

УДК 633.18:577.2:57.088

UDC 633.18:577.2:57.088

03.00.00 Биологические науки

Biology

АПРОБАЦИЯ ISSR ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВИДА *GALANTHUS WORONOWII* LOSINSK.. И АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ РАСТЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO**

APPROBATION OF ISSR DNA-MARKERS FOR GENOTYPING OF *GALANTHUS WORONOWII* LOSINSK.. AND ANALYSIS OF GENETIC STABILITY OF PLANTS, OBTAINED BY IN VITRO CULTURE

Супрун Иван Иванович¹
к.б.н., зав. лабораторией, SPIN-код: 7124-5304

Suprun Ivan Ivanovich¹
Cand. Biol. Sci., Head of the laboratory, SPIN: 7124-5304

Маляровская Валентина Ивановна²
к.б.н., зав. лабораторией, SPIN-код: 1302-3070

Malyarovskaya Valentina Ivanovna²
Cand. Biol. Sci., Head of the laboratory, SPIN: 1302-3070

Степанов Илья Владимирович¹
м.н.с., SPIN-код: 3968-1982

Stepanov Iliia Vladimirovich¹
staff scientist, SPIN-code: 3968-1982

Коломиец Татьяна Михайловна²
к.с.х.н., доцент, ведущий научный сотрудник,
SPIN-код: 8205-3113

Kolomiyets Tatyana Mikhailovna²
Cand. Agr. Sci., docent, leading researcher; SPIN: 8205-3113

Самарина Лидия Сергеевна²
к.б.н., старший научный сотрудник, SPIN-код:
4781-4020

Samarina Lidia Sergeevna²
Cand. Biol. Sci., research sci. SPIN: 4781-4020

Слепченко Наталья Александровна¹
к.б.н., ученый секретарь, SPIN-код: 4912-4347
1 Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, Россия, г. Краснодар, ул. 40 лет Победы, 39. supruni@mail.ru
2 Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур, Россия, г. Сочи, ул. Яна Фабрициуса, 2/28. subplod@mail.ru

Slepchenko Natalia Aleksandrovna¹
Cand. Biol. Sci., Scientific secretary, SPIN: 4912-4347.
1 North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture, Russia, Krasnodar, 40 let Pobedy street, 39 supruni@mail.ru
2 All-Russian Scientific and Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops, Russia, Sochi, JanaFabrisiusa str., 2/28. subplod@mail.ru

В ходе работы была проведена оценка 33 ISSR маркеров на эффективность использования в выявлении генетических изменений в регенерантах подснежника Воронова (*Galanthus woronowii* Losinsk.). Установлено 10 маркеров перспективных для проведения генотипирования по исследуемому виду. По пяти маркерам из отобранных десяти был проведен анализ выборки из 20 растений-регенерантов и маточного растения. Полученные данные свидетельствуют о генетической стабильности растительного материала в процессе микроклонального

In the course of the work, 33 ISSR markers were evaluated for efficacy in the detection of genetic changes in regenerants of *Galanthus woronowii* Losinsk.. Ten markers were found suitable for genotyping according to the species under study. Five samples from the selected ten were analyzed for a sample of 20 plants of regenerants and a mother plant. The obtained data testify to genetic stability of plant material in the process of microclonal propagation

* Исследования проведены при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края (проект № 16-44-230274 p_a)

размножения

Ключевые слова: ISSR ДНК-МАРКЕРЫ, ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ, СТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНОТИПА *IN VITRO*, РЕДКИЕ ВИДЫ РАСТЕНИЙ, *GALÁNTHUS WORONOWII* LOSINSK

Keywords: ISSR DNA-MARKERS, GENETIC POLYMORPHISM, *IN VITRO* GENOTYPE STABILITY, RARE PLANTS, *GALÁNTHUS WORONOWII* LOSINSK

Doi: 10.21515/1990-4665-133-088

На территории Западного Кавказа сосредоточено большое количество (более 65 %) редких видов растений, подлежащих охране на государственном и региональном уровнях [1]. Поэтому особую актуальность имеют исследования по разработке методов сохранения растений, ареалы и численность которых резко снижается, а также для уникальных форм, расширяющих и улучшающих сортимент возделываемых растений.

