

УДК 581.143.6

РЕГЕНЕРАЦИЯ ЭНДЕМИЧНОГО ВИДА *FRITILLARIA SONNIKOVAE* ИЗ ЛУКОВИЧНЫХ ЧЕШУЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

© 2015 г. Д. С. Кульханова, А. А. Эрст, Т. И. Новикова

Центральный Сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН,

630090 Новосибирск, ул. Золотогорная, д. 101

E-mail: dinarakulkhanova@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.05.2014 г.

Окончательный вариант получен 21.01.2015 г.

Исследованы особенности регенерации *Fritillaria sonnikovae* из луковичных чешуй в культуре *in vitro*. Инициация побегообразования была получена на питательной среде BDS, дополненной 5 мкМ 6-бензиламинопурина и 2 мкМ α -нафтилуксусной кислоты. Оптимизацию стадии собственно размножения проводили с использованием в качестве эксплантов полученных микролуковичек. Высокий регенерационный ответ эксплантов и коэффициент размножения наблюдали как на средах, содержащих регуляторы роста (до 47% и 4.2 ± 0.6 шт./экспл. соответственно), так и на безгормональной питательной среде (48% и 4.1 ± 0.2 шт./экспл. соответственно). Установлено, что внесение регуляторов роста на этапе культивирования не вызывает усиления морфогенного ответа, но способствует ускоренному заложению и развитию микролуковичек. Морфо-гистологический анализ позволил выявить динамику формирования побегов *de novo*. Развитие *F. sonnikovae* в культуре *in vitro* идет по пути прямого органогенеза из эпидермальных тканей экспланта.

Ключевые слова: *Fritillaria sonnikovae*, регенерация *in vitro*, морфо-гистологический анализ, луковичные чешуи, сохранение биоразнообразия.

DOI: 10.7868/S0475145015040059

ВВЕДЕНИЕ

Рябчик Сонниковой (*Fritillaria sonnikovae* Schau et A. Erst, сем. Liliaceae), эндемик гор Южной Сибири, впервые был описан в 2010 г. на территории Саяно-Шушенского государственного природного биосферного заповедника (Шауло, Эрст, 2010). Представители рода *Fritillaria* имеют высокий потенциал как декоративные культуры, используются для озеленения и в срезке. Кроме того, известны лекарственные свойства рябчиков, они применяются в традиционной медицине в качестве отхаркивающих, жаропонижающих и общетонизирующих средств (Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2007; Каирова и др., 2010). Однако в связи с медленным размножением в естественных условиях и высокой антропогенной нагрузкой на природные фитоценозы, многие виды данного рода находятся под угрозой исчезновения. Применение методов биотехнологии, а именно размножение растений *in vitro*, является решением проблем воспроизводства редких и исчезающих видов, растений с затрудненным размножением и массового получения ценных генотипов (Benson et al., 2000; Новикова и др., 2008; Ветчинкина, 2012).

Фундаментальной основой этих технологий являются исследования процессов морфогенеза в

культуре *in vitro*, реализующихся благодаря тотипотентности растительных клеток. Существует два основных морфогенетических пути, приводящих к регенерации целого растения из соматических тканей – органогенез и соматический эмбриогенез (Phillips, 2004). Оба пути морфогенеза могут протекать как с промежуточной стадией каллусообразования (непрямая регенерация), так и без нее (прямая регенерация). Предпочтительным путем морфогенеза для воспроизводства редких и исчезающих видов, позволяющим избежать соматической изменчивости и сохранить идентичность полученных клонов материнским растениям, является прямая регенерация (Varshney et al., 2001; Bublyk et al., 2012; Yin et al., 2013).

Органогенез (геммогенез и ризогенез) в культуре ткани характеризуется образованием побегов и корней *de novo* или их развитием из имеющихся меристем. При этом сформированные органы образуют сосудистую связь с тканью первичного экспланта в противоположность соматическим эмбрионам, которые являются новыми, индивидуально возникшими из соматических клеток биполярными структурами, развивающимися по подобию зиготических зародышей (George et al., 2008). Органогенез и соматический

Влияние регуляторов роста на регенерацию луковичек *F. sonnikovae* в культуре *in vitro*

Регулятор роста, мкМ	Регенерация, %	Количество побегов на эксплант, шт
Без гормонов (контроль)	48	4.1 ± 0.2
БАП 5	40	3.3 ± 0.6
БАП 5 + НУК 2	37	4.2 ± 0.6
БАП 10 + НУК 2	47	3.1 ± 0.5
ТДЗ 5 + НУК 2	30	3.9 ± 1.4
ТДЗ 10 + НУК 2	43	3.6 ± 1.2

эмбриогенез могут служить модельными системами для изучения морфогенеза растений, поскольку его пути как в естественных условиях *in vivo*, так и в условиях культуры *in vitro* универсальны (Батыгина и др., 2010).

