

УДК 633.18:577.2:57.088

UDC 633.18:577.2:57.088

АПРОБАЦИЯ ISSR ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ ЗАПАДНОГО КАВКАЗА: *LILIUM CAUCASICUM* MISCZ. EX GROSSH., *GALÁNTHUS WORONOWII* KOLAK., *PANCRATIUM MARITIMUM* L.

APPROBATION OF ISSR DNA-MARKERS FOR GENOTYPING OF RARE PLANTS SPECIES OF THE WESTERN CAUCASUS: *LILIUM CAUCASICUM* MISCZ. EX GROSSH., *GALÁNTHUS WORONOWII* KOLAK., *PANCRATIUM MARITIMUM* L.

Супрун Иван Иванович
к.б.н., зав. лабораторией
Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, Россия, г. Краснодар, ул. 40 лет Победы, 39. supruni@mail.ru

Suprun Ivan Ivanovich
Cand.Biol.Sci., Head of the laboratory
North-Caucasian Zonal Research Institute of Horticulture and Viticulture, Russia, Krasnodar, 40 let Pobedy street, 39
supruni@mail.ru

Коломиец Татьяна Михайловна
к.с.х.н., доцент, ведущий научный сотрудник

Kolomiyets Tatyana Mikhailovna
Cand.Agr.Sci., associate professor, leading researcher

Маляровская Валентина Ивановна
к.б.н., зав. лабораторией

Malyarovskaya Valentina Ivanovna
Cand.Biol.Sci., Head of the laboratory

Соколов Роман Николаевич
аспирант

Sokolov Roman Nikolayevich
postgraduate student

Самарина Лидия Сергеевна
к.б.н., младший научный сотрудник

Samarina Lidia Sergeevna
Cand. Biol. Sci., Junior research scientist

Слепченко Наталья Александровна
к.б.н., ученый секретарь
Всероссийский научно-исследовательский институт цветочных и декоративных культур, Россия, г. Сочи, ул. Яна Фабрициуса, 2/28. subplod@mail.ru

Slepchenko Natalja Aleksandrovna
Cand.Biol.Sci., Scientific secretary
All-Russian Scientific and Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops, Russia, Sochi, Jan Fabrisius str., 2/28. subplod@mail.ru

В ходе исследований, было апробировано 11 ISSR ДНК-маркеров. Выполнена оценка перспективности их использования для выполнения ДНК - фингерпринтинга редких и исчезающих видов Западного Кавказа, таких как *Lilium caucasicum* Misch. Ex Grossh., *Galánthus woronowii* Kolak., *Panocratium maritimum* L. Был выявлен ряд маркеров, перспективных для дальнейшего использования в генотипировании целевых видов

The study was aimed on approbation of 11 ISSR DNA-markers for their using in DNA fingerprinting of rare plant species of the Western Caucasus *Lilium caucasicum* Misch. Ex Grossh., *Galánthus woronowii* Kolak., *Panocratium maritimum* L. according to results DNA-markers set was selected for further using in the investigation of genetic diversity of the mentioned plant species

Ключевые слова: ISSR ДНК-МАРКЕРЫ, ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ, СТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНОТИПА *IN VITRO*, РЕДКИЕ ВИДЫ РАСТЕНИЙ, *LILIUM CAUCASICUM* MISCZ. EX GROSSH., *GALÁNTHUS WORONOWII* KOLAK., *PANCRATIUM MARITIMUM* L.

Keywords: ISSR DNA-MARKERS, GENETIC POLYMORPHISM, *IN VITRO* GENOTYPE STABILITY, RARE PLANTS, *LILIUM CAUCASICUM* MISCZ. EX GROSSH., *GALÁNTHUS WORONOWII* KOLAK., *PANCRATIUM MARITIMUM* L.

Флора сосудистых растений Западного Кавказа является одной из самых представительных в плане биоразнообразия в пределах Российской Федерации и юго-западной Евразии в целом [8]. Западнокавказский

биосферный регион хорошо известен уникальными ландшафтами, богатой и разнообразной флорой. Поэтому становится очевидной необходимость сохранения всего этого многообразия экосистем насыщенных реликтовыми и эндемичными таксонами, подавляющее большинство которых относится к категориям «редкие» и «исчезающие» и внесены в Красные книги Краснодарского края и России.