Разрешение проблемы сохранения биоразнообразия возможно на основе всестороннего изучения редких и исчезающих видов растений, их биологических и экологических особенностей, тактики и стратегии выживания. Одной из составляющих стратегии сохранения редких видов, которая может ослабить или снять антропогенное давление, оказываемое на природные популяции таких видов, является введение их в культуру. При этом важную роль играет освоение различных способов их массового размножения [2]. В связи с чем наряду с традиционными способами сохранения растений *ex situ* все большее значение приобретает использование для этих целей культуры изолированных тканей и органов. Несомненно, привлечение методов биотехнологии, базирующихся на культивировании изолированных органов, тканей и клеток растений для решения проблем сохранения биологического разнообразия имеет преимущества перед традиционно используемыми подходами.

Одним из видов, подлежащих охране на территории Западного Кавказа, является подснежник Воронова (*Galanthus woronowii* Losinsk.).

Этот вид внесен в Красную книгу Краснодарского края и рекомендован к охране на территории Большого Сочи [3, 4]. Также он включен в Приложение II Международной Конвенции СИТЕС. Это эндемик, численность которого сокращается в результате чрезмерного использования его человеком. Встречается в Краснодарском крае на Черноморском побережье от Туапсе до реки Псоу, в Республике Адыгея (Гузерибль), в Ставропольском крае близ г. Ессентуки [3].

По мнению Слепченко Н.А. (2013) для размножения *Galanthus woronowii* необходимо в большей степени, чем для других луковичных (*Leucojum aestivum* и *Pancratium maritimum*) использовать методы культуры тканей, поскольку малый размер луковиц этого вида не позволяет размножать растения вегетативным способом [2].

Во ВНИИЦиСК (г. Сочи) проводятся исследования по разработке приемов размножения и сохранения редких и исчезающих видов Западного Кавказа в условиях *in vitro* [5-7]. С 2016 года начали проводиться работы по введению в условия культуры *in vitro* и эндемичного вида *G. woronowii*. Важным преимуществом разрабатываемой технологии размножения редких генотипов, в том числе и подснежника Воронова, в культуре *in vitro* должно явиться массовое воспроизводство генетически стабильных регенератов, не отличающихся по ряду морфологических, биохимических и генотипических признаков от исходных растений [8] (рисунок 1).



Рисунок 1 Микролуковички подснежника Воронова в культуре *in vitro*.

Однако при размножении культуры *in vitro* возникает опасность возникновения соматклональной изменчивости. Для мониторинга подобной ситуации необходимо проведение анализа, способного выявить генетические отклонения в размножаемом растительном материале [9].

В качестве метода быстрой и эффективной оценки генетического полиморфизма положительно себя зарекомендовали мультилокусные ISSR ДНК-маркеры. ISSR праймеры, комплементарные микросателлитным последовательностям генома, позволяют амплифицировать фрагменты ДНК, которые находятся между двух расположенных в достаточной близости микросателлитных локусов. И как следствие в процессе ПЦР синтезируется большое количество фрагментов ДНК, представленных на электрофореграмме в виде ДНК-фингерпринта [10].

В настоящее время в научной литературе имеется целый ряд примеров успешного использования мультилокусных ДНК-маркеров для проведения анализа растений, полученных путем микрклонального размножения, на предмет наличия у них генетических отклонений. Примером может послужить работа, проведенная с использованием 18

ISSR маркеров для скрининга полученных растений-регенерантов лилии восточной при микроклональном размножении в условиях *in vitro*. При этом уровень проявления генетических мутаций, вызванных микроклональным размножением был минимален [11]. В исследованиях Wang Q.M. с соавторами [12] по анализу генетической стабильности растений-регенерантов, относящихся к виду *Clivia miniata (Lindl.) Bosse*, ISSR маркеры также были использованы в качестве эффективного молекулярно-генетического «инструментария» для анализа генетической однородности регенерантов.