Исследованиям процессов морфогенеза в культуре *in vitro* представителей рода *Fritillaria* и оптимизации протоколов микроразмножения на их основе посвящено несколько работ. Так установлено, что у *F. meleagris* при использовании в качестве первичных эксплантов зрелых зиготических зародышей и оснований листа происходит не прямой и прямой соматический эмбриогенез соответственно (Subotic et al., 2010; Petric et al., 2011). Другой путь морфогенеза, прямой геммогенез в культуре *in vitro* отмечался у *F. unibracteata* и *F. imperialis* (Gao et al., 1999; Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2008).

Целью данной работы явилось изучение особенностей регенерации *F. sonnikovae* в культуре *in vitro* из тканей луковичных чешуй.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходным материалом для введения в культуру *in vitro* послужили луковицы *F. sonnikovae*, соответствующие генеративной фазе развития, полученные из естественных мест произрастания (Россия, Красноярский край, хребет Бору). Стерилизацию луковичных чешуй осуществляли погружением в 70% этанол (30 с), затем 0.1% HgCl_2 с добавлением 1% Tween 80 (30 мин). Далее растительный материал трехкратно промывали стерильной дистиллированной водой, делили на части размером 5 × 5 мм и использовали в качестве первичных эксплантов. Питательной средой для введения в культуру *in vitro* явилась минеральная основа по прописи Данстена и Шорта (BDS) (Dunstan, Short, 1978), дополненная 5 мкМ 6-бензиламинопурина (БАП) и 2 мкМ α -нафтилуксусной кислоты (НУК). Стадию размножения (мультипликацию побегов) проводили на среде BDS, дополненной различными регуляторами роста

(таблица). В качестве контрольной среды использовали безгормональную среду BDS. Культивирование растительного материала проводили в условиях 16 ч свет/8 ч темнота при 23°C по общепринятым методикам (Калинин и др., 1980). Период субкультивирования составил 30–35 дней.

Онтогенетическое состояние полученных микролуковичек определяли согласно схеме жизненного цикла Л.Л. Седельниковой (2002).

В работе по изучению морфогенеза использовали сегменты чешуй микролуковичек *F. sonnikovae* размером 5 × 5 мм из культуры тканей. Для ускорения морфогенного ответа экспланты помещали на агаризованную питательную среду по прописи BDS, дополненную 5 мкМ БАП в сочетании с 2 мкМ НУК. Фиксировать растительный материал для последующего морфо-гистологического анализа начинали через 7–10 дней культивирования с периодичностью 3–5 дней. Изучение процессов морфогенеза проводили на постоянных препаратах, подготовленных по методике З.П. Паушевой (1988). Для этого растительный материал фиксировали в FAA – этанол: формалин: ледяная уксусная кислота (100 : 7 : 7). Промывку и дальнейшее хранение осуществляли в 70% этаноле. Далее фиксированный материал подготавливали для заливки в парафин, проводя через этанол, смесь этанола и хлороформа, хлороформ. Тонкие срезы (7–9 мкм) получали на ротационном микротоме Microm HM 325 (Thermo Scientific, США), затем их помещали на предметные стекла и окрашивали 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. Полученные при культивировании *in vitro* морфогенные структуры и динамику их развития анализировали с помощью стереомикроскопа Carl Zeiss Stereo Discovery V 12.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты проводились в 2–3 повторностях. При обработке результатов использовали пакет статистического анализа Microsoft Excel. В таблице приведены средние арифметические величины и доверительные интервалы. В работе обсуждаются различия, достоверные при 95%-ном уровне значимости.