В связи с решением задачи, сохранения видового многообразия растительного мира первоочередного внимания требуют наиболее уязвимые биологические виды, т.е. виды растений, являющиеся редкими в силу естественных особенностей или оказавшиеся под угрозой исчезновения в результате прямого или косвенного влияния человеческой деятельности. Их сохранение имеет большое значение для поддержания экологического равновесия. Особенно актуально это для растений, представляющих практическую ценность, например, доноров ценных признаков для практической селекции или продуцентов химических соединений с биологической активностью.

При решении проблемы сохранения генофонда растений успешно используются методы биотехнологии растений, включающие клональное микроразмножение и другие методы *in vitro*, в основе которых лежит уникальная тотипотентность растительной клетки, т. е. способность растения к вегетативной регенерации из соматических клеток [4].

При этом, по мнению некоторых исследователей, существует необходимость построения прогнозируемой модели морфогенеза регенерантов, исключающей возникновение соматической изменчивости [6]. Важным преимуществом разрабатываемой технологии размножения редких генотипов в культуре *in vitro* должно явиться массовое воспроизводство генетически стабильных регенерантов, не отличающихся по ряду морфологических, биохимических и генотипических признаков от исходных растений.

Выявление возможной изменчивости, возникающей при культивировании *in vitro*, может быть обеспечено применением наиболее воспроизводимых и доступных методов экспресс-анализа геномного полиморфизма. Использование молекулярно-генетических методов крайне актуально для решения данной задачи при необходимости контроля генетической стабильности медленно растущих и длительно хранящихся образцов при создании банков *in vitro* [1]. ДНК-маркеры обладают существенными преимуществами по сравнению с морфологическими маркерами: они позволяют выявлять полиморфизм генома, дают возможность вести анализ по значительному числу локусов [3].

Положительно себя зарекомендовали при изучении генетического полиморфизма на внутривидовом уровне мультилокусные ISSR ДНК-маркеры. ISSR праймеры комплементарны микросателлитным последовательностям генома. Они позволяют амплифицировать фрагменты ДНК, которые находятся между двумя достаточно близко расположенными микросателлитными локусами (как правило, это уникальная ДНК). В результате амплифицируется большое число фрагментов, представленных на электрофореграмме дискретными полосами (ISSR-фингерпринтинг) [15].

Выявляемый полиморфизм с использованием праймеров ISSR более четко воспроизводим, чем в RAPD. Относительно высокая точность и улучшенная воспроизводимость по сравнению с RAPD связана с большей длиной праймера и более высокой температурой отжига. Однако локализация в геноме продуктов амплификации, так же как и функция, остаются неизвестными. Подобно RAPD маркерам для ISSR характерен доминантный тип наследования [5].

Следует отметить, что при использовании конкретных ISSR-маркеров впервые применительно к какому-либо виду, важным этапом является первичная апробация. Зачастую на данном этапе существенная

часть маркеров, из всех апробированных может быть выбракована в виду их низкой информативности. Поэтому апробация – это важный этап исследований такого рода.

На сегодняшний день известен целый ряд примеров применения данного типа ДНК-маркеров в изучении генетического разнообразия как культурных растений, так и природных популяций дикорастущих видов [13, 16].

Из современной научной литературы известен ряд работ, посвященных изучению генетического разнообразия представителей рода *Lilium*. Исследования группы авторов из Китая, направленные на изучение генетического разнообразия лилии карликовой в Тибетском регионе, позволили, с помощью ISSR-анализа, определить генетическую структуру 28 субпопуляций этого вида и степень их генетической близости в пределах данного региона [18]. Аналогичное исследование было выполнено и для ряда других видов этого рода: *Lilium tsingtauense*, и *Lilium maculatum* Thunb. var. *Bukosanense* [9]. В изучении генетического разнообразия панкрация морского – в средиземноморской части его ареала также использовали ДНК-маркерный анализ, при этом в качестве ДНК-маркерной системы использовали не только ISSR, но также мультилокусную систему – AFLP маркеры, и, кроме того, секвенирование фрагментов пластидного генома [10, 12].

