batagin-Piotto // *Advances in Forestry Science Review Adv. For. Sci., Cuiabá.* – 2015. – Vol. 2, №1. – P. 13-22.

De Bruyn, M.H. *In vitro* propagation of *Amaryllis belladonna* / M.H. De Bruyn, D.I. Ferreira, M.M. Slabbert, J. Pretorius // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 1992. – Vol. 31. – P. 179–184.

De Hertogh, A.A. Physiological and biochemical aspects of flower bulbs / A.A. De Hertogh, M. Le Nard // *The physiology of flower bulbs* (Eds. A.A. De Hertogh, M. Le Nard). – Amsterdam: Elsevier, 1993. – P. 53–69.

De Klerk, G.J. Micropropagation of bulbous crops: Technology and present state / G.J. De Klerk // *Floriculture and Ornamental Biotechnology.* – 2012. – Vol. 6 (Special Issue 1). – P. 1-8.

De Klerk, G.J. Growth of bulblets of *Lilium speciosum in vitro* and soil / G.J. De Klerk, K.K. Van Schadewijk, M. Gerrits // *Acta Hort.* – 1992. – Vol. 325. – P. 513-520.

Delporte, F. Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat / F. Delporte, A. Pretova, P. du Jardin, B. Watillon // *Protoplasma.* – 2014. – Vol. 251. – P.1455-1470.

Demeter, Z. Somatic embryogenesis and regeneration from shoot primordia of *Crocus heuffelianus* / Z. Demeter, G. Surányi, V.A. Molnár, G. Sramkó, D. Beyer, Z. Kánya, G. Vasas, M. Hamvas, C. Máthe // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2010. – Vol. 100. – P. 349-353.

Dhaliwal, H.S. Competence, determination, and meristemoid plasticity in tobacco organogenesis *in vitro* / H.S. Dhaliwal, N.S. Ramesar-Fortner, E.C. Yeung, T.A. Thorpe // *Canadian Journal of Botany.* – 2003. – Vol. 81(6). – P. 611-621.

Distabanjong, K. Multiple shoot formation from cotyledonary node segments of Eastern redbud / K. Distabanjong, R.L. Geneve // *Plant Cell Tiss Org Cult.* – 1997. – Vol. 47. – P. 247-254.

Don Palmer, C. Plant regeneration from petal explants of *Hypericum perforatum* L. / C. Don Palmer, W.A. Keller // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2011. – Vol. 105. – P. 129-134.

Duclercq, J. *De novo* shoot organogenesis: From art to science / J. Duclercq, B. Sangwan-Norreel, M. Catterou, R.S. Sangwan // *Trends in Plant Science.* – 2011. – Vol. 16. – P. 597-606.

Dunstan, D.J. Improved growth of tissue cultures of the onion *Allium cepa* / D.J. Dunstan, K.C. Short // *Physiol. Plant.* – 1977. – Vol. 41, № 1. – P. 70-72.

Ebrahimzadeh, R.T. *In vitro* production of floral buds in stigma-like structures on floral organs of *Crocus sativus* L. / R.T. Ebrahimzadeh, T. Radjabian, R. Karamian // *Pak J Bot.* – 2000. – Vol. 32. – P. 141-150.

Engelmann, F. Technologies and strategies for *ex situ* conservation / F. Engelmann, J.M.M. Engels // *Managing Plant Genetic Diversity* (Eds. J.M.M. Engels, V.R. Rao, A.H.D. Brown, M.T. Jackson). – Wallingford, UK: CABI Publishing, 2002. – P. 89–104.

Engelmann, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity / F. Engelmann // *In vitro Cell Dev Biol – Plant.* – 2011. – Vol. 47. – P. 5-16.

Fahn, A. Plant anatomy. 4th edn. / A. Fahn. - Elmsford, NY: Pergamon Press, 1990. – P. 588.

Fahy, G.M. Vitrification as an approach to cryopreservation / G.M. Fahy, D.R. MacFarlane, C.A. Angell, H.T. Meryman // *Cryobiology.* – 1984. – Vol. 21. – P. 407-426.

FAO. State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. – 1996. – 82 p.

Fay, M.F. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods / M.F. Fay // *In vitro Cell Dev Biol.* – 1992. – Vol. 28. – P. 1-4.

Fereol, L. Evidence of a somatic embryogenesis process for plant regeneration in garlic (*Allium sativum* L.) / L. Fereol, V. Chovelon, S. Causse, N. Michaux-Ferriere, R. Kahane // *Plant Cell Rep.* – 2002. – Vol. 21. – P. 197-203.

Fortes, A.M. Organogenic nodule formation in hop: a tool to study morphogenesis in plants with biotechnological and medicinal applications / A.M. Fortes, F. Santos, M.S. Pais // *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* – 2010. – Vol. 2010. – P. 1-16.

Friml, J. Auxin transport – shaping the plant / J. Friml // *Curr. Opin. Plant. Biol.* – 2003. – Vol. 6. – P. 1-6.

Gahan, P.B. Totipotency and the cell cycle / P.B. Gahan // *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits* (Eds. S. M. Jain, H. Häggman). – The Netherlands: Springer, 2007. – P. 3-14.

Gamborg, O.L. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley / O.L. Gamborg, D.E. Eveleigh // *Can. J. Biochem.* – 1968. – Vol. 46, № 5. – P. 417-421.

Gao, S.L. Organ culture of a precious Chinese medicinal plant – *Fritillaria unibracteata* / S.L. Gao, D.N. Zhu, Z.H. Cai, Y. Jiang, D.R. Xu // *Plant Cell Tiss Org Cult.* – 1999. – Vol. 59. – P. 197-201.

Garay-Arroyo, A. Hormone symphony during root growth and development / A. Garay-Arroyo, M. De La Paz Sanchez, B. Garcira-Ponce, E. Azpeitia, E.R. Álvarez Buylla // *Developmental dynamics*. – 2012. – Vol. 241. – P. 1867-1885.

Geneve, R. Propagation from nonmeristematic tissues – organogenesis / R. Geneve // *Plant tissue culture, development and biotechnology* (Eds. R.N. Trigiano, D.J. Gray). – London: CRC Press LCC, 2011. – P. 245-259.

Gibson, S. Control of plant development and gene expression by sugar signaling / S. Gibson // *Plant Biol.* – 2005. – Vol. 8. – P. 93-102.

Gill, R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from seedling cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) / R. Gill, K.A. Malik, M.H.M. Sanago, P.K. Saxena // *J Plant Physiol.* – 1998. – Vol. 147. – P. 273-276.

Gonzalez-Arno, M.T. Cryopreservation of ovules and somatic embryos of citrus using the encapsulation-dehydration technique / M.T. Gonzalez-Arno, J. Juarez, C. Ortega, L. Navarro, N. Duran-Vila // *Cryo Lett.* – 2003. – Vol. 24, № 2. – P. 85-94.