Регенерация F. sonnikovae в культуре in vitro

Применяемый режим стерилизации оказался эффективным, выход неинфицированных эксплантов составил 96% процентов. Использование питательной среды, содержащей регуляторы роста растений, стимулировало процессы регенерации в

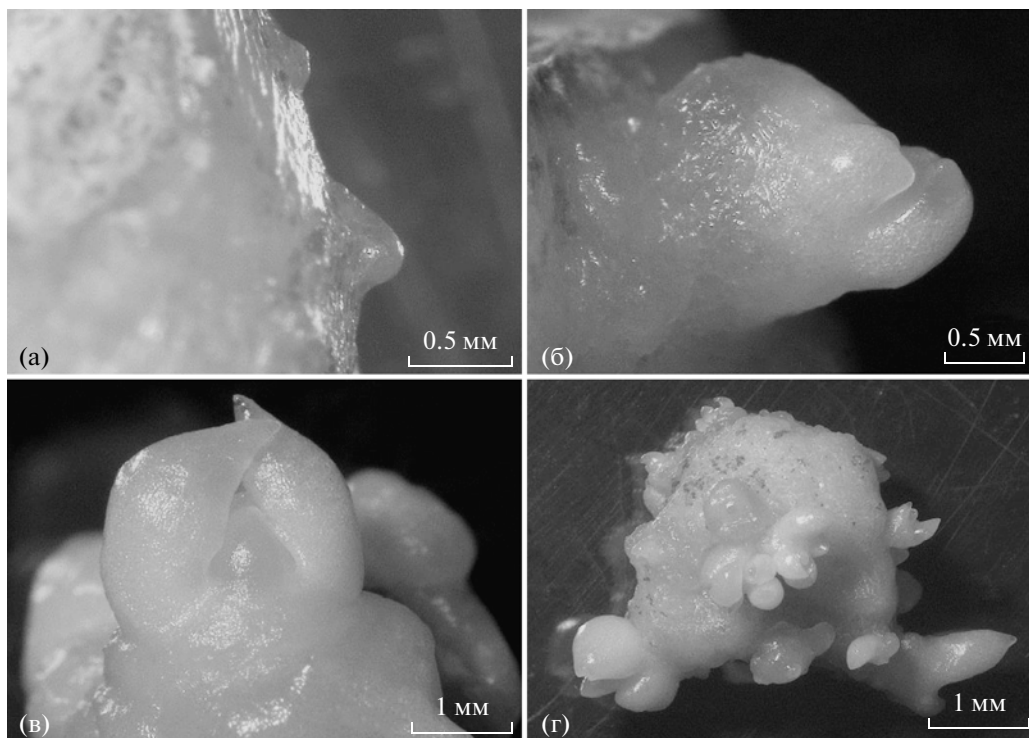


Рис. 1. Органогенез микролуковичек *F. sonnikovae* из сегментов луковичных чешуй на среде BDS, дополненной БАП 5 мкМ и НУК 2 мкМ. а – заложения почек, 11–15 дней; б – побег на 19 день культивирования; в – микролуковички с развитыми чешуями, 20–24 дней; г – побеги, находящиеся на разной стадии развития, 31 день.

тканях первичного экспланта и через 45–50 дней после введения в культуру *in vitro* при культивировании на среде BDS, дополненной БАП 5 мкМ и НУК 2 мкМ, отмечалось начало морфогенной активности (рис. 1а). Сформированные адвентивные микролуковички отделяли от первичного экспланта и переносили на среды для собственно размножения.

Основные результаты влияния регуляторов роста на регенерацию микролуковичек *F. sonnikovae* приведены в таблице. На испытанных средах каллусогенез отсутствовал, однако отмечали незначительный некроз тканей в зоне их контакта с питательной средой. Регенерационный ответ на всех испытанных средах варьировал от 30 до 48%, количество адвентивных луковичек – от 3.1 ± 0.5 до 4.2 ± 0.6 шт./экспл. На контрольной безгормональной среде наблюдали высокие показатели роста и развития микролуковичек на протяжении длительного периода культивирования (два года). Внесение в питательную среду экзогенных регуляторов роста на стадии собственно размножения не сопровождалось увеличением активности побегообразования для *F. sonnikovae* в культуре *in vitro*, но способствовало ускоренному процессу регенерации растений. Так, добавление 5 мкМ БАП и 2 мкМ НУК на данном этапе вызывало начало формирования микропочек на поверхности чешуи

через 12–17 дней культивирования, тогда как на безгормональной питательной среде этот период составлял 22–25 дней.

Морфо-гистологическое исследование

Для изучения морфогенеза растений *F. sonnikovae* в культуре *in vitro*, сегменты чешуй адвентивных луковиц культивировали на среде BDS, дополненной БАП 5 мкМ и НУК 2 мкМ. Регенерация побегов проходила как близко к раневой поверхности, так и на не поврежденной части луковичной чешуи, выступающей над поверхностью питательной среды (рис. 1г). Не удалось четко выявить зону максимальной морфогенной активности, так как регенерация отмечалась как в области донца, так и на всей поверхности экспланта. На начальных этапах развития все микропобеги были этиолированы, спустя 43–52 дня они приобретали зеленую окраску, что может свидетельствовать о начале ассимиляционной активности.