Наряду с изучением генетического разнообразия природных популяций растений, в том числе редких и исчезающих видов, ISSR-анализ широко используется также и при оценке стабильности генома в процессе культивирования *in vitro*. Особенно стоит выделить, целый ряд работ, посвященных анализу стабильности генома при размножении *in vitro* различных видов лилий, обладающих ценными декоративными качествами. Так, в ходе эксперимента по оптимизации условий культивирования *in vitro* лилии восточной, исследователями проводился

контроль генетического сходства полученных растений-регенерантов и растений-доноров эксплантов с использованием ISSR-маркеров [14]. В другом, аналогичном исследовании Zhen F. Y. и др. (2013), в ходе, которого оптимизировали культуральные условия для прямой регенерации из базальных сегментов листа, на завершающем этапе исследования, все полученные растения-регенеранты были протестированы с использованием ISSR анализа на генетическую однородность [19].

Очевидно, что ISSR-маркеры эффективно используются в мировой научной практике для изучения генетического разнообразия естественного генофонда дикой флоры, а также для установления генетической стабильности при сохранении и создании медленнорастущих коллекций редких и исчезающих видов в культуре тканей. Во ВНИИЦиСК (г. Сочи) проводятся исследования по усовершенствованию приемов размножения и сохранения эндемичных видов растений Западного Кавказа в условиях *in vitro* [7]. Следует отметить, что для видов Западного Кавказа – *Lilium caucasicum* Misch. ex Grossh., *Galánthus woronowii* Kolak., *Pancratium maritimum* L. в мировой научной литературе отсутствует информация об эффективных ISSR маркерах, позволяющих выполнять исследования в данных направлениях. В связи с этим, вопрос поиска эффективных ISSR маркеров для генетической паспортизации данных видов, является актуальным.

Материал и методы исследований

Объектами исследований служили фрагменты листьев растений-регенерантов, а также растений из природных популяций *Lilium caucasicum* Misch. ex Grossh., *Galánthus woronowii* Kolak., *Pancratium maritimum* L.

В ходе апробации варьировали различные экспериментальные параметры: компонентный состав ПЦР смеси (концентрация праймеров, дезоксинуклеотидтрифосфатов, ДНК) и температурно-временные

параметры реакции, что позволило оптимизировать условия проведения экспериментов.

ДНК была экстрагирована из листьев с использованием метода ЦТАБ, основанного на применении цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ) в качестве основного детергирующего компонента лизирующего буфера [11, 17].

В работе использовали ISSR ДНК-маркеры UBC811, UBC813, UBC818, UBC825, UBC827, UBC864, UBC880-[13,16], ASSR-02, ASSR-15, ASSR-22, ASSR-29- [9].

ПЦР была проведена согласно следующей программе: 3 минуты предварительной денатурации при температуре 94 °С; последующие 35 циклов: денатурация 35 с при 94 °С, отжиг праймеров 1 минута при 50 °С (для ISSR-маркеров UBC811, UBC813, UBC818, UBC825, UBC827, UBC864 и UBC880) и 47 °С (для ISSR-маркеров ASSR-02, ASSR-15, ASSR-22, ASSR-29), элонгация 1,5 минуты при 72 °С, и финальный цикл синтеза при температуре 72 °С в течение 5 минут.

ПЦР смесь включала: 2.5 мкл 10-кратного буфера для Taq ДНК-полимеразы (ООО «Сибэнзим, Россия»), 0,5 мкл dNTP (2,5 мМ), 1 единица активности Taq ДНК-полимеразы, 2 мкл праймера (3,75 мМ) и 50-100 нг тотальной ДНК. Амплификацию проводили в ДНК – амплификаторе Eppendorf Mastercycler gradient. Анализ продуктов амплификации проводился с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле в 0,5 кратном Трис Боратном буфере. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолете.

Результаты.

В связи с отсутствием данных об информативных ISSR ДНК-маркерах для исследуемых видов и имеющихся в литературе научных сведений о таксономически близких видов из рода Лилия, нами был отобран ряд маркеров обладающих высокой информативностью у

представителей рода Лилия: ASSR-02, ASSR-15, ASSR-22, ASSR-29 [9] и маркеры, для которых установлен высокий уровень воспроизводимости при анализе разных, таксономически отдаленных видов цветковых растений UBC811, UBC813, UBC818, UBC825, UBC827, UBC864 и UBC880 [13,16].

При оценке информативности, на первом этапе исследования, учитывали общее количество амплифицированных фрагментов в спектре на электрофореграммах. По результатам исследования, ISSR-маркеры, у которых отсутствовала амплификация, либо выявлялись лишь минорные фрагменты с низким уровнем синтеза, были определены как неперспективные. На рисунке 1 приведен пример электрофоретического разделения продуктов амплификации маркера – UBC 880 для исследуемых видов (Рис. 1).