Gray, D.J. Somatic embryogenesis and cell culture in the Poaceae / D.J. Gray // *Biotechnology in tall fescue improvement*. (Ed. M.J. Kasperbauer). – Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. – P. 25-57.

Grout, B.W.W. Meristem-tip culture for propagation and virus elimination / B.W.W. Grout // *Plant Cell Culture Protocols* (Ed. R.D. Hall). – Totowa: Humana Press Inc. – 1990. – P. 115-125.

Haensch, K.T. Morpho-histological study of somatic embryolike structures in hypocotyls cultures of *Pelargonium×hortorum* Bailey / K.T. Haensch // *Plant Cell Rep.* – 2004. – Vol. 22. – P. 376-381.

Hamilton, M.B. *Ex situ* conservation of wild plant species: time to reassess the genetic assumptions and implications of seed banks / M.B. Hamilton // *Conserv. Biol.* – 1994. – Vol. 8. – P. 39-49.

Hassan, M.N. An efficient protocol for somatic embryogenesis of garlic (*Allium sativum* L.) using root tip as explants / M.N. Hassan, M.S. Haque, M.M. Hassan // *J. Bangladesh Agril. Univ.* – 2014. – Vol. 12(1). – P. 1-6.

Hazarika, B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants / B.N. Hazarika // *Sci Hortic.* – 2006. – Vol. 108. – P. 105-120.

Hicks, G.S. Patterns of organ development in tissue culture and the problem of organ determination / G.S. Hicks // *The Botanical Review*, Vol. 46. (Ed. A. Cronquist). – New York: New York Botanical Garden, 1980. – P. 1-23.

Hicks, G.S. Shoot induction and organogenesis *in vitro*: a developmental perspective / G.S. Hicks // *In Vitro Cell Dev Biol – Plant*. 1994. – Vol. 30 (1). – P. 10-15.

Hochedlinger, K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency / K. Hochedlinger, K. Plath // *Development*. – 2009. – Vol. 136(4). – P. 509-523.

Hosseini, R. Somatic embryogenesis and bulblet production in *Narcissus papyraceus* cv. Shirazi: effect of plant growth regulators, light intensity, sucrose concentration, methyl jasmonate and anti-gibberellins / R. Hosseini, M. Moradnejad, E. Nezami-Alanagh, S. Ashraf, F. Ghane-Golmohammadi // *Iranian journal of genetics and plant breeding*. – 2013. – Vol. 2, № 1. – P. 27-34.

Howell, S.H. Cytokinins and shoot development / S.H. Howell, S. Lall, P. Che // *Trends Plant Sci.* – 2003. – Vol. 8. – P. 453-459.

Husain, M.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Pterocarpus marsupium* Roxb. / M.K. Husain, M. Anis, A. Shahzad // *Trees*. – 2010. – Vol. 24. – P. 781-787.

Hussey, G. Totipotency in tissue explants and callus of some members of the Liliaceae, Iridaceae, and Amaryllidaceae / G. Hussey // *J Exp Bot.* – 1975. – Vol. 26. – P. 253-262.

Iapichino, G. Adventitious shoot production from a vireya hybrid of rhododendron / G.Iapichino, T.H. Chen, L.H. Fuchigami // *Hort. Sci.* – 1991. – Vol. 26. – P. 594-596.

Ikeda, Y. Local auxin biosynthesis modulates gradient-directed planar polarity in *Arabidopsis* / Y. Ikeda, S. Men, U. Fischer, A. N. Stepanova, J.M. Alonso, K. Ljung, M. Grebe // *Nat Cell Biol.* – 2009. – Vol. 11. – P. 731-738.

Jevremović, S. Superoxide dismutase activity and isoenzyme profiles in bulbs of snake's head fritillary in response to cold treatment / S. Jevremović, M. Petrić, S. Zivković, M. Trifunović, A. Subotić // Arch. Biol. Sci., Belgrade. – 2010. – Vol. 62 (3) . – P. 553-558.

Jimenez, V.M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis / V.M. Jimenez // Plant Growth Regulation. – 2005. – Vol. 47. – P. 91-110.

Jimenez, V.M. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and nonembryogenic cultures of carrot / V.M. Jimenez, F. Bangerth // Physiol Plant. – 2001. – Vol. 111. – P. 389-395.

Jin, S. Direct and indirect shoot and bulblet regeneration from cultured leaf explants of *Lilium pumilum*, an endangered species / S. Jin, J. Wang, X. Wang, D. Sun, G. Li, A.D. Genovesi, S. Liu // In Vitro Cell Dev Biol. – 2014. – Vol. 50, Is 1. – P. 69-75.

Joshi, S.K. *In vitro* bulblet regeneration and evaluation of *Fritillaria roylei* Hook. – a high value medicinal herb of the Himalaya / S.K. Joshi, U. Dhar, H.C. Andola // Acta Hortic. – 2007. – Vol. 756. – P. 75-84.

Joshi, S.K. *In vitro* propagation from axenic explants of *Lilium oxypetalum* (D. Don) Baker, an endemic bulbous plant of high altitude Himalaya / S.K. Joshi, U. Dhar // Acta Physiol Plant. – 2009. – Vol. 31. – P. 833–838; 2009.

Kamenetsky, R. Water status and carbohydrate pools in tulip bulbs during dormancy release / R. Kamenetsky, H. Zemah, A.P. Ranwala, F. Vergeldt, N.K. Ranwala, W.B. Miller, H. Van As, P. Bendel // New Phytol. – 2003. – Vol. 158. – P. 109-118.

Kane, M.E. Shoot culture procedures / M.E. Kane // Plant development and biotechnology (Eds. R.N. Trigiano, D.J. Gray). – Boca Raton, Florida: CRC Press LCC, 2005. – P. 145-158.

Karamian, R. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in four species of *Crocus* / R. Karamian // Acta Hortic. – 2004. – Vol. 650. – P. 253-259.

Karamian, R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplast culture of *Crocus pallasii* subsp. *Hausknechtii* / R. Karamian // Pak J Biol Sci. – 2007. – Vol. 10. – P. 659-663.

Karamian, R. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from protoplast culture of *Muscari neglectum* Guss. / R. Karamian, M. Ranjbar // Afr J Biotechnol. – 2010. – Vol. 10. – P. 4602-4607.

Keller, J. Influence of different temperature treatments on viability of *in vitro* cultivated *Allium* shoots and bulblets / J. Keller // Acta Hort. – 1992. – Vol. 319. – P. 307-312.

Khawar, K.M. Mass proliferation of madonna lily (*Lilium candidum* L.) under *in vitro* conditions / K.M. Khawar, S. Cocu, I. Parmaksiz, E.O. Sarihan, S. Ozcan // Pak J Bot. – 2005. – Vol. 37 (2). – P. 243-248.