Изучение только морфологии структур, формирующихся в культуре *in vitro*, не позволило определить, какой именно путь морфогенеза протекает в тканях экспланта (прямой органогенез или соматический эмбриогенез). Для более детального изучения морфогенеза *in vitro* был проведен гистологический анализ.

Первые деления в эпидермисе луковичной чешуи наблюдались через 9–12 дней культивирования на питательной среде (рис. 2а). В результате дедифференцировки эпидермальных клеток происходило формирование меристематических клеток, для которых характерно наличие крупного ядра и плотной цитоплазмы, что свидетельствует о метаболической активности. К 12–15 дню культивирования отмечены интенсивные митотические деления клеток (антиклинальные и периклиналильные), способствующие образованию субэпидермальных слоев меристематического центра (рис. 2б). Дальнейшая пролиферация приводила к формированию почек на поверхности экспланта к 15–17 дню, развитие которых сопровождалось закладкой апекса побега и листовых примордиев (рис. 2в–2д). В формирующемся *de novo* побеге, начиная с 20 дня, происходило развитие чешуй и васкулярной системы (рис. 2е), к 30 дню культивирования были отчетливо видны хорошо сформированные сосуды проводящей системы в чешуях микрорастения (рис. 2з). После 40 дней культивирования луковичные чешуи приобретали более округлую форму.

Необходимо отметить, что для органогенеза *F. sonnikovae* в культуре *in vitro* характерна асинхронность развития микропобегов, на одном экспланте мы наблюдали как закладывающиеся почки, так и хорошо оформленные микролуковички, состоящие из 2–3 чешуй. Изучение динамики развития побегов показало, что в тканях экспланта происходит закладка *de novo* только апекса побега и листовых примордиев без образования апекса корня.

ОБСУЖДЕНИЕ

Использование регуляторов роста (их концентрация и комбинация) в питательных средах на этапе введения в культуру *in vitro* является ключевым экзогенным фактором, который способствует развитию имеющихся у растения меристем или закладке их *de novo*, что определяет возможность микроразмножения того или иного растения. Оптимальный подбор регуляторов роста особенно важен при ограниченном количестве исходного растительного материала редких и исчезающих видов растений.

Для большинства представителей рода *Fritillaria* размножение в культуре *in vitro* проводят с использованием преимущественно БАП, НУК, 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, тидиазурона (ТДЗ). Так, К.Я. Пэк и Х.Н. Мурти (Paeck, Murthy, 2002) было установлено, что для *F. thunbergii* добавление в питательную среду регуляторов роста усиливает регенерацию микролукович. НУК является наиболее эффективным ауксином в индукции формирования луковичек *in vitro* из сегментов луковичных чешуй этого вида,

при этом максимальная регенерация была получена при сочетании НУК 1.62 мкМ и кинетина 4.65 мкМ. При культивировании облиственной части побега *F. imperialis* наиболее оптимальным оказалось сочетание БАП и НУК в невысоких концентрациях (Lukaszewska et al., 1998). С. Жевремовик с соавторами удалось получить не прямой органогенез побегов *F. meleagris* добавлением в питательную среду 1 мг/л ТДЗ (Jevremovic et al., 2010). Использование БАП в комбинации с 3-индолилуксусной кислотой оказалось эффективным при клональном микроразмножении *F. unibracteata* (Gao et al., 1999).

В нашем исследовании применение регуляторов роста (БАП 5 мкМ и НУК 2 мкМ) оказалось целесообразным и обеспечило успешное введение *F. sonnikovae* в культуру *in vitro*. Нами также была показана возможность эффективной мультипликации микролуковиц *F. sonnikovae* на безгормональной среде. Внесение в питательную среду регуляторов роста требовалось только на начальных этапах работы в культуре *in vitro*. Формирование адвентивных микролуковичек на средах, содержащих регуляторы роста, явилось иницирующим фактором, обеспечивающим возможность дальнейшего культивирования этого вида на безгормональных средах. Это объясняется как омоложением тканей луковичных чешуй в культуре *in vitro*, характеризующихся большей морфогенной активностью, так и накоплением в луковичных чешуях регуляторов роста, используемых на этапе инициации культуры.