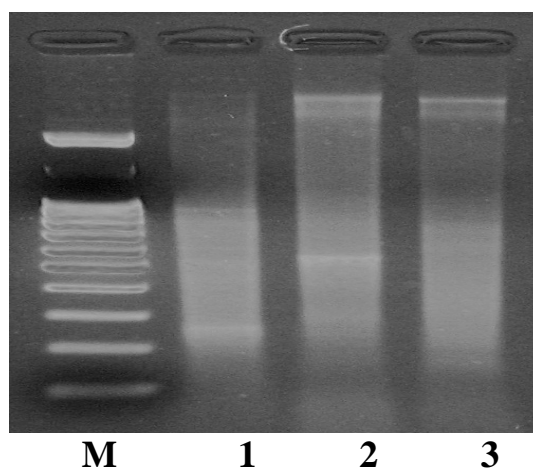


Рис. 1. Электрофоретический анализ продуктов амплификации ISSR маркера UBC880. М – маркер молекулярной массы ДНК, 1 – *Galánthus woronowii*, 2 – *Pancratium maritimum*, 3 – *Lilium caucasicum*.

Как видно из рисунка, для всех изучаемых видов наблюдался слабый уровень амплификации, выраженный в отсутствии четких фрагментов на электрофореграмме.

Для повышения выхода амплифицированных фрагментов маркеров этой категории проводили снижение температуры отжига праймеров на 3-5 °С, увеличение продолжительности цикла отжига праймеров и цикла

элонгации, однако это не привело к каким-либо значимым положительным изменениям.

Для ряда маркеров было идентифицировано наличие незначительного количества амплифицированных фрагментов, хотя и обладающих достаточным для достоверной идентификации уровнем четкости фрагментов на электрофоретических спектрах. Пример маркеров из данной группы: UBC825, UBC827 и UBC864 (Рис. 2).

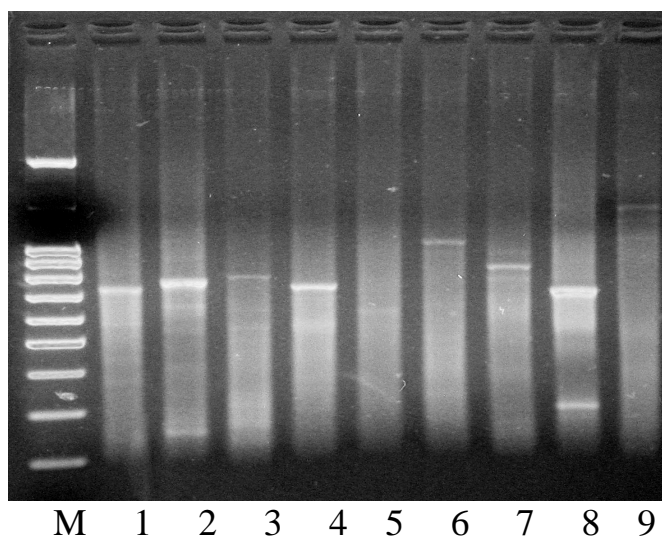


Рис. 2. Электрофоретический анализ продуктов амплификации ISSR маркеров UBC825(1-3), UBC827(4-6) и UBC864 (7-9). М – маркер молекулярной массы ДНК, 1,4,7 – *Galánthus woronowii*, 2, 5, 8 – *Pancratium maritimum*, 3, 6, 9 – *Lilium causicum*.

По маркерам UBC825, UBC827 и UBC864 у всех исследуемых видов растений нами был выявлен высокий уровень (100 %) воспроизводимости спектров электрофореграмм и высокая их четкость, позволяющая достоверно идентифицировать наличие специфичных ампликонов. Однако данная группа маркеров не является оптимальной для использования в соответствии с поставленной нами задачей. Это обусловлено, тем, что наличие в электрофоретических спектрах единичных фрагментов и, соответственно, наличие единичных сайтов отжига для праймеров в геноме изучаемых видов, не позволяет эффективно оценить их генетический полиморфизм.

Следовательно, для оценки генетического полиморфизма необходимо оптимальное использование ISSR маркеров, которые позволяют получать наибольшее количество фрагментов амплификации. По результатам наших исследований к такой категории отнесен ISSR-маркер ASSR29 (Рис. 3).