Kieber, J.J. Cytokinins / J.J. Kieber, G.E. Schaller // The Arabidopsis Book. – 2014. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3894907/>.

Kim, K. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells / K. Kim, A. Doi, B. Wen, K. Ng, R. Zhao, P. Cahan, J. Kim, M.J. Aryee, H. Ji, L.I. Ehrlich, A. Yabuuchi, A. Takeuchi, K.C. Cunniff, H. Hongguang, S. Mckinney-Freeman, O. Naveiras, T.J. Yoon, R.A. Irizarry, N. Jung, J. Seita, J. Hanna, P. Murakami, R. Jaenisch, R. Weissleder, S.H. Orkin, I.L. Weissman, A.P. Feinberg, G.Q. Daley // Nature. – 2010. – Vol. 467. – P. 285-293.

Kim, Y.-J. *In vitro* propagation of hyacinth / Y.-J. Kim, P.M. Hasegawa, R.A. Bressan // Hort Science. – 1981. – Vol. 16. – P. 645-647.

Kim, M.S. Efficient plantlet regeneration via callus formation from leaf segment of *Lilium* oriental hybrid «Casa blanca» / M.S. Kim, J.H. Jeon, J.W. Youm, J.H. Kim, B.C. Lee, W.J. Kang, H.S. Kim, H. Joung // J Plant Biotech. – 2005. – Vol. 7. – P. 129-134.

Kim, J.B. Efficient somatic embryogenesis in *Alstroemeria* / J.B. Kim, C.J.J.M. Raemakers, E. Jacobsen, R.G.F. Visser // Plant Cell Tiss Org Cult. – 2006. – Vol. 86. – P. 233-238.

Komamine, A. Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures – morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology / A. Komamine, N. Murata, K. Nomura // *In vitro Cell Dev Biol – Plant.* – 2005. – Vol. 41. – P. 6-10.

Komatsu, Y.H. *In vitro* morphogenic response of leaf sheath of *Phyllostachys bambusoides*. / Y.H. Komatsu, K.D. Batagin-Piotto, G.E. Brondani, A.N. Goncalves, M. Almeida // *Journal of Forestry Research.* – 2011. – Vol. 22 (2) . – P. 209-215.

Kukulczanka, K. Propagation of *Fritillaria meleagris* L. through tissue culture / K. Kukulczanka, K. Kromer, B. Czastka // *Acta Hort.* – 1989. – Vol. 251. – P. 147-153.

Kumar, A. Factors affecting *in vitro* formation of cormlets in *Gladiolus hybridus* Hort. and their field performance / A. Kumar, L.M.S. Palni, A. Sood // *Acta Physiol Plant.* – 2011. – Vol. 33. – P. 509-515.

Langens-Gerrits, M.M. Development of dormancy in different lily genotypes regenerated *in vitro* / M.M. Langens-Gerrits, S. Nashimoto, A.F. Croes, G.J. De Klerk // *Plant Growth Regul.* – 2001. – Vol. 34 – Vol.215-222.

Langens-Gerrits, M.M. Effect of low temperature on dormancy breaking and growth after planting in lily bulblets regenerated *in vitro* / M.M. Langens-Gerrits, W.B.M. Miller, A.F. Croes, G.J. De Klerk // *Plant Growth Regulation.* – 2003 a. – Vol. 40. – P. 267-275.

Langens-Gerrits, M.M. Phase change in lily bulblets regenerated *in vitro* / M.M. Langens-Gerrits, G.J. De Klerk, A. Croes // *Physiol Plantarum.* – 2003 б. – Vol. 119. – P. 590-597.

Laslo, V. *In vitro* conservation of certain endangered and rare species of romanian spontaneous flora / V. Laslo, M. Zăpârțan, E. Agud // *Analele Universității din Oradea, Fascicula Protecția Mediului.* – 2011. – Vol. XVI. – P. 252-261.

Law, D.M. Comparative indole-3-acetic acid levels in the slender pea and other pea phenotypes / D.M. Law, P.J. Davies // *Plant Physiol.* – 1990. – Vol. 93. – P. 1539-1543.

Lee, T. High frequency shoot regeneration from leaf disc explants of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* L.) *in vitro* / T. Lee, M.E.E. Huang, E.C. Pua // Plant Sci. – 1997. – Vol. 126. – P. 219-226.

Leung, D.W.M. Plant biotechnology helps quest for sustainability: With emphasis on climate change and endangered plants / D.W.M. Leung // Climate change and sustainable development (Ed. R. Reck). – Louisville: Linton Atlantic Books, 2010. – P. 247-250.

Lian, M.L. Bulblet formation from bulb scale segment of *Lilium* using bioreactor system / M.L. Lian, D. Chakrabarty, K.Y. Paek // Biologia plantarum. – 2003. – Vol. 46 (2). – P. 199-203.

Lim, K.-B. Influence of genotype, explant source, and gelling agent on *in vitro* shoot regeneration of *Chrysanthemum* / K.-B. Lim, S.J. Kwon, S.I. Lee // Hort. Environ. Biotechnol. – 2012. – Vol. 53 (4). – P. 329-335.

Lin, G. Chromatographic analysis of *Fritillaria* isosteroidal alkaloids, the active ingredients of Beimu, the antitussive traditional Chinese medicinal herb / G. Lin, P. Li, S.-L. Li, S.-W. Chan // Journal of Chromatography A. – 2001. – Vol. 935. – P. 321-338.

Liu, X.M. Adventitious shoot regeneration of oriental lily (*Lilium orientalis*) and genetic stability evaluation based on ISSR marker variation / X.M. Liu, G.C. Yang // In Vitro Cell Dev Biol – Plant. – 2012. – Vol. 48. – P. 172-179.

Lombardi, S.P. *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* / S.P. Lombardi, I.R.S. Passos, M.C.S. Nogueira, B. Appezato-da Gloria // Mast. Braz Arch Biol Biotechnol. – 2007. – Vol. 50. – P. 239-247.

Loskutov, A.V. Optimization of *in vitro* conditions for stigma-like-structure production from half-ovary explants of *Crocus sativus* L. / A.V. Loskutov, C.W. Beninger, T.M. Ball, G.L. Hosfield, M. Nair, K.C. Sink // In vitro Cell Dev Biol – Plant. – 1999. – Vol. 35. – P. 200-205.

Luciani, G.F. Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration / G.F. Luciani, A.K. Mary, C. Pellegrini, N.R. Curvetto // Plant Cell Tissue Org Cult. – 2006. – Vol. 87. – P. 139-143.

Lukaszewska, J. ABA contents and the regeneration ability of *Fritillaria imperialis* L. cultured *in vitro* / J. Lukaszewska, M. Witomska, J. Bianco, P. Barthe // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 1998. – Vol. 20, № 3. – P. 241-244.