Кроме экзогенных регуляторов роста на способность изолированных тканей растений к регенерации влияют эндогенные факторы такие, как: источник экспланта, генотип растения, онтогенетическое состояние материнского растения и другое. В работах с однодольными геофитами для введения в культуру ткани используют различные типы эксплантов: флоральные органы, сегменты листа, верхушки побегов, междоузлия, а также семена (Zamora, Gruezo, 1999; Набиева и др., 2008; Полубоярова, др., 2011; Paric et al., 2011; Skoric et al., 2012; Saadon, Zaccai, 2013; Jin et al., 2014). Использование последних затрудняет микроразмножение представителей рода *Fritillaria* из-за глубокого морфо-физиологически сложного типа покоя семян, требующего длительного периода холодной и теплой стратификации, что показано в работе Е.М. Ветчинкиной с соавторами (Ветчинкина и др., 2012). Наиболее часто используемым первичным эксплантом для введения в культуру *in vitro* геофитов являются луковичные чешуи (Mirici et al., 2005; Azadi, Khosh-Khui, 2007; Эрст и др., 2014). В настоящей работе установлено, что этот тип эксплантов является перспективным для введения в культуру *in vitro* и дальнейшего микроразмножения *F. sonnikovae* в связи с возможностью получать большое количество

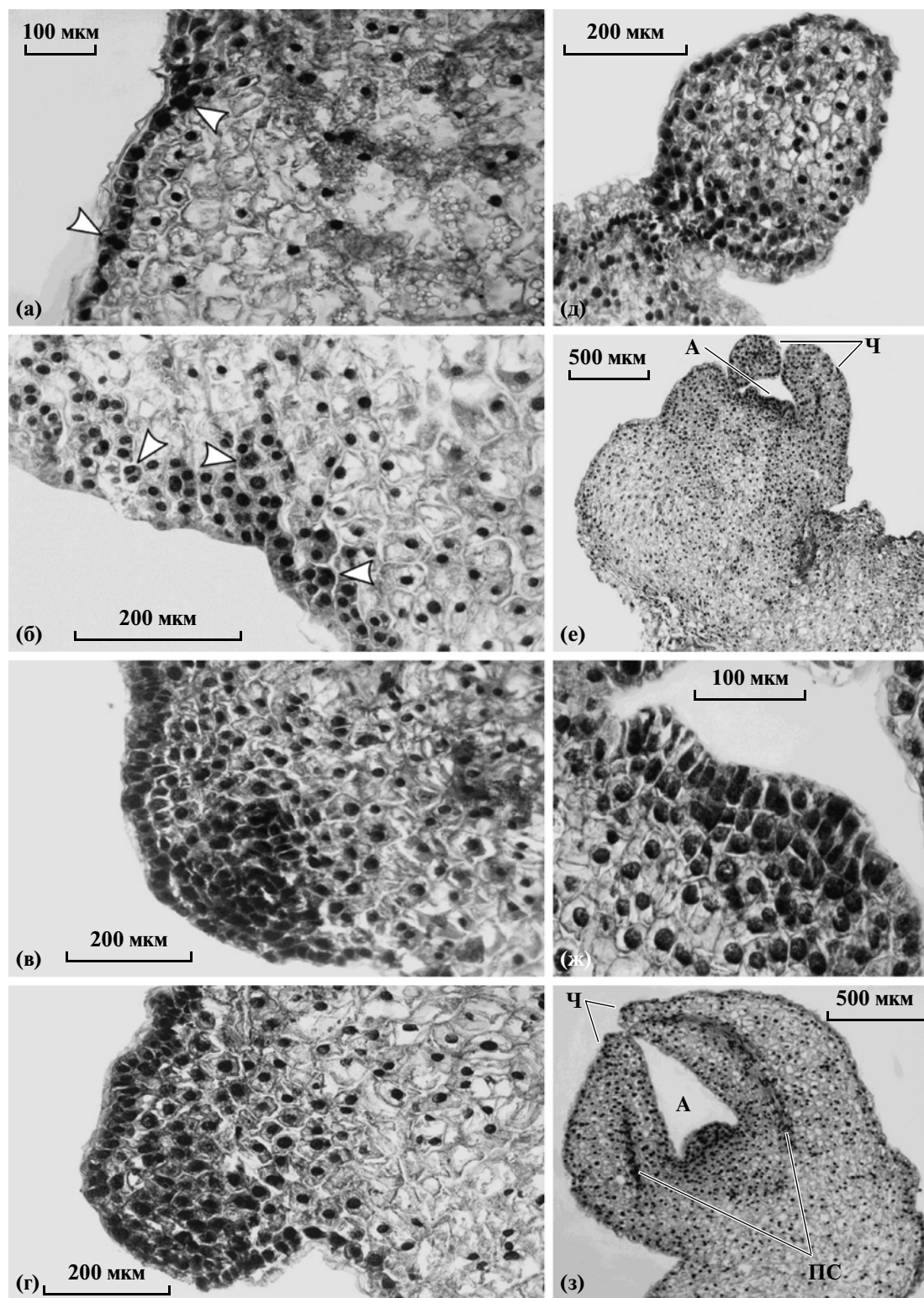


Рис. 2. Динамика развития микропобега *F. sonnikovae* в культуре *in vitro*.