Так же наглядным примером эффективности применения ISSR маркеров для анализа генетической стабильности является работа группы исследователей из лаборатории лесной генетики и биотехнологии Нанкинского университета (Китай). В ходе проведения микроклонального размножения вида *Lilium longiflorum* Thunb. данным коллективом была осуществлена обработка адвентивных почек гамма-облучением с целью индицирования мутагенеза. Облученные растения-регенеранты и исходные растения были сопоставлены друг с другом с использованием ISSR ДНК-маркеров. Использованный в работе метод позволил выявить мутантные образцы, у которых в процессе последующей оценки по комплексу морфолого-анатомических признаков были установлены отличия от исходной формы [13]. В данной работе, в ходе апробации ISSR-маркеров, из 50 маркеров были отобраны только 7 наиболее информативных. Это подчеркивает необходимость в оценке достаточно большого числа ДНК - маркеров для успешного выявления наиболее информативных.

В связи с этим, целью нашего исследования являлось выполнение апробации 33 ISSR ДНК-маркера и последующий анализ генетической стабильности регенерантов подснежника Воронова, полученных путем микроклонального размножения, по технологии, разработанной в ВНИИЦиСК.

Материалы и методы. Для проведения ДНК-анализа были отобраны 20 растений-регенерантов из *in vitro* коллекции ВНИИЦиСК и маточное растение. Выделение ДНК проводилось стандартной ЦТАБ методикой из листьев [14].

В работе оценивали полиморфизм следующих ISSR-маркеров: UBC813, UBC864, UBC844, UBC843, UBC825, UBC818, UBC811, UBC845, UBC853, UBC826, UBC810, UBC817, UBC808, UBC824, UBC807, UBC815, UBC 27, UBC873, ASSR02, ASSR15, ASSR20, ASSR 29, 3A39, 3A21, 3A30, 3A35, 3A37, 3A59, M1, M8, X9, X11, X10 [15, 16]. ПЦР была проведена согласно следующей программе: 3 минуты предварительной денатурации при температуре 95 °С; последующие 35 циклов: денатурация 35 секунд при 95 °С, отжиг праймеров 1 минута при 50 °С, элонгация 1,5 минуты при 72 °С, и финальный цикл синтеза при температуре 72 °С в течение 5 минут. Концентрации реагентов в ПЦР смеси: 2,5 мкл 10-кратного буфера для Taq ДНК-полимеразы (ООО «Сибэнзим», Россия), 0,5 или 2,5 мкл dNTP (2,5 мМ), 1 единица активности Taq ДНК-полимеразы, 2 мкл праймера (3,75 мМ) и 40-50 нг тотальной ДНК в общем объеме 25 мкл. Электрофорез ПЦР-продуктов проводился в 2,5 % агарозном геле при напряжении 100 В.

Результаты и обсуждение. Для пополнения сведений об эффективных ISSR маркерах для генотипирования образцов подснежника Воронова были апробированы как новые, ранее не использовавшиеся в работе ISSR, так и задействованные нами в предыдущем исследовании [17], но с измененными условиями ПЦР (рисунок 2). В проведённой работе эффективность ISSR маркеров оценивалась по общему количеству амплифицированных ДНК-фрагментов и степени их выраженности на электрофореze.

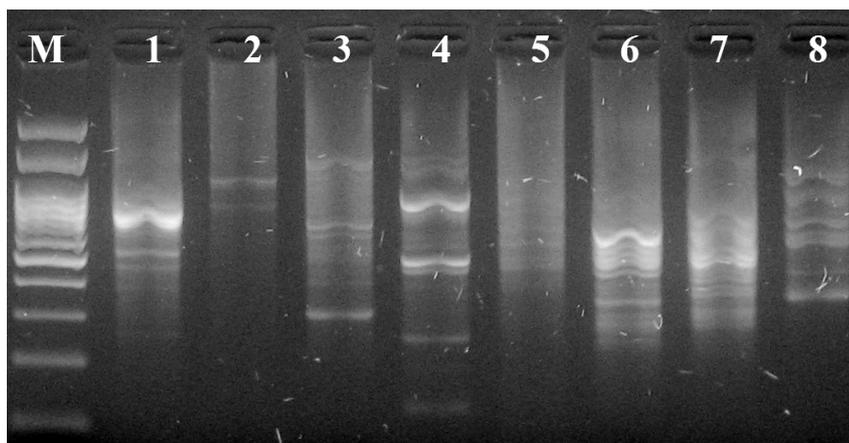


Рисунок 2 Электрофоретические спектры ISSR-маркеров подснежника Воронова.