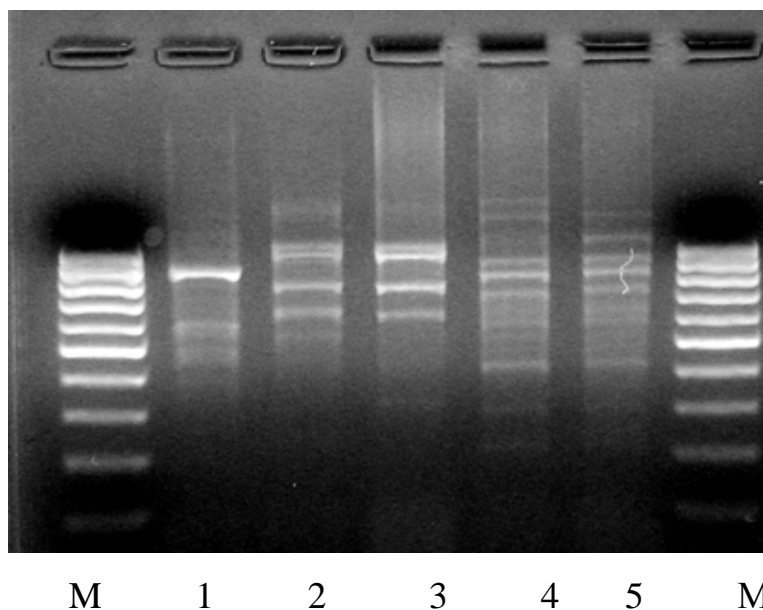


Рис. 3. Электрофоретический анализ продуктов амплификации ISSR маркера ASSR29. М – маркер молекулярной массы ДНК, 1 – *Galánthus woronowii*, 2,3 – *Pancratium maritimum*, 4,5 – *Lilium caucasicum*.

ISSR-маркеры, с количеством фрагментов в спектре и «качеством» амплификации не ниже чем по маркеру ASSR29, наиболее перспективны для использования при генотипировании.

Обобщенные результаты, отражающие характеристики ISSR спектров у представителей видов дикой флоры, приведены в таблице 1.

Таблица 1. Количество фрагментов в ISSR-спектрах у апробированных маркеров

Вид ISSR-маркер	<i>Galánthus wóronowii</i>	<i>Pancratium maritimum</i>	<i>Lilium caucasicum</i>
UBC-811	3(1)*	2	0
UBC-813	3	6(4)	1
UBC-818	7(2)	3(1)	5(1)
UBC-825	1	2(1)	1
UBC-827	1	0	1
UBC-864	2	2	2
UBC-880	3(2)	1	0
ASSR-02	5(2)	4(2)	5
ASSR-15	5(1)	6	2
ASSR-22	6(2)	3(2)	5(5)
ASSR-29	3	6(2)	7(3)

* - указано общее количество фрагментов в спектре и количество минорных фрагментов (в скобках).

На основании полученных экспериментальных данных о количестве амплифицированных фрагментов, а также о количестве фрагментов с высоким уровнем амплификации и низким уровнем (минорные фрагменты), нами определены перспективные ISSR-маркеры для генотипирования редких и исчезающих видов: подснежника Воронова *Galánthus wóronowii*: UBC-813, UBC-818, ASSR-02, ASSR-15, ASSR-22, ASSR-29; панкреатия морского *Pancratium maritimum*: UBC-813, ASSR-02, ASSR-15, ASSR-29; лилии Кавказской *Lilium caucasicum*: UBC-818, ASSR-02, ASSR-22, ASSR-29.

Заключение

Таким образом, в результате выполненных исследований, были определены ISSR маркеры, перспективные для использования при

генотипировании видов *Lilium caucasicum* Misch. ex Grossh., *Galánthus woronowii* Kolak., *Pancratium maritimum* L. и оптимизированы экспериментальные параметры ПЦР и электрофореза для отобранных маркеров. Полученные результаты будут в дальнейшем использованы при изучении генетического разнообразия данных видов и анализа стабильности генома при культивировании *in vitro* с использованием ISSR ДНК-маркерной системы.

Исследования проведены при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края (проект № 13-04-96572).