а – пролиферация клеток (стрелки) в эпидермальных тканях луковичной чешуи; б – формирование субэпидермальных слоев меристематического центра, (стрелки – клеточные деления); в – меристемоид на поверхности экспланта; г – формирующаяся почка; д – почка на 15–17 день культивирования; е – продольный срез микропобега с развивающимися чешуями (Ч) и апикальной меристемой (А); ж – апикальная меристема побега с организацией по типу туника-корпус, 20 день; з – микролуковичка с развитыми чешуями (Ч) и сосудами первичной проводящей системы (ПС) на 25–30 день.

стерильного жизнеспособного растительного материала (96%), характеризующегося высокими показателями роста и развития.

Нами установлено, что морфогенная активность *F. sonnikovae* зависит также от онтогенетического состояния исходного экспланта. На этапе введения в культуру *in vitro* были использованы луковичные чешуи рябчика Сонниковой, находящегося во взрослом генеративном состоянии. Для получения морфогенного ответа таких эксплантов было необходимо внесение в питательную среду регуляторов роста (БАП и НУК) и длительный период культивирования 45–50 дней. Дальнейшее субкультивирование *in vitro* способствовало омоложению тканей луковичных чешуй (реювенилизации растения), при этом формирующиеся микролуковички соответствовали виргинильным растениям *F. sonnikovae* второго года. Такие экспланты сохраняли высокие морфогенную активность и темп закладки адвентивных побегов на средах без регуляторов роста. Внесение регуляторов роста при размножении реювенилизированного растительного материала способствовало ускорению закладки меристематических очагов.

В настоящей работе процессы регенерации *F. sonnikovae* в культуре *in vitro* впервые исследованы с использованием морфо-гистологического подхода, который позволил определить тип и последовательность событий морфогенеза. Использование этого подхода также помогло определить, что развитие микрорастений *F. meleagris* и *Crocus sativus* протекает с образованием соматических эмбриоидов при использовании зрелых зиготических зародышей и каллусной культуры соответственно (Blazquez et al., 2009; Subotic et al., 2010). Адвентивный органогенез был установлен в работах З.-Ф. Йина с соавторами (Yin et al., 2013) при культивировании оснований листа лилий сорта “Сибирь” и Д.Т. Нута (Nhut, 2003) при использовании тканей цветоложа *Lilium longiflorum*.

С помощью методов стереомикроскопии нами установлено, что морфогенетические процессы локализованы в местах поранений, а также на неповрежденной части луковичных чешуй. Изучение динамики регенерации микролуковичек с помощью гистологического анализа выявило, что через 8–16 дней культивирования эксплантов происходит дедифференцировка клеток эпидермы и их деление, в результате чего формируются меристематические очаги (меристематиды). Дальнейшая активность меристематической зоны приводит к формированию апекса побега и листовых примордиев почек (к 20 дню). На 25–30 дни показано формирование микролуковичек с развитыми листьями и сосудами первичной проводящей системы. Детальный гистологический анализ эксплантов позволил установить, что в ходе морфогенеза не происходит заложения апекса корня, а формирующаяся *de novo* структу-

ра имеет сосудистую связь с тканью первичного экспланта. Эти особенности свидетельствуют о том, что развитие *F. sonnikovae* в культуре *in vitro* идет по пути прямого органогенеза, а не соматического эмбриогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы установлено, что использование питательной среды BDS, содержащей 5 мкМ БАП и 2 мкМ НУК, на стадии введения в культуру стимулирует регенерацию побегов из тканей луковичных чешуй материнского растения *F. sonnikovae*. Дальнейшее субкультивирование вызывает реювенилизацию растений в культуре *in vitro*, что способствует высоким показателям роста и развития адвентивных микролуковичек на безгормональной питательной среде BDS, при этом частота регенерации составляет 48%, а количество сформированных микролуковичек — 4.1 ± 0.2 шт./экспл. Добавление БАП и НУК на стадии собственно размножения ускоряет формирование адвентивных побегов. Впервые был проведен морфо-гистологический анализ развития микропобегов *F. sonnikovae* из тканей луковичных чешуй, который позволил установить, что в культуре *in vitro* регенерация побегов из клеток эпидермиса луковичной чешуи протекает по пути прямого органогенеза *de novo* (адвентивный геммогенез).

