

**СОХРАНЕНИЕ И РАЗМНОЖЕНИЕ *IN VITRO*
РЕДКИХ ВИДОВ РОДА *FRITILLARIA* (*LILIACEAE*)**

А.А. Эрст, А.С. Эрст, Д.Н. Шауло, Д.С. Кульханова

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, 630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101,
e-mail: annaerst@yandex.ru; erst_andrew@yahoo.com; dshaulo@yandex.ru

Рассмотрены процессы морфогенеза в культуре *in vitro* двух эндемичных представителей рода *Fritillaria* – *F. dagana* и *F. sonnikovae*. Отмечено, что наибольшим регенерационным потенциалом обладают ткани луковичных чешуй. Для изучаемых видов возможно развитие по двум путям морфогенеза – прямого органогенеза и непрямого соматического эмбриогенеза.

Ключевые слова: *Fritillaria dagana*, *F. sonnikovae*, адвентивное побегообразование, соматический эмбриогенез, условия культивирования *in vitro*.

**CONSERVATION AND PROPAGATION *IN VITRO*
OF RARE SPECIES *FRITILLARIA* (*LILIACEAE*)**

A.A. Erst, A.S. Erst, D.N. Shaulo, D.S. Kulkhanova

Central Siberian Botanical Garden, SB RAS, 630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya str., 101,
e-mail: annaerst@yandex.ru; erst_andrew@yahoo.com; dshaulo@yandex.ru

The morphogenesis *in vitro* culture of two endemic species of the genus *Fritillaria* – *F. dagana* and *F. sonnikovae* was described. It is noted that the highest regeneration potential was developed from the bulbous scales. The development on two ways morphogenesis – direct organogenesis and indirect somatic embryogenesis was observed.

Key words: *Fritillaria dagana*, *F. sonnikovae*, adventive shoot formation, somatic embryogenesis, culture conditions *in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ

Род *Fritillaria* L. (*Liliaceae* Juss.) включает более 100 видов, распространенных в умеренном поясе Северного полушария, многие из которых включены в Красные книги различных уровней. Виды этого рода имеют интересный фитохимический состав, в частности, содержат изостероидные алкалоиды и широко используются в традиционной китайской медицине (Li et al., 2001). Кроме того, рябчики имеют огромный потенциал как декоративные растения в связи с необычной природной окраской цветов и ранним цветением. В естественных условиях произрастания, а также в интродукции скорость вегетативного размножения невысока и от одной луковицы можно получить только две новые за год. Такой низкий потенциал не позволяет размножать виды рода *Fritillaria* традиционным делением луковицы. Семенное воспроизводство рябчиков очень длительное и составляет 5–6 лет до цветения. Данные обстоятельства при-

вели к росту исследований по разработке эффективных способов воспроизведения этих видов, в том числе с использованием культуры тканей и органов растений *in vitro*.

Размножение *in vitro* используется как альтернативный метод воспроизведения для многих геофитов, таких как *Sternbergia fischeriana* (Herb.) Roem. (Mirici et al., 2005), *Fritillaria meleagris* L. (Petric et al., 2011), *Allium sativum* L. (Kim et al., 2003), *Lilium longiflorum* Thunb. (Nhut et al., 2002) и др.

В настоящей работе описана система размножения *in vitro* двух эндемичных видов рода *Fritillaria* – *F. dagana* Turcz. ex Trautv. и *F. sonnikovae* Schaulo et A. Erst, и рассмотрено влияние условий культивирования на течение процесса морфогенеза. Данные наших исследований могут быть использованы для массового размножения высокодекоративных видов рода *Fritillaria*, а также для их сохранения и репатриации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исходным материалом для введения в культуру *in vitro* послужили луковицы и семена *F. dagana* и *F. sonnikovae*, собранные в конце мая 2010 г. с естест-

венных мест произрастания – Россия, Красноярский край, хребты Ергаки и Борус (рис. 1, а, в). Перед стерилизацией луковицы промывали в мыльной воде и