Magyar-Tabori, K. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple / K. Magyar-Tabori, J. Dobranszki, J.A. Teixeira da Silva, S.M. Bulley, I. Hudak // *Plant Cell Tiss Org Cult*. – 2010. – Vol. 101. – P. 251-267.

Majourhay, K. Enhanced plantlet regeneration from cultured meristems in sprouting buds of saffron corms / K. Majourhay, J.A. Fernandez, P. Martinez-Gomez, A. Piqueras // *Acta Hortic*. – 2007. – Vol. 739. – P. 275-278.

Malik, M. Comparison of different liquid/solid culture systems in the production of somatic embryos from *Narcissus* L. ovary explants / M. Malik // *Plant Cell Tiss Org Cult*. – 2008. – Vol. 94. – P. 337-345.

Marinangeli, P. Micropropagation of onion (*Allium cepa* L.) from immature inflorescences / P. Marinangeli // *Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plant. Methods of molecular biology*, vol. 11013 (Eds. M. Lambardi, E.A. Ozudogru, S.M. Jain). – NY: Springer Science, 2013. – P. 319-327.

Marinangeli, P.A. Increased sucrose and salt concentrations in the culture medium improve growth of micropropagated *Lilium* bulblets / P.A. Marinangeli, N.R. Curvetto // *Biocell*. – 1997. – Vol. 21(2). – P. 161-164.

Marinangeli, P.A. Bulblet differentiation after scale propagation of *Lilium longiflorum* / P.A. Marinangeli, L.F. Hernandez, C.P. Pellegrini, N.R. Curvetto // *J Amer Soc Hort Sci*. – 2003. – Vol. 128(3). – P. 324-329.

Marinangeli, P. Callus induction and plant regeneration in onion (*Allium cepa* L.) / P. Marinangeli, D. Zappacosta, C. Galmarini, N. Curvetto // *Acta Hortic*. – 2005. – Vol. 688. – P. 301-308.

Maślanka, M. Induction of bulb organogenesis in *in vitro* cultures of tarda tulip (*Tulipa tarda* Stapf.) from seed-derived explants / M. Maślanka, A. Bach // *In Vitro Cell Dev Biol – Plant*. – 2014. – Vol. 50. – P. 712-721.

Matsuda, Y. Plant regeneration via embryogenesis in commercial cultivars of Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottl.) / Y. Matsuda, T. Adachi // Plant Sci. – 1996. – Vol. 119. – P. 149-156.

Matsumoto, T. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of lily by vitrification / T. Matsumoto, A. Sakai, K. Yamada // Plant Cell Tiss Org Cult. – 1995. – Vol. 41. – P. 237-241.

Maxted, N. Complementary conservation strategies / N. Maxted, B.V. Ford-Lloyd, J.G. Hawkes // Plant genetic conservation. The *in situ* approach. (Eds. N. Maxted, B.V. Ford-Lloyd, J.G. Hawkes). – London: Chapman, 1997. – P. 15-41.

Metwally, E.I. *In vitro* propagation of garlic (*Allium sativum* L.) through adventitious shoot organogenesis / E.I. Metwally, M.E. El-Denary, Y.H. Dewir, Y. Naidoo // Afr J Biotech. – 2014. – Vol. 13(38). – P. 3892-3900.

Miller, W.B.M. Low temperatures alters carbohydrate metabolism in Easter lily bulbs / W.B.M. Miller, R.W. Langhans // Hort Sci. – 1990. – Vol. 25. – P. 463-465.

Mirici, S. Efficient *in vitro* bulblet regeneration from immature embryos of endangered *Sternbergia fischeriana* / S. Mirici, I. Parmaks, S. Ozcan, C. Sancak, S. Uranbey, E.O. Sarhan, A. Gumuscu, B. Gurbuz, N. Arslan // Plant Cell Tiss Org Cult. – 2005. – Vol. 80. – P. 239-246.

Mohammadi-Dehcheshmeh, M. Indirect somatic embryogenesis from petal explants of endangered wild population of *Fritillaria imperialis* / M. Mohammadi-Dehcheshmeh, A. Khalighi, R. Naderi, E. Ebrahimie M. Sardari // Pac J Biol Sci. – 2007. – Vol. 10 (11). – P. 1875-1879.

Mohammadi-Dehcheshmeh, M. Petal: a reliable explant for direct bulblet regeneration of endangered wild populations of *Fritillaria imperialis* L. / M. Mohammadi-Dehcheshmeh, A. Khalighi, R. Naderi, M. Sardari, E. Ebrahimie // Acta Physiol Plant. – 2008. – Vol. 30. – P. 395-399.

Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.

Namin, M.H. Initiation and origin of stigma-like structures (SLS) on ovary and style explants of saffron in tissue culture / M.H. Namin, H. Ebrahimzadeh, B. Ghareyazie, T. Radjabian, H.H. Namin // *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. – 2010. – Vol. 52/1. – P. 55-60.

Nasircilar, A.G. *In vitro* propagation of endemic and endangered *Muscari mirum* from different explant types / A.G. Nasircilar, S. Mirici, Ö. Karagüzel, Ö. Eren, İ. Baktir // *Turk J Bot.* – 2011. – Vol. 35. – P. 37-43.

Nhut, D.T. The control of *in vitro* direct main stem formation of *Lilium longiflorum* derived from receptacle culture, and rapid propagation by using *in vitro* stem nodes / D.T. Nhut // *Plant Growth Regul.* – 2003. – Vol. 40. – P. 179-184.

Nhut, D.T. Somatic embryogenesis through pseudo-bulblet transverse thin cell layer of *Lilium longiflorum* / D.T. Nhut, V.L. Bui, N.T. Minh, J.A. Teixeira da Silva, S. Fukai, M. Tanaka, K. Tran Thanh Van // *Plant Growth Regul.* – 2002 a. – Vol. 37. – P. 193-198.

Nhut, D.T. The changes in shoot regeneration potential of protocorm-like bodies derived from *Lilium longiflorum* young stem explants exposed to medium volume, pH, light intensity and sucrose concentration pretreatment / D.T. Nhut, N.T.D. Huong, V.B. Le, J.A. Teixeira da Silva, S. Fukai, M. Tanaka // *J Hortic Sci Biotechnol.* – 2002 б. – Vol. 77. – P. 79-82.

Nhut, D.T. Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture / D.T. Nhut, B.V. Le, S. Fukai, M. Tanaka, K. Tran Thanh Van // *Plant Growth Regul.* – 2001. – Vol. 33. – P. 59-65.

Niimi, Y. *In vitro* bulblet formation from leaf segments of lilies, especially *Lilium rubellum* Baker. / Y. Niimi, T. Onozawa // *Sci Hortic.* – 1979. – Vol. 11 (4). – P. 379-389.