Литература

1. Артюкова, Е.В. Анализ генетической изменчивости редкого эндемичного вида *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (*Fabaceae*) на основе RAPD-маркеров / Е.В. Артюкова, А.Б. Холина, М.М. Козыренко, Ю.Н. Журавлев // Генетика. – 2004. – Т. 40. – № 7. – С. 877-884.
2. Боронникова С.В. Молекулярное маркирование и генетическая паспортизация ресурсных и редких видов растений с целью оптимизации сохранения их генофондов / С.В. Боронникова // Аграрный вестник Урала. 2009. – № 2(56). – С. 57-59.
3. Боронникова С.В. Генетическая паспортизация редких и нуждающихся в охране видов растений как основа оптимизации сохранения их генофондов / С.В. Боронникова // Вопросы современной науки и практики. Университет им. В.И.Вернадского. – 2009. – Вып.3(17). – С. 8-16.
4. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
5. Конарев А.В. Использование молекулярных маркеров в работе с генетическими ресурсами растений // Сельскохозяйственная биология.- 1998.- №5.- С.3-25.
6. Новикова, Т.И. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального Сибирского ботанического сада / Т.И. Новикова, А.Ю. Набиева, Т.В. Полубоярова // Вестник ВОГиС. – 2008. – Том 12. – № 4. – С. 564-572.
7. Самарина Л.С., Коломиец Т.М., Слепченко Н.А. Сохранение *in vitro* исчезающего псамофита Черноморского побережья России *Pancratium moritimum* L. Сб. Трудов ГНУ ВНИИЦиСК, 2012. Вып.47. - С. 172-177.
8. Туниев, Б.С. Основные аспекты сохранения биологического разнообразия Западного Кавказа / Б.С. Туниев, И.Н. Тимухин // Роль заповедников Кавказа в сохранении биоразнообразия природных экосистем. – Сочи, 1999. – С. 15-19.
9. 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.
10. De Castro, O. Phylogenetic and biogeographical inferences for *Pancratium (Amaryllidaceae)*, with an emphasis on the Mediterranean species based on plastid

- sequence data / O. De Castro, S. Brullo, P. Colombo, S. Jury, P. De Luca, A. Di Maio // *Bot J Linn Soc.* – 2012. – № 170. – P. 12–28.
11. 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.
 12. Grassi, F. Evaluation of biodiversity and conservation strategies in *Pancreaticum maritimum* L. for the Northern Tyrrhenian Sea / F. Grassi, E. Cazzaniga, L. Nuto, I. Peccenini, G. Barberis and B. Basso // *Biodiversity and Conservation.* – 2005. – №14. – P. 2159–2169.
 13. 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.
 14. Liu, Xiaomei Adventitious shoot regeneration of oriental lily (*Lilium orientalis*) and genetic stability evaluation based on ISSR marker variation / Xiaomei Liu, Guochen Yang // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant.* – 2012. – № 48. – P. 172–179.
 15. Morgante, M. PCR-amplified microsatellite markers in plant genetics M. Morgante, A.M. Oliveri // *Plant J.* – Vol. 3. - 1993. - P. 175-182.
 16. Mc Gregor, C.E. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm / C.E. Mc Gregor, C.A. Lambert, M.M. Greyling, J.H. Louw and L. Warnich // *Euphytica* 2000.- № 113.- P. 135–144.
 17. Murray, M.G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M.G. Murray, W.F. Thompson // *Nucleic Acids Research.* – Vol. 10. - 1980. – P. 4321-4325.
 18. Tang, N. Genetic diversity and structure of *Lilium pumilum* DC. in southeast of Qinghai–Tibet plateau / N. Tang, G. Mo, Jaap M. van Tuyl, P. Arens, J. Liu, D. Tang // *Plant Systematics and Evolution* June. – 2014. – № 6. – P. 1453-1464.
 19. Yin, Zhenfang Direct shoot regeneration from basal leaf segments of *Lilium* and assessment of genetic stability in regenerants by ISSR and AFLP markers / Zhenfang Yin, Bing Zhao, Wenlu Bi, Longchen, Qiao-Chun Wang // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant.* – 2013. – 49. – P. 333–342.