Примечание: М – маркер молекулярной массы ДНК; 1 - UBC864, 2 - UBC815, 3 - UBC827, 4 - ASSR29, 5 - UBC813, 6 - UBC818, 7 - UBC811, 8 - ASSR02

Из 24 маркеров, ранее не использовавшихся для генотипирования образцов подснежника Воронова, по 7 ISSR маркерам (3A39, 3A30, M8, UBC826, X11, UBC807, ASSR20) амплификация не была выявлена. Их дальнейшее использование для генотипирования целевого вида бесперспективно. В свою очередь, девять маркеров, по которым прошла ПЦР, имели различное качество амплифицированных фрагментов. В зависимости от качества фингерпринтов, маркеры были разделены на группы по приоритетности их использования в генотипировании подснежника Воронова (таблица 1). По результатам анализа по ряду маркеров были получены минорные ДНК фрагменты с недостаточной степенью выраженности. К таким маркерам можно отнести UBC817, UBC824, 3A37, X9, UBC853, X10, UBC815, UBC873. Использование фингерпринтов по данным маркерам для генотипирования образцов нежелательно из-за возможного возникновения ошибок при анализе результатов, связанных с плохим качеством детектируемых фрагментов в электрофоретическом спектре. Маркеры, имеющие только минорные фрагменты, вошли в IV и III группы приоритетности. Исключение составил маркер X10, который был включен в группу II из-за большого количества минорных фрагментов. Остальные маркеры, отнесенные во II

группу, при генотипировании образцов подснежника Воронова дали четкие ДНК-фрагменты, однако количество фрагментов было недостаточно для включения маркеров в I группу. В I группу вошли три маркера, имеющие наиболее качественные фингерпринты по образцам подснежника Воронова. К I группе отнесены маркеры: UBC844, UBC843, 3A59. Также помимо новых, ранее не применявшихся на генотипах подснежника Воронова ISSR маркеров в работе были задействованы прежде апробированные на данном виде маркеры, но с использованием новых условий ПЦР, в частности была увеличена концентрация dNTPc0,5 до 2,5 mM. В эту группу входят 9 маркеров: UBC813, UBC864, ASSR29, UBC825, UBC818, UBC811, ASSR02, ASSR15, UBC827.

Таблица 1 Количество фрагментов в спектрах апробированных ISSR-маркеров у вида *Galánthus wóronowii* Losinsk.

№	Маркеры	Общее количество фрагментов	Количество минорных фрагментов	Приоритет использования*
1	UBC 813	0	0	-
2	UBC 864	4	2	I
3	UBC 844	9	5	I
4	ASSR 29	4	0	I
5	UBC 843	5	2	I
6	UBC 825	3	2	III
7	UBC 818	6	3	I
8	UBC 811	7	4	I
9	ASSR02	6	1	I
10	ASSR15	2	0	I
11	ASSR20	0	0	-
12	3A39	0	0	-
13	3A21	3	2	III
14	UBC 810	1	0	IV
15	UBC 817	3	3	III
16	UBC 808	2	0	II
17	UBC 824	5	5	IV
18	3A30	0	0	-
19	3A35	4	3	III
20	3A37	7	7	III
21	3A59	5	2	I
22	M1	1	0	II
23	M8	0	0	-
24	X9	3	3	III
25	UBC 845	5	2	III
26	UBC 853	2	2	III
27	UBC 826	0	0	-
28	X 11	0	0	-
29	UBC 807	0	0	-
30	X 10	7	7	II
31	UBC 815	1	1	IV
32	UBC 827	6	2	I
33	UBC 873	4	4	II