Nikolić, M. *In vitro* formation of somatic embryos and bulblets of *Fritillaria meleagris* / M. Nikolić, L. Radojević, S. Jevremović, M. Trifunović, A. Subotić // *Plant, fungal and habitats diversity investigation and conservation (Book of Abstracts of IV Balkan Botanical Congress)*. – Sofia: Institute of Botany, 2006. – P. 136.

Otani, M. Micropropagation of *Fritillaria camtschaticensis* (L.) Ker-Gawl., “Kuroyuri”/ M. Otani, T. Shimada // Bull. RIAR, Ishikawa Agr. Coll. – 1997. – № 5. – P. 39-44.

Özcan, S. Efficient *in vitro* bulblet regeneration from immature embryos of endemic and endangered geophyte species in *Sternbergia*, *Muscari* and *Fritillaria* genera / S. Özcan, I. Parmaksız, S. Mirici, S. Cocu, S. Uranbey, A. Ipek, C. Sancak, E.O. Sarihan, B. Gurbuz, C.S. Sevimay, N. Arslan // Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond (Eds. Z. Xu, J. Li, Y. Xue, W. Yang). – Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2007. – P. 381-383.

Paek, K.Y. High frequency of bulblet regeneration from bulb scale sections of *Fritillaria thunbergii* / K.Y. Paek, H.N. Murthy // Plant Cell Tiss Org Cult. – 2002. – Vol. 68. – P. 247-252.

Paek, K.Y. Several factors affecting bulblet regeneration from the culture of scale segment and node-bud in fritillary as medicinal bulbous plant / K.Y. Paek, N.S. Sung, C.H. Park // Acta Hort. – 1996. – Vol. 440. – P. 499-503.

Paek, K.Y. Micropropagation through stem, node-buds, shoot tip and bulblet scale culture in *Fritillaria thunbergii* Miq. / K.Y. Paek, K.J. Yu, N.S. Sung, I.S. Choi, J.T. Cho // Korean Journal of medicinal science. – 1994. – Vol. 2. – P. 154-161.

Parić, A. Induction of bulblets on leaf and bulb explants of endangered *Lilium bosniacum* (G. Beck) G. Beck ex Fritsch / A. Parić, J. Cakar, E. Muratovic, E. Karalija // Botanica Serbica. – 2011. – Vol. 35 (1). – P. 31-35.

Paunescu, A. Biotechnology for endangered plant conservation: A critical overview / A. Paunescu // Rom. Biotech. Lett. – 2009. – Vol. 14. – P. 4095-4103.

Pence, V.C. Controlling contamination during *in vitro* collecting / V.C. Pence, J.A. Sandoval // *In vitro* collecting techniques for germplasm conservation (Eds. V.C. Pence, J.A. Sandoval, V.M. Villalobos, F. Engelman). – Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute, 2002. – P. 30-40.

Petersson, S.V. An auxin gradient and maximum in the Arabidopsis root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis / S.V. Petersson, A.I. Johansson, M. Kowalczyk, A. Makoveychuk, J.Y. Wang, T. Moritz, M.

Grebe, P.N. Benfey, G. Sandberg, K. Ljung // *Plant Cell*. – 2009. – Vol. 21. – P. 1659-1668.

Petrić, M. The effect of low temperature and GA treatments on dormancy breaking and activity of antioxidant enzymes in *Fritillaria meleagris* bulblets cultured *in vitro* / M. Petrić, S. Jevremović, M. Trifunović, V. Tadic, S. Milosevic, M. Dragicevic, A. Subotić // *Acta Physiol Plant*. – 2013. – Vol.35. – P. 3223-3236.

Petrić, M, Somatic embryogenesis and bulblet regeneration in snakehead fritillary (*Fritillaria meleagris* L.) / M. Petrić, A. Subotić, S. Jevremović, M. Trifunović // *Afr J Biotechnol*. – 2011. – Vol. 10. – P. 16181-16188.

Petrić, M. Morphogenesis *in vitro* of *Fritillaria* spp. / M. Petrić, A. Subotić, M. Trifunović, S. Jevremović // *Floriculture and Ornamental Biotechnology, Bulbous Ornamentals Vol. 6 (Special Iss 1)* (Eds. J.M. Van Tuyl, P. Arens). – London, UK: Global Science Books, 2012. – P. 78-89.

Phillips, C. Invited review: *In vitro* morphogenesis in plants – recent advances / C. Phillips // *In Vitro Cell Dev Biol – Plant*. – 2004. – Vol. 40. – P. 342-345.

Pierik, R.L.M. Rapid vegetative propagation of *Hyacinthus orientalis* L. *in vitro* / R.L.M. Pierik, A.J.M. Post // *Sci Hortic*. 1974. – Vol. 3 (3). – P. 293-297.

Pierik, R. Effects of auxins, cytokinins, gibberellins, abscisic acid, and ethephon on regeneration and growth of bulblets on excised bulb-scale segments of hyacinth / R. Pierik, A. Post // *Sci Hortic*. – 1975. – Vol. 3, № 3. – P. 293-297.

Plant development and biotechnology (Eds. R. N. Trigiano, D. J. Gray) – Boca Raton: CRC Press LLC, 2005. – P. 358.

Plant propagation by tissue culture. 3rd ed. Vol. 1. The background. (Eds. F. George, M.A. Hall, G.J. De Klerk). – Dordrecht, The Netherlands.: Springer, 2008. – P. 501.

Podwyszyńska, M. The mechanisms of *in vitro* storage organ formation in ornamental geophytes / M. Podwyszyńska // *Floriculture and ornamental biotechnology. Bulbous ornamentals. Vol. 6 (Special Iss 1)* (Eds. J.M. Van Tuyl, P. Arens). – London, UK: Global Science Books, 2012. – P. 9-23.

Podwyszyńska, M. Endogenous cytokinin dynamics in micropropagated tulips during bulb formation process influenced by TDZ and iP pretreatment / M. Podwyszyńska, O. Novak, K. Dolezal, M. Strnad // *Plant Cell Tiss Org Cult.* 2014. – Vol. 119, Iss. 2. – P. 331-346.

Prasad, V.S.S. *In vitro* shoot regeneration of gladiolus in semi-solid agar versus liquid cultures with support systems / V.S.S. Prasad, S. Dutta Gupta // *Plant Cell Tiss Org Cult.* – 2006. – Vol. 87. – P. 263-271.

Preece, J.E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? / J.E. Preece // *Plant Tiss Cult Biotechnol.* – 1995. – Vol. 1. – P. 26-37.

Ptak, A. Somatic embryogenesis in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) flower stem cultures / A. Ptak, A. Bach // *In Vitro Cell Dev Biol – Plant.* – 2007. – Vol. 43. – P. 35-39.

Quiroz-Figueroa, F.R. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea Arabica* / F.R. Quiroz-Figueroa, C.F.J. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera, V.M. Loyola-Vargas // *Plant Cell Rep.* – 2002. – Vol. 20. – P. 1141-1149.