Таким образом, нами установлено, что использование луковичных чешуй в качестве первичного экспланта является эффективным способом размножения и сохранения в культуре *in vitro* редкого и эндемичного вида *F. sonnikovae*.

Исследования выполнены при финансовой поддержке грантов ОПТЭК, “УМНИК”, Программы Президиума РАН “Живая природа: современное состояние и проблемы развития” (№ 30.3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю. и др. От микроспоры — к сорту. М.: Наука, 2010. 174 с.
- Ветчинкина Е.М., Ширнина И.В., Ширнин С.Ю. и др. Сохранение редких видов редких видов растений в генетических коллекциях *in vitro* // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. 2012. № 7. С. 109–118.
- Каирова М.Ж., Бижанова Г.К., Дюскалиева Г.У. и др. Анатомо-морфологические особенности растений *Fritillaria verticillata* Willd., произрастающих на территории Юго-Восточного Казахстана // Вестник ПГУ. Серия химико-биологическая. 2010. № 3. С. 149–155.
- Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры ткани в физиологии и биохимии растений. Киев: Наук. думка, 1980. 488 с.
- Набиева А.Ю., Дорогина О.В., Красников А.А. Размножение и сохранение в культуре *in vitro* двух редких

- видов лилий – *Lilium distichum* Nakai и *L. cernuum* Kom. // Раст. Ресурсы. 2008. Т. 44. Вып. 2. С. 23–29.
- Новикова Т.И., Набиева А.Ю., Полуобоярова Т.В. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального Сибирского ботанического сада // Вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 4. С. 564–572.
- Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988. 271 с.
- Полуобоярова Т.В., Андропова Е.В., Новикова Т.И. и др. Регенерация побегов из тканей цветка *Allium altissimum* (Alliaceae) в культуре *in vitro* // Раст. ресурсы. 2011. Вып. 3. С. 33–42.
- Седельникова Л.Л. Биоморфология геофитов в Западной Сибири. Новосибирск: Наука, 2002. 308 с.
- Шауло Д.Н., Эрст А.А. Новый вид рода *Fritillaria* L. (Liliaceae) с Западного Саяна // Turczaninowia. 2010. № 13(3). С. 46–49.
- Эрст А.А., Эрст А.С., Шауло Д.Н. и др. Сохранение и размножение *in vitro* редких видов рода *Fritillaria* (Liliaceae) // Растительный мир Азиатской России. 2014. № 1(13) С. 64–70.
- Azadi P., Khosh-Khui M. Micropropagation of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss as affected by plant growth regulator, sucrose concentration, harvesting season and cold treatments // Elec. J. of Biotech. 2007. V. 10. № 4. P. 582–591.
- Benson E.E., Danaher J.E., Pimbley I.M. et al. *In vitro* micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant // Biodiversity and Conservation. 2000. V. 9. P. 711–726.
- Blazquez S., Olmos E., Hernandez J.A. et al. Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system // Plant Cell, Tiss. and Organ Cult. 2009. V. 97. P. 49–57.
- Bublyk O.M., Andreev I.O., Spiridonova K.V. et al. Genetic variability in regenerated plants of *Ungernia victoris* // Biologia plantarum. 2012. № 56(2). P. 395–400.
- Dunstan D.J., Short K.C. Improved growth of tissue cultures of the onion *Allium cepa* // Phisiol. Plant. 1977. V. 41. № 1. P. 70–72.
- Gao S.L., Zhu D.N., Cai Z.H. et al. Organ culture of a precious Chinese medicinal plant – *Fritillaria unibracteata* // Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 1999. V. 59. P. 197–201.
- George E.F., Hall M.A., De Klerk G.-J. Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd edition. Volume 1. The Background. The Netherlands: Springer, 2008. 501 p.
- Jevremovic S., Petric M., Zivkovic S. Superoxide dismutase activity and isoenzyme profiles in bulbs of snake's head Fritillary in response to cold treatment // Arch. Biol. Sci. 2010. № 62(3). P. 553–558.
- Jin S., Wang J., Wang X. et al. Direct and indirect shoot and bulblet regeneration from cultured leaf explants of *Lilium pumilum*, an endangered species // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2014. № 50. P. 69–75.
- Lukaszewska A.J., Witomska M., Bianco J. et al. ABA contents and the regeneration ability of *Fritillaria imperialis* L. cultured *in vitro* // Acta Physiol. Plant. 1998. V. 20. № 3. P. 241–244.