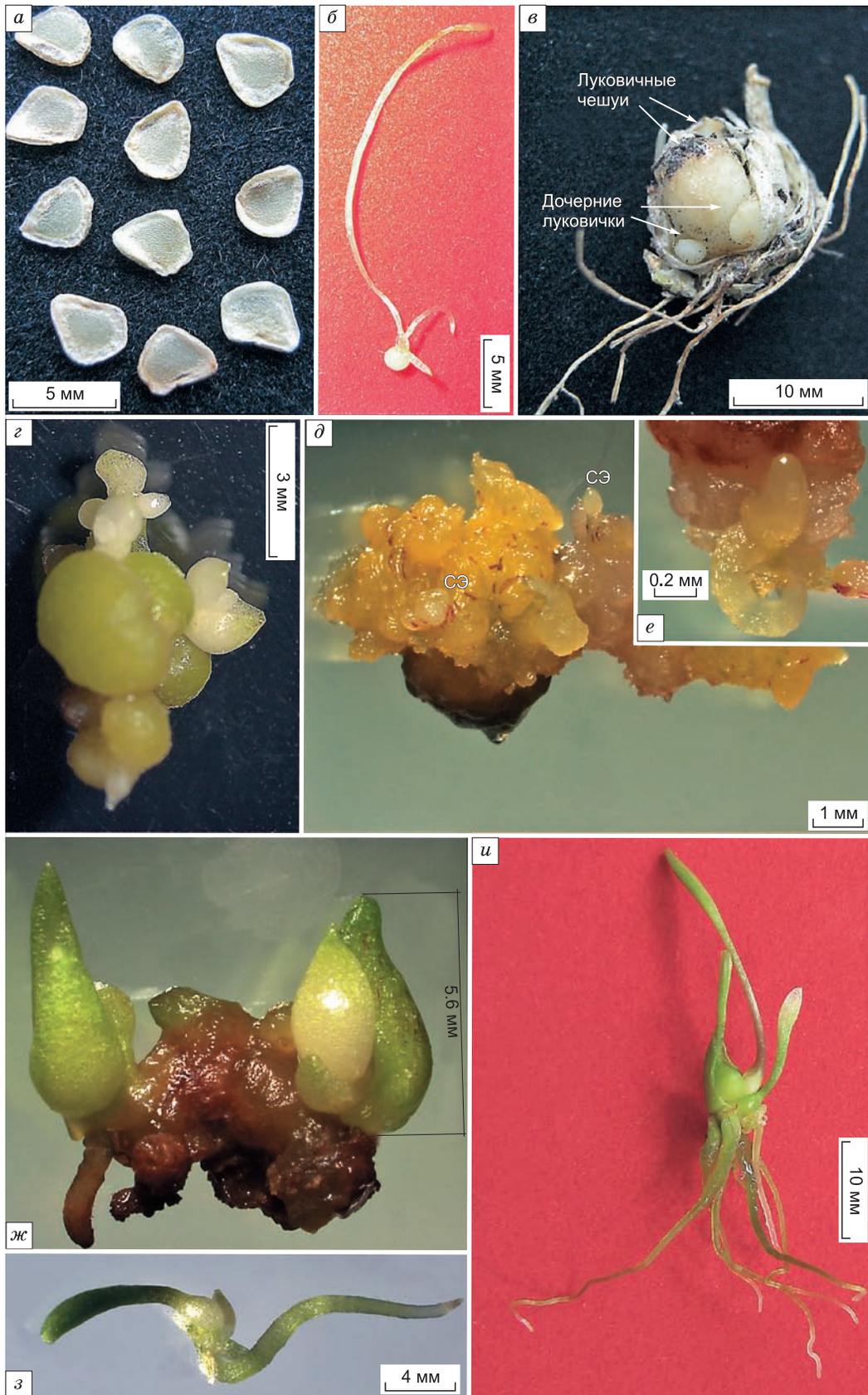


Рис. 1. Этапы микроразмножения *F. dagana* и *F. sonnikovae*:

a – семена *F. sonnikovae*; *б* – проросток *F. sonnikovae*, полученный в культуре *in vitro*; *в* – луковица *F. dagana*; *г* – адвентивное побегообразование *F. dagana* на части луковичной чешуи; *д* – эмбриогенный каллус *F. dagana*; *е* – сформированный соматический эмбрионид *F. dagana*; *ж* – развитые соматические эмбриониды *F. sonnikovae* на эмбриогенном каллусе; *з* – растение-регенерант *F. dagana*, полученное путем соматического эмбриогенеза; *и* – растение-регенерант *F. dagana*, полученное путем адвентивного побегообразования; СЭ – соматический эмбрионид (4 мм).