В большинстве случаев качество фингерпринтов использованных маркеров улучшилось за счет изменения параметров ПЦР. Исключение составили маркеры UBC813 и ASSR15. Маркер UBC813 не выявил дискретных фрагментов в спектре и его использование для искомого вида бесперспективно. По маркеру ASSR15 при новых параметрах ПЦР также не было выявлено увеличения фрагментов в спектре, при высоком качестве амплификации. У остальных маркеров количество ДНК фрагментов варьировало от 3 у UBC825 до 8 у UBC818, что делает их перспективными для проведения генотипирования. Поэтому, они были включены в группу приоритета I. Таким образом, в ходе оценки информативности ISSR маркеров было определено 10 маркеров, имеющих высокую информативность при проведении генотипирования образцов подснежника Воронова. Из числа этих маркеров было выбрано пять образцов подснежника Воронова для проведения анализа на генетическую стабильность в процессе микрклонального размножения: 3A59, ASSR 02, UBC843, ASSR29, UBC818 (Рисунок 3). Анализ был проведен на выборке, включающей 20 растений-регенерантов и исходное растение, послужившее донором эксплантов.

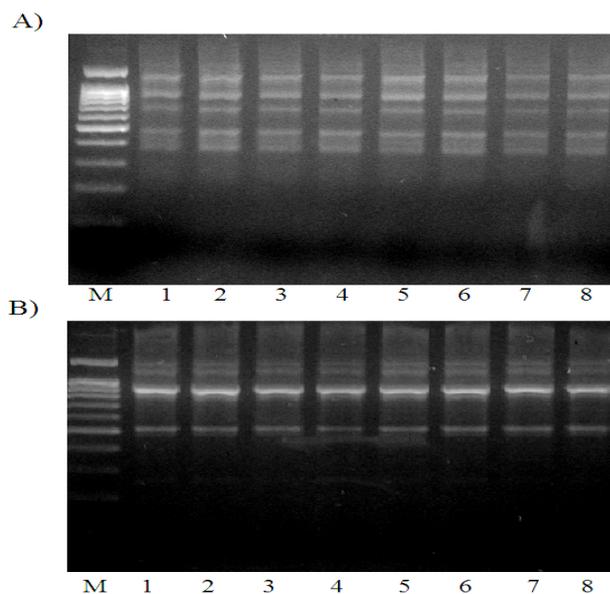


Рисунок 3 Генотипирование растений - регенерантов подснежника
Воронова по маркерам UBC843 (A) и ASSR29 (B)

Примечание: М-маркер молекулярной массы ДНК, 1 - маточное растение,
2-8 - растения регенеранты.

По всем маркерам для всех изученных растений-регенерантов наблюдались идентичные ДНК-фингерпринты, что свидетельствует о генетической однородности клонов и их генетической идентичности с исходным растением-донором эксплантов.

Выводы. Проведенная работа позволила выявить перспективные ISSR маркеры для генотипирования вида *Galanthus woronowii*. На основе набора установленных эффективных ДНК-маркеров был проведен анализ выборки из 20 растений-регенерантов и донорного растения. Выявленная генетическая однородность растений-регенерантов, полученных в культуре *in vitro*, установленная методом ISSR-генотипирования, позволяет утверждать, что технология размножения подснежника Воронова *in vitro*, разработанная во ВНИИЦиСК не влияет на генетическую структуру регенерантов. Ее использование не приведет к генетическому вырождению *in vitro* линий в череде поколений микроклонально размноженных растений. Наряду с оценкой генетической

стабильности растений-регенерантов, отобранные нами в ходе исследования ISSR ДНК-маркеры могут быть успешно использованы при анализе генетической структуры природных популяций данного вида, что обладает высокой актуальностью, учитывая его охранный статус.

Литература

1. Тимухин И.Н. Флора сосудистых растений Сочинского национального парка // Инвентаризация основных таксономических групп и сообществ, зоологические исследования Сочинского национального парка – первые итоги первого в России национального парка. Монография. М.: «Престиж», 2006. С. 41–84.

2. 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.

3. Красная книга Краснодарского края. Том Растения и грибы. — Краснодар: ООО «Дизайн Бюро № 1», 2007. — 489 с.