References

1. Artyukova Ye.V., Kholina A.B., Kozyrenko M.M., Zhuravlev YU.N. Analiz geneticheskoy izmenchivosti redkogo endemichnogo vida *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae) na osnove RAPD-markerov // *Genetika.* 20046. T. 40, № 7. S. 877-884.
2. Boronnikova S.V. Molekulyarnoye markirovaniye i geneticheskaya pasportizaziya resursnykh i redkikh vidov rasteniy s tsel'yu optimizatsii sokhraneniya ikh genofondov // *Agrarnyy vestnik Urala.* 2009. - № 2(56). - S. 57-59.
3. Boronnikova S.V. Geneticheskaya pasportizatsiya redkikh i nuzhdayushchikhsya v okhrane vidov rasteniy kak osnova optimizatsii sokhraneniya ikh genofondov // *Voprosy sovremennoy nauki i praktiki. Universitet im. V.I.Vernadskogo.* — 2009. — Vyp.3(17). S. 8-16.
4. Butenko, R. G *Biologiya kletok vysshikh rasteniy in vitro i biotekhnologiya na ikh osnove* / R G. Butenko. - M. : FBK-PRESS, 1999. - 160 s.
5. Konarev A.V. Ispol'zovaniye molekulyarnykh markerov v rabote s geneticheskimi resursami rasteniy // *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya.*- 1998.- №5.- S.3-25.

6. Novikova T.I., Nabyeva A.YU., Poluboyarova T.V. Sokhraneniye redkikh i poleznykh rasteniy v kolleksii in vitro Tsentral'nogo Sibirskogo botanicheskogo sada. Vestnik VOGiS, 2008, Tom 12, № 4. S. 564-572.
7. Samarina L.S., Kolomiyets T.M., Slepchenko N.A. Sokhraneniye *in vitro* ischezayushchego psamofita Chernomorskogo poberezh'ya Rossii *Pancretium maritimum* L. Sb. Trudov The State Research Institution All-Russian Scientific and Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops, 2012. Vyp.47. - S. 172-177.
8. Tuniyev B.S., Timukhin I.N. Osnovnyye aspekty sokhraneniya biologicheskogo raznoobraziya Zapadnogo Kavkaza. // Rol' zapovednikov Kavkaza v sokhranении bioraznoobraziya prirodnykh ekosistem. 1999. Sochi, - S. 15-19.
9. 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.
10. De Castro, O. Phylogenetic and biogeographical inferences for *Pancretium* (*Amaryllidaceae*), with an emphasis on the Mediterranean species based on plastid sequence data / O. De Castro, S. Brullo, P. Colombo, S. Jury, P. De Luca, A. Di Maio // Bot J Linn Soc. – 2012. – № 170. – P. 12–28.
11. 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.
12. Grassi, F. Evaluation of biodiversity and conservation strategies in *Pancretium maritimum* L. for the Northern Tyrrhenian Sea / F. Grassi, E. Cazzaniga, L. Nuto, I. Peccenini, G. Barberis and B. Basso // Biodiversity and Conservation. – 2005. – №14. – P. 2159–2169.
13. 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.
14. Liu, Xiaomei Adventitious shoot regeneration of oriental lily (*Lilium orientalis*) and genetic stability evaluation based on ISSR marker variation / Xiaomei Liu, Guochen Yang // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. – 2012. – № 48. – P. 172–179.
15. Morgante, M. PCR-amplified microsatellite markers in plant genetics M. Morgante, A.M. Oliveri // Plant J. – Vol. 3. - 1993. - P. 175-182.
16. Mc Gregor, C.E. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm / C.E. Mc Gregor, C.A. Lambert, M.M. Greyling, J.H. Louw and L. Warnich // Euphytica 2000.- № 113.- P. 135–144.
17. Murray, M.G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M.G. Murray, W.F. Thompson // Nucleic Acids Research. – Vol. 10. - 1980. – P. 4321-4325.
18. Tang, N. Genetic diversity and structure of *Lilium pumilum* DC. in southeast of Qinghai–Tibet plateau / N. Tang, G. Mo, Jaap M. van Tuyl, P. Arens, J. Liu, D. Tang // Plant Systematics and Evolution June. – 2014. – № 6. – P. 1453-1464.
19. Yin, Zhenfang Direct shoot regeneration from basal leaf segments of *Lilium* and assessment of genetic stability in regenerants by ISSR and AFLP markers / Zhenfang Yin, Bing Zhao, Wenlu Bi, Longchen, Qiao-Chun Wang // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. – 2013. – 49. – P. 333–342.