Варианты питательных сред, используемых для культивирования видов рода *Fritillaria*

Питательная среда	Сахароза, г/л	АУ, г/л	Регуляторы роста и физиологически активные добавки				
			БАП, мкМ	Кн, мкМ	НУК, мкМ	Триптофан, мг/л	Глутаминовая кислота, мг/л
MS	50	–	–	4.5	1.5	–	–
	20	5	–	5	2	–	–
B ₅	50	–	5.0	–	2.0	–	–
	30	–	0.5	–	5.0	–	–
	30	–	5.0	–	2.0	–	–
	30	–	5.0	–	–	–	–
	30	–	–	–	5.0	–	–
	50	–	–	–	–	–	–
BDS	30	–	5.0	–	2.0	–	–
	30	–	–	–	5.0	–	–
	30	–	–	–	–	100	200
	30	–	–	–	–	–	–
	20	–	–	–	–	–	1500
	20	–	–	–	–	100	–
	20	10	–	–	–	–	–

делили на луковичные чешуи и дочерние луковички. Стерилизацию проводили 70%-м этанолом (30 с), затем 0.1%-м HgCl₂ с добавлением 1%-го Tween 80 (30 мин). Для семян использовали 20%-й раствор Domestos (20 мин). После стерилизации растительный материал трехкратно промывали стерильной дистиллированной водой.

Для культивирования эксплантов были подобраны следующие условия: фотопериод – 16/8 часов свет/темнота, освещенность – 2–3 клк, температура – 24 ± 1 °С. Дочерние луковички после поверхностной стерилизации дополнительно выдерживали в культуре *in vitro* при температуре +7 °С в темноте 2 месяца (для создания холодного периода покоя). Семена проращивали по методике Е.М. Ветчинкиной в течение 5–7 недель при температуре 20–22 °С, затем 12 недель при

температуре 3–5 °С на фотопериоде 16/8 (Ветчинкина, 2010).

Основные питательные среды – среда B₅ (Gamborg, Eveleigh, 1968), BDS (Dunstan, Short, 1977), MS (Murashige, Skoog, 1962), успешно применяемые для размножения луковичных растений (Вечернина, 2004; Arzate-Fernandez et al., 1997; Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2007; и др.). Эти среды дополняли регуляторами роста: 6-бензиламинопурином – БАП (ICN Biomedicals, USA) 0.5 и 5 мкМ, кинетином – Кн (ICN Biomedicals, USA) 4.5 мкМ, α-нафтилуксусной кислотой – НУК (AppliChem, Germany) 1.5, 2 и 5 мкМ; физиологически активными добавками: триптофаном – 100 мг/л, глутаминовой кислотой – 200 и 1500 мг/л; сахарозой 30 и 50 г/л; активированным углем (АУ) 1.5 и 10 г/л; агаром 6 г/л (Difco, USA). Варианты питательных сред приведены в таблице. рН среды доводили до 5.8, затем среды автоклавировали при 121 °С в течение 20 мин.

Все эксперименты проводились в 2–3 повторностях. Статистическая обработка результатов осуществлялась путем расчетов с использованием пакета статистического анализа приложения Microsoft Excel. Расчет показан в средних арифметических величинах и доверительных интервалах. Доверительность оцениваемых показателей принимали на уровне значимости $p < 0.05$ (Лакин, 1990). Морфологические исследования выполнены в ЦКП ЦСБС СО РАН (Новосибирск, Россия) на микроскопе Stereo Discovery V 12 с цветной цифровой камерой высокого разрешения AxioCam MRc-5 и программой AxioVision 4.8 для получения, обработки и анализа изображений (Carl Zeiss, Germany).

Учитывались следующие показатели: частота морфогенеза – количество эксплантов с морфогенным ответом (%); коэффициент размножения – количество развившихся побегов на эксплант (шт./экспл.); высота растения (мм); частота укоренения (%); количество корней у одного регенеранта (шт.); средняя длина корней у одного регенеранта (мм).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Введение в культуру *in vitro*

Применяемые режимы поверхностной стерилизации оказались эффективными для всех типов эксплантов. Выход неинфицированного растительного материала составил 90–100 %.