Quiroz-Figueroa, F.R. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants / F.R. Quiroz-Figueroa, R. Rojas-Herrera, R.M. Galaz-Avalos, V.M. Loyola-Vargas // *Plant Cell Tiss Org Cult.* – 2006. – Vol. 86. – P. 285-301.

Raghavan, V. Developmental biology of flowering plants / V. Raghavan. – New York: Springer, 2000. – P. 354.

Rahimi, M. Propagation and bulb formation of *Fritillaria* (*Fritillaria imperialis* L.) via *in vitro* culture / M. Rahimi, M. H. Daneshvar, M. Heidari // *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences.* – 2014. – Vol. 4, Iss. 3. – P. 707-710.

Rahimi, M. *In vitro* micropropagation of *Fritillaria imperialis* L. through induction of indirect organogenesis / M. Rahimi, M.H. Daneshvar, M. Heidari, F. Yari // *International journal of agronomy and plant production.* – 2013. – Vol. 4 (3). – P. 418-424.

Raja, W. *In vitro* microcorm formation in saffron (*Crocus sativus* L.) / W. Raja, G. Zaffer, S.A. Wani // *Acta Hort.* – 2007. – Vol. 739. – P. 291-296.

Ramage, C.M. Mineral nutrition and plant morphogenesis / C.M. Ramage, R.R. Williams // *In Vitro Cell Dev Biol – Plant.* – 2002. – Vol. 38. – P. 116-124.

Rani, V. Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: A critical reappraisal / V. Rani, S.N. Raina // *In vitro Cell Dev Biol – Plant.* – 2000. – Vol. 36. – P. 319-330.

Rao, N.K. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology / N.K. Rao // *Afr J Biotech.* – 2004. – Vol. 3 (2). – P. 136-145.

Raven, J.A. The possible role of membrane electrophoresis in the polar transport of IAA and other solutes in plant tissue / J.A. Raven // *New Phytologist.* – 1979. – Vol. 82. – P. 285-291.

Reed, R.C. Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis* / R.C. Reed, S.R. Brady, G.K. Muday // *Plant Physiol.* – 1998. – Vol. 118. – P. 1369-1378.

Reed, B.M. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools / B.M. Reed, V. Sarasan, M. Kane, E. Bunn, V.C. Pence // *In Vitro Cell Dev Biol – Plant.* – 2011. – Vol. 47. – P. 1-4.

Remotti, P.C. Callus induction and plant regeneration from gladiolus / P.C. Remotti, H.J.M. Loffler // *Plant Cell Tiss Org Cult.* – 1995. – Vol. 42. – P. 171-178.

Rix, E.M., *Fritillaria* L. (Liliaceae) in Iran / E.M. Rix // *Iran J Bot* – 1997. – Vol. 1, №2. – P. 75-95.

Rix, E.M. *Fritillaria*. A Revised Classification / E.M. Rix // London, UK: The *Fritillaria* Group of the Alpine Garden Society, 2001. – P. 210.

Robb, S.M. The culture of excised tissue from bulb scales of *Lilium speciosum* Thunb / S.M. Robb // *J. Exp. Bot.* – 1957. – Vol. 8, № 7. – P. 348-352.

Roberts, E.H. Predicting the storage life of seeds / E.H. Roberts // *Seed Sci. Technol.* – 1973. – Vol. 1. – P. 499-514.

Robledo-Paz, A. Efficient plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by root-tip culture / A. Robledo-Paz, V.M. Villalobos-Arambula, A.E. Jofre-Garfias // *In Vitro Cell Dev Biol – Plant.* – 2000. – Vol. 36. – P. 416-419.

Rønsted, N. Molecular phylogenetic evidence for the monophyly of *Fritillaria* and *Lilium* (Liliaceae; Liliales) and the infrageneric classification of *Fritillaria* / N. Rønsted, S. Law, H. Thornton, M.F. Fay, M.W. Chase // *Molecular Phylogenetics and Evolution.* – 2005. – Vol. 35. – P. 509-527.

Saklani, A. Genus *Fritillaria* (Liliaceae): A review of its phytochemical and pharmacological perspectives / A. Saklani, M.R. Sahoo, S.K. Kutty // *Int. J. Res. Phytochem. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 1 (3). – P. 96-111.

Sangavai, C. *In vitro* propagation of a tuberose plant (*Polianthes tuberosa* L.) / C. Sangavai, P. Chellapandi // *Electronic Journal of Biology.* – 2008. – Vol. 4 (3). – P. 98-101.

Sarasan, V. Conservation *in vitro* of threatened plants – Progress in the past decade / V. Sarasan, R. Cripps, M.M. Ramsay, C. Atherton, M. McMichen, G. Prendergast, J.K. Rowntree // *In vitro Cell Dev Biol – Plant.* – 2006. – Vol. 42. – P. 206-214.

Sarma, K.S. *In vitro* production of stigma-like structures from stigma explants of *Crocus sativus* L. / K.S. Sarma, K. Maesato, T. Hara, Y. Sonoda // *J. Exp. Bot.* – 1990. – Vol. 41. – P. 745-748.

Schmidt, E.D.L. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos / E.D.L. Schmidt, F. Guzzo, M.A.J. Toonen, S.C. De Vries // *Development.* – 1997. – Vol. 124. – P. 2049-2062.

Schwarz, O.J. Propagation from nonmeristematic tissues: Organogenesis / O.J. Schwarz, A.R. Sharma, R.M. Beaty // *Plant development and biotechnology* (Eds. R. N. Trigiano, D. J. Gray) – Boca Raton: CRC Press LLC, 2005. – P. 159-172.

Seabrook, J.E.A. *In vitro* propagation and bulb formation of garlic / J.E.A. Seabrook // *Canadian journal of plant science.* – 1994. – Vol. 74 (1). – P. 155-158.

Selby, C. Adventitious root formation in hypocotyl cuttings of *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. – The influence of plant growth regulators / C. Selby, S.J. Kennedy, B.M.R. Harvey // *New Phytol.* – 1992. – Vol. 120. – P. 453-457.

Sellés, M. Callus induction, somatic embryogenesis and organogenesis in *Narcissus confusus*: correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids / M. Sellés, F. Viladomat, J. Bastida, C. Codina // *Plant Cell Rep.* – 1999. – Vol. 18. – P. 646-651.

Shibli, R.A. Cryopreservation of black iris (*Iris nigricans*) somatic embryos by encapsulation-dehydration / R.A. Shibli // *Cryo Lett.* – 2000. – Vol. 21, № 1. – P. 39-46.

Simmonds, J.A. Propagation of *Lilium* hybrids. I. Dependence of bulblet production on time of scale removal and growth substances / J.A. Simmonds, B.G. Cumming // *Sci Hortic.* – 1976. – Vol. 5 (1). – P. 77-83.