4. Солодько А.С., Кирий П.В. Красная книга Сочи. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды. Том 1. Растения и грибы. - Сочи, 2002. 148 с.

5. Маляровская В.И., Коломиец Т.М., Соколов Р.Н., Самарина Л.С. Влияние спектрального состава света на рост и развитие *Lilium caucasicum* в условиях культуры *in vitro* // Политематический сетевой электронный научный журнал КубГАУ. - 2013. - № 94. – С. 1016-1026.

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

7. Самарина Л.С., Коломиец Т.М., Слепченко Н.А. Сохранение *in vitro* исчезающего псаммофита черноморского побережья России *Pancreatum maritimum* // Субтропическое и декоративное садоводство. — 2012. - Вып. 47.— С. 172-177.

8. Супрун И.И., Коломиец Т.М., Соколов Р.Н., Маляровская В.И., Самарина Л.С. Поиск оптимальных ISSR маркеров для проведения генотипирования панкреатия морского // Плодоводство и виноградарство Юга России, 2014. - № 30(06).

9. 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. – Том 12. – № 4. – С. 564-572.

10. Morgante, M. PCR-amplified microsatellite markers in plant genetics M. Morgante, A.M. Oliveri // Plant J. – Vol. 3. - 1993. - P. 175-182.

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

12. Wang Q.M., Gao F., Gao X. Regeneration of *Clivia miniata* and assessment of clonal fidelity of plantlets // *Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult.* 2012.-Vol.109. P.191–200.

13. M. Xi, Sun L., Qiu S. *In vitro* mutagenesis and identification of mutants via ISSR in lily (*Lilium longiflorum*) // *Plant Cell Rep* – 2012.- Vol.31- P.1043–1051.

14. Doyle, J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochem. Bull.* – Vol. 19. – 1987. P. 11-15.

15. Arzate-Fernandez, A.M. Miwa M., Shimada T., Yonekura T., Ogawa K. Genetic diversity of Miyamasukashi-yuri (*Lilium maculatum* Thunb. var. *bukosanense*), an endemic

and endangered species at Mount Buko, Saitama, Japan // *Plant Species Biology*. – 2005. – № 20. – P. 57–65.

16. Krishna Parvathaneni, R., Natesan S., Arunachalam Devaraj A., Muthuraja R., Venkatachalam R., Prathap Subramani A., Laxmanan P. Fingerprinting in Cucumber and Melon (*Cucumi* spp.) Genotypes Using Morphological and ISSR Markers / R. Krishna Parvathaneni, // *J. Crop Sci. Biotech.* – 2011. – № 1. – P. 39-43.

17. Супрун И. И., Коломиец Т.М., Малярковская В.И., Соколов Р.Н., Самарина Л.С., Слеченко Н.А. Апробация ISSR ДНК-маркеров для генотипирования редких видов растений Западного Кавказа: *Lilium caucasicum* Miscz. Ex Grossh., *Galánthus woronowii* Kolak., *Panocratium maritimum* // Научный журнал КубГАУ, №103(09), 2014 года <http://ej.kubagro.ru/2014/09/pdf/37.pdf>

References

1. Timukhin I.N. Flora sosudistyxh rasteniy Sochinskogo natsional'nogo parka // Inventarizatsiya osnovnykh taksonomicheskikh grupp I soobshchestv, sozologicheskkiye issledovaniya Sochinsko gonatsional'nogo parka – pervyye itogi pervogo v Rossiinatsional'nogo parka. Monografiya. M.: «Prestizh», 2006. P. 41–84.

2. Slepchenko N.A. Redkiye I ischezayushchiye vidy semeystva Amaryllidaceae Jaume Saint-Hilaire na chernomorskom poberezh'ye Rossii I strategiya ikh sokhraneniya: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk: 03.02.08, 03.02.01 / Slepchenko Natal'ya Aleksandrovna. – Makhachkala, 2013. – P.23.

3. Krasnaya kniga Krasnodarskogo kraya. Tom Rasteniya i griby. — Krasnodar: OOO «Dizayn Byuro № 1», 2007. — P.489.

4. Solod'ko A.S., Kiriya P.V. Krasnaya kniga Sochi. Redkiye I nakhodyashchiyesya pod ugrozoy ischeznoveniya vidy. Tom 1. Rasteniya I griby // Sochi, 2002. – P.148.