Луковичные чешуи (после поверхностной стерилизации) делили на части 5 × 5 мм и помещали на питательные среды различного состава (см. таблицу). На этапе введения в культуру применяли питательную среду MS, дополненную Кн 5 мкМ и НУК 2 мкМ (для прямой регенерации побегов по К.У. Раек, Н.Н. Murthy, 2002), B₅, дополненную БАП 0.5 мкМ и НУК 5 мкМ (для непрямого соматического эмбриогене-

за по М. Mohammadi-Dehcheshmeh и др. (2007), и безгормональную среду B₅ (контроль). На данных вариантах сред наблюдали только набухание и позеленение тканей луковичных чешуй спустя месяц культивирования в условиях фотопериода. Далее экспланты помещали на среды B₅ с 5 мкМ БАП и 2 мкМ НУК и через 50 дней отмечали образование меристематических очагов на поверхности луковичных чешуй, из которых развивались адвентивные луковички (см. рис. 1, 2). Изучаемые виды отличались по морфогенному ответу, так для *F. dagana* частота морфогенеза составила 100 % при коэффициенте размножения 10.1 ± 2.2 шт./экспл., для *F. sonnikovae* – 12.5 % с коэффициентом размножения 12.0 ± 5.2 шт./экспл.

Дочерние луковички помещали на среды: 0.6 % агар, 0.6 % агар + АУ 1 г/л, В₅ + БАП 5 мкМ + НУК 2 мкМ, BDS, BDS + АУ 1 г/л и культивировали с использованием или без холодной предобработки. Во всех вариантах наблюдали только позеленение тканей луковичек, морфогенного ответа не выявлено в течение двух лет наблюдений.

Семена. Прорастание семян отмечали через 3 месяца культивирования в световом термостате при +7 °С на 0.6%-м агаре. Далее растения переносили в культуральную комнату (+24 °С), наблюдали развитие луковичек. По достижении 2–3 мм в диаметре их помещали на среды для размножения (см. рис. 1, а, б).

Факторы, влияющие на введение в культуру различных типов эксплантов рода *Fritillaria*

Регуляторы роста. Морфогенез тканей растений *in vitro* зависит от сочетания как экзогенных, так и эндогенных регуляторов роста. Высокий регенерационный ответ многих луковичных в культуре *in vitro* свидетельствует о достаточно большой концентрации эндогенных фитогормонов (Maesato et al., 1994). В связи с этим экзогенное сочетание регуляторов роста, вызывающее морфогенез, может быть смещено как в сторону цитокининов, так и в сторону ауксинов (Han et al., 2004; Fennell, van Staden, 2004; Rice et al., 2011). При культивировании луковичных чешуй и дочерних луковичек *F. dagana* и *F. sonnikovae* на свету наблюдали разрастание и позеленение тканей независимо от применяемых питательных сред (MS, В₅, BDS). Морфогенный ответ получен только на средах, дополненных цитокининами, или при преобладании концентрации цитокининов над ауксинами.

Покой семян. Семена видов рода *Fritillaria* имеют глубокий морфофизиологический тип покоя (ВВ-В₃), который характеризуется действием физиологического механизма торможения прорастания (ФМТ), сочетающегося с сильным недоразвитием зародыша (Николаева и др., 1999). Для окончательной дифференцировки и формирования зародыша, а также для нарушения ФМТ необходима длительная стратификация, включающая в себя чередование теплых и холодных этапов. По нашим данным высокий процент прорастания семян *F. dagana* и *F. sonnikovae* был получен только после трех месяцев холодной стратификации.

Собственно микроразмножение

В своих дальнейших исследованиях мы использовали части луковичных чешуй как оптимальный эксплант для размножения исследуемых видов. Высокий регенерационный потенциал луковичных чешуй отмечен и у других представителей рода *Fritillaria* – *F. camtschaticensis* (L.) Ker-Gawl. и *F. thunbergii* Miq. (Otani, Shimada, 1997; Paek, Murthy, 2002).

Влияние минеральной основы питательной среды. Для культивирования видов рода *Fritillaria* применяют различные питательные среды: MS – *F. thunbergii*

(Paek, Murthy, 2002), *F. meleagris* (Nicolic et al., 2008; Petric et al., 2011), В₅ – *F. imperialis* L. (Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2007) и *F. meleagris* (Вечернина, 2004). В нашем случае для изучения влияния минеральной основы среды на процесс морфогенеза микролуковички *F. dagana* и *F. sonnikovae* переносили с целью размножения на питательные среды различного состава (см. таблицу).