Sivanesan, I. *In vitro* shoot regeneration and microcorm development in *Crocus vernus* (L.) Hill / I. Sivanesan, S. Jana, B. Jeong // *Pak. J. Bot.* – 2014. – Vol. 46 (2). – P. 693-697.

Skoog, F. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro* / F. Skoog, C.O. Miller // *Symp. Soc. Exp. Biol.* – 1957. – Vol. 11. – P. 118-131.

Slabbert, M.M. Pretorius Adventitious *in vitro* plantlet formation from immature floral stems of *Crinum macowanii* / M.M. Slabbert, M.H. De Bruyn, D.I. Ferreira, J. Pretorius // *Plant Cell Tiss Org Cult.* – 1995. – Vol. 43. – P. 51-57.

Slabbert, M.M. *In vitro* production of *Lachenalia* / M.M. Slabbert, J.G. Niederwieser // *Plant Cell Rep.* – 1999. – Vol. 18. – P. 620-624.

Sokolov, V.E. Russian national biodiversity conservation programme / V.E. Sokolov, B.R. Striganova, Y.S. Reshetnikov, Û.I. Chernov, M.I. Shatunovsky // *Biology International.* – 1994. – № 28. – P. 29-32.

Song, J.Y. Efficiency of shoot regeneration from leaf, stem, petiole and petal explants of six cultivars of *Chrysanthemum morifolium* / J.Y. Song, N.S. Mattson, B.R. Jeong // *Plant Cell Tiss Org Cult.* – 2011. – Vol. 107. – P. 295-304.

Steward, F.C. Growth and organized development of cultured cells. II. Growth and division of freely suspended cells / F.C. Steward, M.O. Mapes, K. Hears // *Am. J. Bot.* – 1958. – Vol. 45. – P. 705-708.

Strnad, M. Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x Canadensis* Moench., cv. Robusta) / M. Strnad, J. Hanus, T. Vanek, M. Kaminek, J.A. Ballantine, B. Fussel, D.E. Hanke // *Phytochem.* – 1997. – Vol. 45. – P. 213-218.

Subotić, A. Induction of *in vitro* morphogenesis of spp. *Fritillaria* / A. Subotić, S. Jevremović, M. Nikolić, L. Radojević // 5th IVCHB Symposium. – 2004. – P. 101.

Subotić, A. Morpho-histological study of direct somatic embryogenesis in endangered species *Fritillaria meleagris* / A. Subotić, M. Trifunović, S. Jevremović, M. Petrić // *Biologia plantarum.* – 2010. – Vol. 54 (3). – P. 592-596.

Sun, C.S. Callus formation and organ formation in the tissue culture of *Fritillaria thunbergii* Miq. / C.S. Sun, C.C. Chu, D.Y. Wang // *Acta Bot. Sin.* – 1977. – Vol. 19. – P. 161-162.

Sun, C.S. *Fritillaria* spp. (Fritillary): *in vitro* culture and the regeneration of plants / C.S. Sun, D.Y. Wang // *Biotechnology in agriculture and forestry: medicinal and aromatic plants III*, Vol. 15 (Ed. Y.P.S. Bajaj). – Berlin: Springer, 1991. – P. 258-269.

Surki, A.A. Dormancy breaking of imperial crown seeds / A. A. Surki, M. Nazari // 2nd National Congress on Medicinal Plants (Tehran, 15-16 May 2013). – Iran, 2013. – P. 1144.

Suzuki, S. Organogenesis and somatic embryogenesis from callus cultures in *Muscari armeniacum* Leichtl. ex Bak. / S. Suzuki, M. Nakano // *In Vitro Cell Dev Biol – Plant.* – 2001. – Vol. 37. – P. 382-387.

Takayama, S. Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effects of various cultural conditions / S. Takayama, M. Misawa // *Physiol Plant.* – 1979. – Vol. 46. – P. 184-190.

Takayama, S. Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effects of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on

differentiation and scale leaf formation *in vitro* / S. Takayama, M. Misawa // Hort. Sci. – 1980. – Vol. 48, № 3. – P. 121-125.

Tanaka, K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) / K. Tanaka, Y. Kanno, S. Kudo, M. Suzuki // Plant Cell Rep. – 2000. – Vol. 19. – P. 946-953.

Tandon, P. Prospects of plant conservation biotechnology in India with special reference to northeastern region / P. Tandon, S. Kumaria // Biodiversity: Status and Prospects (Eds. P. Tandon, M. Sharma, R. Swarup). – New Delhi, India: Norasa Publishing House, 2005. – P. 79-91.

Tekşen, M. The revision of the genus *Fritillaria* L. (Liliaceae) in the Mediterranean region (Turkey) / M. Tekşen, Z. Aytaç // Turk J Bot. – 2011. – Vol. 35. – P. 447-478.

Thomas, T. Advances in mulberry tissue culture / T. Thomas // J Plant Biol. – 2003. – Vol. 45. – P. 7-21.

Thomas, T.L. Gene expression during plant embryogenesis and germination: An overview / T.L. Thomas // Plant Cell. – 1993. – Vol. 5. – P. 1401-1410.

Thomas, W. Protoplast regeneration and stem embryogenesis of haploid androgenic rape / W. Thomas, F. Hoffmann, I. Potrykus, G. Wenzel // Mol. Gen. Genet. – 1976. – Vol. 145. – P. 245-247.

Tribulato, A. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Lilium longiflorum* Thunb. / A. Tribulato, P.C. Remotti, H.J.M. Loffler, J.M. Van Tuyl // Plant Cell Reports. – 1997. – Vol. 17. – P. 113-118.

Turrill, W.B. Studies in the genus *Fritillaria* (Liliaceae) / W.B. Turrill, J.R. Sealy // Hookers Icones Plantarum. – 1980. – Vol. 39. – P. 1-2.

Uranbey, S. *In vitro* bulblet induction from bulb scales of endangered ornamental plant *Muscari azureum* / S. Uranbey, A. Ipek, M. Caliskan, E. Dundar, S. Cocu, D. Basalma, H. Guneylioglu // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2010. – Vol. 24:2. – P. 1843-1848.

Van Staden, J. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists / J. Van Staden, E. Zazimalova, E.F. George // Plant propagation by tissue

culture. 3rd ed. Vol. 1. The background. (Eds. E.F. George, M.A. Hall, G.J. De Klerk). – Dordrecht, Netherlands: Springer, 2008. – P. 205-226.

Varshney, A. Trees: propagation and conservation. Biotechnological approaches for propagation of a multipurpose tree, *Balanites aegyptiaca* Del. / A. Varshney, M. Anis – New Delhi: Springer, 2014. – P. 116.