- Mirici S., Parmaksiz I., Ozcan S. et al. Efficient *in vitro* bulblet regeneration from immature embryos of endangered *Sternbergia fischeriana* // Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 2005. № 80. P. 239–246.
- Mohammadi-Dehcheshmeh M., Khalighi A., Naderi R. et al. Indirect somatic embryogenesis from petal explant of endangered wild population of *Fritillaria imperialis* // Pak. J. of Bio. Scien. 2007. № 10(11). P. 1875–1879.
- Mohammadi-Dehcheshmeh M., Khalighi A., Naderi R. et al. Petal: a reliable explant for direct bulblet regeneration of endangered wild populations of *Fritillaria imperialis* L. // Acta Physiol. Plant. 2008. № 30. P. 395–399.
- 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 // Plant Growth Regulation. 2003. № 40. P. 179–184.
- Paek K.Y., Murthy H.N. High frequency of bulblet regeneration from bulb scale sections of *Fritillaria thunbergii* // Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 2002. V. 68. P. 247–252.
- Paric A., Cakar J., Muratovic E. et al. Induction of bulblets on leaf and bulb explants of endangered *Lilium bosniacum* (G. Beck) G. Beck ex Fritsch // Botanica Serbica. 2011. № 35(1). P. 31–35.
- Petric M., Subotic A., Jevremovic S. et al. Somatic embryogenesis and bulblet regeneration in snakehead fritillary (*Fritillaria meleagris* L.) // Afr. J. of Biotech. 2011. № 10(72). P. 16181–16188.
- Phillips G.C. *In vitro* morphogenesis in plants – recent advances // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2004. № 40. P. 342–345.
- Saadon S., Zaccai M. *Lilium candidum* bulblet and meristem development // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2013. № 49. P. 313–319.
- Skoric M., Zivkovic S., Savic J. et al. Efficient one-step tissue culture protocol for propagation of endemic plant, *Lilium martagon* var. *cattaniae* Vis. // Afr. J. of Biotech. 2012. № 11(8). P. 1862–1867.
- Subotic A., Trifunovic M., Jevremovic S. et al. Morpho-histological study of direct somatic embryogenesis in endangered species *Fritillaria meleagris* // Biologia plantarum. 2010. № 54(3). P. 592–596.
- Varshney A., Lakshmikumaran M., Srivastava P.S. et al. Establishment of genetic fidelity of *in vitro*-raised *Lilium* bulblets through RAPD markers // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2001. № 37. P. 227–231.
- Yin Z.-F., Zhao B., Bi W.-L. et al. Direct shoot regeneration from basal leaf segments of *Lilium* and assessment of genetic stability in regenerants by ISSR and AFLP markers // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2013. № 49. P. 333–342.
- Zamora A.B., Gruezo S.S. Shoot culture and plant regeneration in Bunguet lily (*Lilium philippinensis*) // Philipp. J. Crop. Sci. 1999. № 24(2, 3). P. 85–89.

In vitro Regeneration from Bulbous Scales of *Fritillaria sonnikovae*, an Endemic Species

D. S. Kulkhanova, A. A. Erst, and T. I. Novikova

*Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
ul. Zolotodolinskaya 101, Novosibirsk, 630090 Russia*

e-mail: dinarakulkhanova@yandex.ru

Received May 15, 2014; in final form, January 21, 2015

Features of in vitro regeneration of *Fritillaria sonnikovae* from bulb scales were studied. The initiation of shoot formation was obtained on a nutrient medium BDS, supplemented with 5 μM 6-benzylaminopurine and 2 μM α -naphthaleneacetic acid. Optimization of propagation stage was carried out using obtained microbulbs as explants. High regenerative response of explants and shoot multiplication rate were observed on both media supplemented with growth regulators (up to 47% and 4.2 ± 0.6 pcs./explant, respectively) and hormone-free medium (48% and 4.1 ± 0.2 shoots per explant, respectively). It has been established that the addition of growth regulators on the stage of cultivation does not cause increased morphogenic response but contributes to the accelerated initiation and development of microbulbs. Morphological and histological analysis revealed the dynamics of the formation of shoots *de novo*. In vitro development of *F. sonnikovae* follows the path of direct organogenesis from the epidermal tissue of the explant.

Keywords: *Fritillaria sonnikovae*, in vitro regeneration, morphological and histological analysis, bulb scales, biodiversity preservation