На средах В₅ и BDS, дополненных БАП или БАП в сочетании с НУК, к концу пассажа у *F. dagana* дополнительно развивались 2–3 адвентивные луковички. Таким же способом, т. е. из луковичных чешуй путем прямого геммогенеза, были получены побеги у *F. thunbergii* (Paek, Murthy, 2002), *F. camtschaticensis* (Otani, Shimada, 1997) и *F. meleagris* (Вечернина, 2004).

Массовое заложение луковичек другого исследуемого нами вида – *F. sonnikovae*, получили только при культивировании эксплантов на среде BDS, дополненной триптофаном 100 мг/л и глутаминовой кислотой 200 мг/л. Наблюдала разрастание тканей луковичных чешуй, образование плотной каллусной массы, на которой происходило образование соматических эмбриоидов. Соматический эмбриогенез из вегетативных тканей отмечен также у *F. meleagris* (Subotic et al., 2010). Заложившиеся луковички *F. sonnikovae* имели зеленый цвет, при увеличении срока пассажа до двух месяцев происходили рост луковичек и развитие корневой системы (см. рис. 1, ж). Культивирование эксплантов проводили группами по 7–10 шт. с частью каллуса, так как на нем находились побеги на разной стадии развития. На среде В₅ наблюдали прямую регенерацию луковичек из тканей луковичных чешуй на этапе введения в культуру, но пересадка образовавшихся луковичек на среды того же состава приводила к угнетению их роста. Скорее всего, прямая регенерация луковичек на среде В₅ объясняется высоким эндогенным содержанием фитогормонов в исходных луковичных чешуях, возможно, образовавшиеся микролуковички таким гормональным балансом не обладали.

Таким образом, *F. dagana* можно культивировать на средах В₅ и BDS, на которых исследуемый вид проявил схожие показатели роста и развития. Высокой морфогенной активностью характеризовалась плотная каллусная масса *F. sonnikovae* только на среде BDS.

Роль регуляторов роста и физиологически активных добавок в получении морфогенного ответа

Культивирование *in vitro* *F. dagana* и *F. sonnikovae* выявило два направления морфогенеза: адвентивное побегообразование и непрямой соматический эмбриогенез (рис. 2). Возможность развития по тому или иному пути морфогенеза зависит от видовой принадлежности, типа экспланта и условий культивирования.