Varshney, A. A protocol for *in vitro* mass propagation of Asiatic hybrids of lily through liquid stationary culture / A. Varshney, V. Dhawan, P.S. Srivastava // *In Vitro Cell Dev Biol – Plant.* – 2000. – Vol. 36. – P. 383-391.

Varshney, A. Establishment of genetic fidelity of *in vitro*-raised *Lilium* bulblets through RAPD markers / A. Varshney, M. Lakshmikumaran, P.S. Srivastava, V. Dhawan // *In Vitro Cell Dev Biol – Plant.* – 2001. – Vol. 37. – P. 227-231.

Vasudevan, R. Cytokinin and explant types influence *in vitro* plant regeneration of Leopard Orchid (*Ansellia africana* Lindl.) / R. Vasudevan, J. Van Staden // *Plant Cell Tiss Org Cult.* – 2011. – Vol. 107. – P. 123-129.

Verdeil, J.L. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? / J.L. Verdeil, L. Alemanno, N. Niemenak, T.J. Tranbarger // *Trends in Plant Science.* – 2007. – Vol. 12 (6). – P. 245-252.

Vishnevetsky, J. Enhanced bud and bulblet regeneration from bulbs of *Nerine sarniensis* cultured *in vitro* / J. Vishnevetsky, E. Zamski, M. Ziv // *Plant Cell Rep.* – 2003. – Vol. 21. – P. 645-650.

Wajaht, A.S. Antiproliferative and antioxidant potential of different extracts of *Fritillaria roylei* / A.S. Wajaht, A.M. Tufael, A. Ajaz // *World J Pharm Sci.* – 2014. – Vol. 2(4). – P. 386-389.

Wang, H.P. Regeneration induction of *Fritillaria przewalskii* bulbs with different phytohormones composition *in vitro* / H.P. Wang, L. An, Y. Chen, Q. Hou, R. Huang // *Journal of Gansu agriculture university.* – 2009. – Vol. 44 (3). – P. 50-52.

Wang, Q.C. Cryotherapy of shoot tips: Novel pathogen eradication method / Q.C. Wang, J.P.T. Valkonen // *Trends Plant Sci.* – 2009. – Vol. 14. – P. 199-122.

Werbrouck, S.P.O. Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? / S.P.O. Werbrouck, M. Strnad, H.A. Van Onckelen, P.C. Debergh // *Physiol Plant*. – 1996. – Vol. 98. – P. 291-297.

Williams, E.G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group / E.G. Williams, G. Maheswaran // *Ann Bot*. – 1986. – Vol. 57. – P. 443-462.

Woo, S.M. Morphological and histological evaluations of *in vitro* regeneration in *Elliottia racemosa* leaf explants induced on media with thidiazuron / S.M. Woo, H.Y. Wetzstein // *Journal of the American Society for Horticultural Science*. – 2008. – Vol. 133, №. 2. – P. 167-172.

Wuka, T.P. Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae) / T.P. Wuka, M. Hamerska, M. Wróblewska // *Plant Cell Tiss Org Cult*. – 2006. – Vol. 87. – P. 27-32.

Xu, L.F. Plant regeneration from *in vitro* cultured leaves of Lanzhou lily (*Lilium davidii* var. *unicolor*) / L.F. Xu, F.W. Ma, D. Liang // *Sci Hortic*. – 2009. – Vol. 119. – P. 458-461.

Yan, M.-M. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*) / M.-M. Yan, C. Xu, C.-H. Kim, Y.-C. Um, A.A. Bah, D.-P. Guo // *Sci Hortic*. – 2009. – Vol. 123 (1). – P. 124-128.

Yancheva, S.D. Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during *in vitro* organogenesis in apple / S.D. Yancheva, S. Golubowicz, E. Fisher, S. Lev-Yadun, M.A. Flaishman // *Plant Sci*. – 2003. – Vol. 165. – P. 299-309.

Yi, Y.B. Protein variation and efficient *in vitro* culture of scale segments from *Hyacinthus orientalis* L. cv. Carnegie / Y.B. Yi, K.S. Lee, C.H. Chung // *Sci Hortic*. – 2002. – Vol. 92. – P. 367-374.

Yin, Z.-F. Direct shoot regeneration from basal leaf segments of *Lilium* and assessment of genetic stability in regenerants by ISSR and AFLP markers / Z.-F. Yin,

B. Zhao, W.-L. Bi, L. Chen, Q.-C. Wang // *In Vitro Cell Dev Biol – Plant.* – 2013. – Vol. 49. – P. 333-342.

Yucesan, B.B. Somatic embryogenesis and encapsulation of immature bulblets of an ornamental species, grape hyacinths (*Muscari armeniacum* Leichtlin ex Baker) / B.B. Yucesan, F. Cicek, E. Gurel // *Turk J Agric For.* – 2014. – Vol. 38. – P. 716-722.

Zamora, B. Shoot culture and plant regeneration in benquet lily (*Lilium philippinensis*) / B. Zamora, S.S. Gruezo // *Philipp. J. Crop. Sci.* – 1999. – Vol. 24 (2.3). – P. 85-89.

Zdravković-Korać, S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from root sections of *Allium schoenoprasum* L. / S. Zdravković-Korać, J. Milojević, L. Tubić, D. Čalić-Dragosavac, N. Mitić, B. Vinterhalter // *Plant Cell Tiss Org Cult.* – 2010. – Vol. 101. – P. 237-244.

Zhang, Y.J. A Preliminary Study on the Ecological Characteristics and Germinating Law of the Seeds of *Fritillaria yuzhongensis* in the Maxian Mountain Region of Gansu Province / Y.J. Zhang, H.-M. Wang, R.-L. Zhou // *Acta Biologica Sinica.* – 1992. – Vol. 12(2). – P. 155-160.

Zhang, Y.J. Changes in carbohydrate metabolism and bulb growth as induced by low-temperature release of dormancy in lily bulbs / Y.J. Zhang, Z.K. Xie, Y.J. Wang, L.P. An // *Philipp Agric Scientist.* – 2011. – Vol. 94, № 2. – P. 149-154.

Zheng, S. Factors influencing induction, propagation and regeneration of mature zygotic embryo-derived callus from *Allium cepa* / S. Zheng, B. Henken, E. Sofiari, E. Jacobsen, F.A. Krens, C. Kik // *Plant Cell Tiss Org Cult.* – 1998. – Vol. 53. – P. 99-105.

Ziv, M. The contribution of biotechnology to breeding, propagation and disease resistance in geophytes / M. Ziv // *Acta Hortic.* – 1997. – Vol. 430. – P. 247-258.

Ziv, M. Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes *in vitro* / M. Ziv, H. Lilien-Kipnis // *Plant Cell Rep.* – 2000. – Vol. 19. – P. 845-850.

Ziv, M. Flowering of geophytes *in vitro* / M. Ziv, V. Naor // *Propagation of Ornamental Plants.* – 2006. – Vol. 6, № 1. – P. 3-16.