5. Malyarovskaya V.I., Kolomiyets T.M., Sokolov R.N., Samarina L.S. Vliyaniye spektral'nogo sostava sveta na rost I razvitiye *Lilium caucasicum* v usloviyakh kul'tury in vitro // *Politematicheskyy setevoy elektronnyy nauchnyy zhurnal KubGAU*. Krasnodar, 2013. - № 94. – P. 1016-1026.

6. Sokolov, R.N., Kolomiyets T.M., Malyarovskaya V.I. Vvedeniye v kul'turu in vitro nekotorykh redkikh I ischezayushchikh vidov flory Zapadnogo Kavkaza // *Nauchnyy zhurnal KubGAU*. – 2013. – №94(10). – P. 1-17.

7. Samarina L.S., Kolomiyets T.M., Slepchenko N.A. Sokhraneniye in vitro ischezayushchego psammofita chernomorskogo poberezh'ya Rossii *Panocratium maritimum* // *Subtropicheskoye I dekorativnoye sadovodstvo: sb. nauch. tr. / GNU VNIITsiSK Rossel'khozakademii.*— 2012. №. 47.— P. 172-177.

8. Suprun I.I., Kolomiyets T.M., Sokolov R.N., Malyarovskaya V.I., Samarina L.S. Poiskoptimal'nykh ISSR markerov dlya provedeniya genotipirovaniya pankratsiyamorskogo // *Plodovodstvo I vinogradarstvo Yuga Rossii*, 2014. - № 30(06).

9. Novikova, T.I. Sokhraneniye redkikh ipoleznykh asteniy v kollektzii in vitro Tsentral'nogo Sibirskogo botanicheskogo sada / T.I. Novikova, A.YU. Nabyeva, T.V. Poluboyarova // *Vestnik VOGiS*. – 2008. – V.12. – № 4. – P. 564-572.

10. Morgante, M. PCR-amplified microsatellite markers in plant genetics M. Morgante, A.M. Oliveri // *Plant J.* – Vol. 3. - 1993. - P. 175-182.

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

12. Wang Q.M., Regeneration of *Clivia miniata* and assessment of clonal fidelity of plantlets /Q. Wang, F. Gao, X. Gao // *Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult.* 2012.-Vol.109. P.191–200.

13. M. Xi, In vitro mutagenesis and identification of mutants via ISSR in lily (*Lilium longiflorum*) / M. Xi, L. Sun, S. Qiu // Plant Cell Rep – 2012.- Vol.31- P.1043–1051

14. Doyle, J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // Phytochem. Bull. – Vol. 19. – 1987. P. 11-15.

15. Arzate-Fernandez, A.M. Genetic diversity of Miyamasukashi-yuri (*Lilium maculatum* Thunb. var. bukosanense), an endemic and endangered species at Mount Buko, Saitama, Japan / A.M. Arzate-Fernandez, M. Miwa, T. Shimada, T. Yonekura and K. Ogawa // Plant Species Biology. – 2005. – № 20. – P. 57–65.

16. Krishna Parvathaneni, R. Fingerprinting in Cucumber and Melon (*Cucumis* spp.) Genotypes Using Morphological and ISSR Markers / R. Krishna Parvathaneni, S. Natesan, A. Arunachalam Devaraj, R. Muthuraja, R. Venkatachalam, A. Prathap Subramani, P. Laxmanan // J. Crop Sci. Biotech. – 2011. – № 1. – P. 39-43.

17. Suprun I. I. Kolomiyets T M, Malyarovskaya V I Aprobatsiya ISSR DNK-markerov dlya genotipirovaniya redkikh vidov rasteniy zapadnogo kavkaza: *Lilium caucasicum* Miscz. Ex Grossh., *Galánthus woronowii* Kolak., *Panocratium maritimum* /Suprun I I, i dr. // Nauchnyy zhurnal KubGAU, №103(09), 2014 goda <http://ej.kubagro.ru/2014/09/pdf/37.pdf>