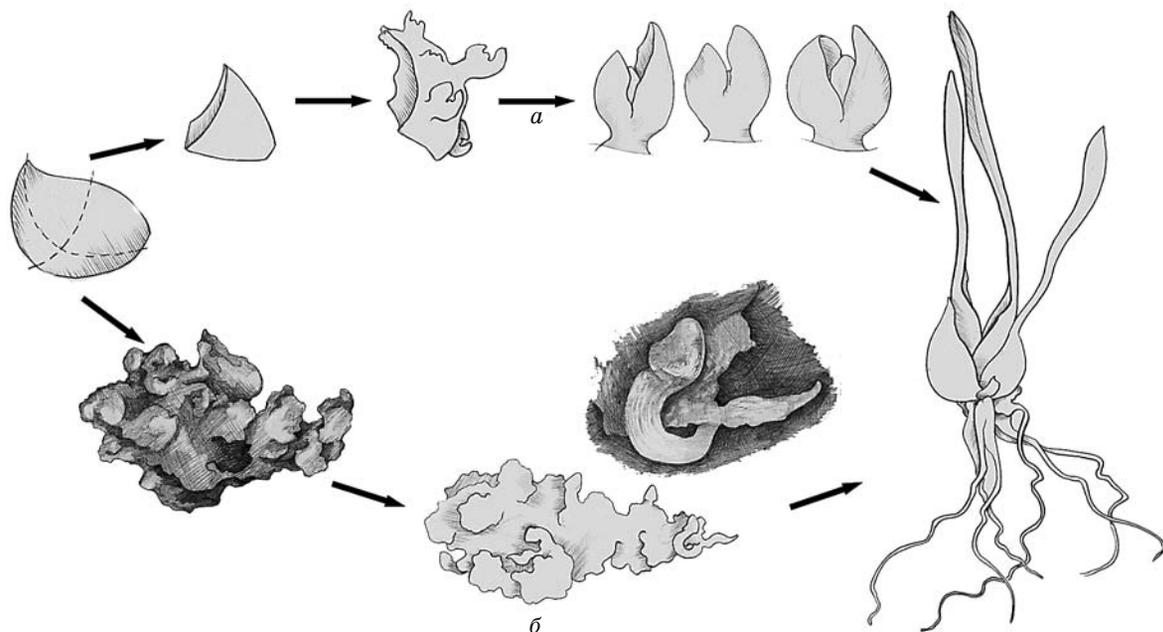


Рис. 2. Пути морфогенеза *F. dagana* и *F. sonnikovae* в культуре *in vitro*:

a – адвентивное побегообразование из тканей луковичных чешуй; *б* – непрямой соматический эмбриогенез.

Прямую регенерацию (адвентивное побегообразование) наблюдали на среде для введения в культуру B_5 , дополненную БАП 5 мкМ и НУК 2 мкМ, и на среде для побегообразования из тканей луковичных чешуй – B_5 , дополненной БАП или БАП в сочетании с НУК (см. рис. 2). У *F. dagana* адвентивное побегообразование удалось стимулировать на всех этапах культивирования, как из тканей исходных луковичных чешуй, так и из тканей адвентивных микролуковичек, полученных *in vitro*. Прямую регенерацию луковичек *F. sonnikovae* из луковичных чешуй наблюдали только на стадии введения в культуру.

По нашим данным, оптимальным сочетанием регуляторов роста на этапе размножения для *F. dagana* оказалось БАП 5 мкМ или БАП 5 мкМ и НУК 2 мкМ (Эрст А.А., Эрст А.С., 2011). Невысокий коэффициент размножения (3–5 шт./экспл.) в данном случае способствует хорошему росту и развитию луковичек и позволяет включать их в дальнейшие этапы микро размножения.

Непрямой соматический эмбриогенез

Получение каллусной культуры. В наших исследованиях отмечено, что при повышении содержания сахарозы в среде до 5 % у *F. dagana* происходит каллусообразование. При этом каллус теряет свою морфогенную активность за 2–3 пассажа, характеризуется активным ростом, в том числе на безгормональной среде. Морфогенная активность такого каллуса (единичные соматические эмбриониды) сохраняется только в течение 1–2 пассажей при условии дальнейшего его культивирования на среде с пониженным содержанием углеводов и наличия АУ в среде (1–5 г/л).

Такой же эффект описан для *F. ruthenica* Wikstr., использование углеводов в среде более 4 % привело к формированию неморфогенного каллуса этого вида (Ветчинкина, 2010).

Другой путь получения каллусной культуры – использование ауксинов. Нами отмечено, что при длительном культивировании *F. dagana* (более трех месяцев) на среде B_5 с 5 мкМ НУК формируется каллус, который проявляет морфогенную активность (соматический эмбриогенез) (см. рис. 1, д, е, з).

Вид *F. sonnikovae* образует плотную каллусную культуру на среде BDS, характеризующуюся высокой эмбриогенной активностью, в том числе на безгормональных средах. Способность тканей и клеток переходить на тот или иной путь развития определяется многими физическими и химическими факторами. Для *F. sonnikovae* удалось получить стабильную морфогенную каллусную культуру на среде BDS, дополненной аминокислотами – триптофаном 100 мг/л и глутаминовой кислотой 200 мг/л. Такое сочетание компонентов среды обеспечило массовое заложение соматических эмбрионидов. При изучении эффективности аминокислот в питании растительных тканей нужно различать два аспекта этого процесса, а именно возможность использования аминокислот в качестве единственного источника азота и действие аминокислот на метаболизм и рост тканей на фоне основного нитратного питания (Бутенко, 1964). Аминокислота триптофан является предшественником ауксинов и проявляет ростостимулирующую активность (Nickerson, 1980; Nalawade et al., 2003). Глутаминовую кислоту использовали для многих видов растений, в том числе для стимуляции побегообразо-

вания и развития соматических эмбрионидов (Шалаев, Третьякова, 2011; Sudharsan et al., 2001; Anis et al., 2003; Chalupa, 2003). В наших исследованиях показано, что внесение аминокислот способствовало массовому заложению и развитию соматических эмбрионидов на начальных этапах культивирования.

Таким образом, каллус *F. dagana*, полученный путем повышения содержания углеводов в питательной среде (до 5%), теряет способность к соматическому эмбриогенезу за 2–3 пассажа. Для развития соматических эмбрионидов этого вида необходимо дальнейшее культивирование каллуса на среде с АУ и пониженным содержанием углеводов. Морфогенный каллус *F. dagana*, полученный с использованием ауксинов, необходимо в дальнейшем культивировать на средах с БАП. *F. sonnikovae* формирует плотную каллусную массу на среде BDS, сохраняющую высокую способность к морфогенезу в течение нескольких лет.

Укоренение *in vitro*

Для укоренения микролуковичек *F. dagana* использовали среду В₅, дополненную 5 мкМ НУК. При этом установлено, что укоренение наступает только

при культивировании в условиях пониженной температуры. Сходные особенности ризогенеза отмечались и для других видов рода *Fritillaria*, например *F. meleagris* L. (Nikolic et al., 2008; и др.). Согласно нашим наблюдениям, для укоренения необходимо выдерживать микролуковички при температуре +7 °С в течение 5 дней или культивировать в условиях с температурным режимом +18 ± 2 °С. Оба режима укоренения оказались успешными и через три недели культивирования на среде с 5 мкМ НУК получили растения-регенеранты с развитой корневой системой (5–6 корней на побег). При дальнейшем культивировании на данной среде у регенерантов развивался побег с двумя листьями, луковички увеличивались в размере (см. рис. 1, *u*) (Эрст А.А., Эрст А.С., 2011).

Луковички *F. sonnikovae* проявили способность к укоренению на среде для размножения через 2–3 месяца культивирования. Быстрее луковички укоренялись на безгормональной среде с 1 мг/л АУ после выдерживания двух недель при +7 °С на фотопериоде (количество корней 1.3 ± 0.4, средняя длина корней 7.5 ± 1.7 мм, диаметр луковицы 3.0 ± 0.4 мм).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для размножения *F. dagana* оптимальным является прямая регенерация луковичек на среде В₅ + БАП 5 мкМ + НУК 2 мкМ, позволяющая в короткие сроки получить полностью сформированные растения-регенеранты. Массовая регенерация луковичек *F. sonnikovae* получена путем непрямого соматического эмбриогенеза на среде BDS + триптофан 100 мг/л + глутаминовая кислота 200 мг/л. Для полно-

го созревания соматических эмбрионидов необходимо увеличить период пассажа до 2–3 месяцев. Определяющим фактором в развитии корневой системы исследуемых видов является температурный режим.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Программы Президиума РАН “Живая природа: современное состояние и проблемы развития”, проект № 30.3.

ЛИТЕРАТУРА

- Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза у растений. М., 1964. С. 32–33.
- Ветчинкина Е.М. Биологические особенности культивирования *in vitro* семян и зародышей редких видов растений: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2010. 20 с.
- Вечернина Н.А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. Барнаул, 2004. 205 с.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М., 1990. 352 с.
- Николаева М.Г., Лянгузова И.В., Поздова Л.М. Биология семян. СПб., 1999. 232 с.
- Шалаев Е.А., Третьякова И.Н. Индукция соматического эмбриогенеза у ели саянской в культуре *in vitro* // Хвойные бореальной зоны. 2011. Т. 28, № 1–2. С. 69–71.
- Эрст А.А., Эрст А.С. Размножение *in vitro* редкого вида – *Fritillaria dagana* Turcz. ex Trautv. из луковичных чешуй // Turczaninowia. 2011. № 14(4). С. 90–93.
- Anis M., Faisal M., Singh S.K. Micropropagation of mulberry (*Morus alba* L.) through *in vitro* culture of shoot tip and nodal explants // Plant Tissue Cult. 2003. V. 13(1). P. 47–51.
- Arzate-Fernandez A.-M., Nakazaki T., Okumoto Y., Tanisaka T. Efficient callus induction and plant regeneration from filaments with anther in lily (*Lilium longiflorum* Thunb.) // Plant Cell Rep. 1997. V. 16, No. 12. P. 836–840.
- Chalupa V. *In vitro* propagation of *Tilia platyphyllos* by axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis // J. Forest Sci. 2003. V. 49(12). P. 537–543.
- Dunstan D.J., Short K.C. Improved growth of tissue cultures of the onion *Allium cepa* // Physiol. Plant. 1977. V. 41, No. 1, P. 26–34.
- Fennell C.W., Van Staden J. Biotechnology of southern African bulbs // S. Afr. J. Bot. 2004. V. 70. P. 37–46.
- Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. 1968. V. 46, No. 5. P. 417–421.
- Han B.H., Yu H.J., Yae B.W., Paek K.Y. *In vitro* micropropagation of *Lilium longifolium* ‘Georgia’ by shoot formation as influenced by addition of liquid medium // Sci. Hort. 2004. V. 103. P. 39–49.
- Kim E.K., Hahn E.J., Murthy H.N., Paek K.Y. High frequency of shoot multiplication and bulblet formation of garlic in liquid cultures // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2003. No. 73. P. 231–236.

- Li S.L., Lin G., Chan S.W., Li P.** Determination of the major isosteroidal in bulbs of *Fritillaria* by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection // *J. Chromatogr.* 2001. V. 909. P. 207–214.
- Maesato K., Sharada K., Fukui H., Hara T., Sarma K.S.** *In vitro* bulblet regeneration from bulb scale explants of *Lilium japonicum* Thumb. Effect of plant growth regulators and culture environment // *J. Hort. Sci.* 1994. V. 251. P. 199–204.
- Mirici S., Parmaksiz I., Ozcan S.** Efficient *in vitro* bulblet regeneration from immature embryos of endangered *Sternbergia fischeriana* // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2005. No. 80. P. 239–246.
- Mohammadi-Dehcheshmeh M., Khalighi A., Naderi R., Ebrahimie E., Sardari M.** Indirect somatic embryogenesis from petal explant of endangered wild population of *Fritillaria imperialis* // *Pak. J. Biol. Sci.* 2007. No. 10(11). P. 1875–1879.
- Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15, No. 2. P. 473–497.
- Nalawade S.M., Sagare A.P., Lee Ch.-Y., Kao Ch.-L., Tsay H.-Sh.** Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization // *Bot. Bull. Acad. Sin.* 2003. V. 44. P. 79–98.
- Nhut D.T., Le B.V., Minh T., de Silva J.T., Fukai S., Tanaka M., Van K.T.T.** Somatic embryogenesis through pseudobulblet thin cell layer of *Lilium longiflorum* // *Plant Growth Regul.* 2002. No. 37. P. 193–198.
- Nickerson N.L.** Promotion by tryptophan of growth and root formation in lowbush blueberry pericarp callus cultures // *Can. J. Bot.* 1980. V. 58(8). P. 881–885.
- Nikolic M., Masic D., Maksimovic V., Jevremovic S., Trifunovic M., Subotic A.** Effect of low temperature on rooting rate and carbohydrate content of *Fritillaria meleagris* bulbs formed in culture *in vitro* // *Arch. Biol. Sci.* 2008. No. 60(1). P. 5–6.
- Otani M., Shimada T.** Micropropagation of *Fritillaria camtschaticensis* (L.) Ker-Gawl., “Kuroyuri” // *Bull. RIAR, Ishikawa Agr. Coll.* 1997. No. 5. P. 39–44.
- Paek K.Y., Murthy H.N.** High frequency of bulblet regeneration from bulb scale sections of *Fritillaria thunbergii* // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2002. V. 68, Issue 3. P. 247–252.
- Petric M., Subotic A., Jevremovic S., Trifunovic M.** Somatic embryogenesis and bulblet regeneration in snakehead fritillary (*Fritillaria meleagris* L.) // *Afr. J. Biotech.* 2011. V. 10(72). P. 16181–16188.
- Rice L.J., Finnie J.F., Van Staden J.** *In vitro* bulblet production of *Brunsvigia undulate* from twin-scales // *S. Afr. J. Bot.* 2011. V. 77. P. 305–312.
- Subotic A., Trifunovic M., Jevremovic S., Petric M.** Morpho-histological study of direct somatic embryogenesis in endangered species *Fritillaria meleagris* // *Biol. Plantarum.* 2010. V. 54(3). P. 592–596.
- Sudharsan C., AboEl-Nil M., Hussain J.** *In vitro* propagation of *Ziziphus mauritiana* cultivar Umran by shoot tip and nodal multiplication // *Curr. Sci.* 2001. V. 80, No. 2. P. 290–292.