

УДК 581.143.6+582.998

**Соматоклональная изменчивость девясила британского –
Inula britannica L. в культуре *in vitro***

Somaclonal variation of Elecampane, *Inula britannica* L. in culture *in vitro*

М. В. Скапцов, Д. Л. Белкин, С. В. Смирнов, М. Г. Куцев

M. V. Skaptsov, D. L. Belkin, S. V. Smirnov, M. G. Kutsev

Алтайский государственный университет, пр-т Ленина, 61, Барнаул, 656049, Россия. E-mail: mr.skaptsov@mail.ru
Altai State University, Lenina str., 61, Barnaul, 656049, Russia

Ключевые слова: каллус, ПЦР, проточная цитометрия, содержание ДНК, размер генома.

Key words: callus, PCR, flow cytometry, DNA content, genome size.

Аннотация. Было изучено влияние соматоклональной изменчивости в каллусной культуре и регенерантах девясила – *Inula britannica* L. Культивирование каллусов осуществляли на питательной среде в присутствии ауксинов и цитокининов на протяжении 12 месяцев, после чего стимулировали органогенез. Полиморфизм регенерантов и каллусов исследовали при помощи фрагментного анализа с применением RAF-маркеров. Степень геномных изменений исследовали с помощью проточной цитометрии. Анализ процентного соотношения полиморфных локусов показал увеличение генетического разнообразия на стадии каллуса, тогда как на стадии регенерации подобный полиморфизм восстанавливался до прежнего уровня. Изменения в размере генома регенерантов не наблюдались на первых месяцах культивирования, тогда как в некоторых случаях вариации генома регенерантов после 12 месяцев культивирования каллуса достигали 26 %. Более того, регенеранты со сроком субкультивации 12 месяцев формировали явные мутации в генеративных органах растений.

Summary. The effect of somaclonal variation in callus culture and regenerants of elecampane – *Inula britannica* L. was studied. Calluses were cultured in medium in the presence of auxin and cytokinin for 12 months followed by stimulation of organogenesis. Polymorphism of calluses and regenerants were examined by fragment analysis using RAF-markers. Degree of genomic changes in callus cell cultures was assessed by flow cytometry. Analysis of the percentage of polymorphic loci demonstrated increasing genetic diversity on stages of callus cultures, whereas the induced polymorphism was restored to the

original level at the regeneration phase. Changes in the size of regenerant's genome were not readily identified in the first month of culturing, whereas in some samples the variations in genome of regenerants after 12 months callus culturing reached 26 %. Moreover, 12 month subcultured regenerants formed mutations in the generative organs of plants.

Культура клеток и тканей растений *in vitro* уже многие десятилетия используется для микроразмножения, сохранения биоразнообразия, исследования изменений генома изолированных клеток и экспрессии трансгенов. Тотипотентность соматических клеток растений позволяет направлять их дедифференцировку и под воздействием регуляторов роста вызывать регенерацию. Возможность получения тысяч особей растений из кусочка ткани является привлекательной для сохранения редких, исчезающих и хозяйственно ценных видов растений. Но открытие явления соматоклональной изменчивости ставит под сомнение основную идею сохранения растений *in vitro* – сохранение генетического разнообразия исходного вида (Larkin et al., 1981).

Генетические процессы в культуре *in vitro* зачастую не подчиняются какой-либо закономерности, а происходят случайно. Выделяют три основных метода сохранения растений в культуре *in vitro*: микроразмножение, соматический эмбриогенез и суспензионная культура

протопластов. Микроразмножение, основанное на прямой регенерации, – наиболее распространенный метод для сохранения медицинских или редких и эндемичных видов растений (Dang et al., 2011; Sarasan, 2006; Sivanesan et al., 2012). Данная техника позволяет получать из одного растения-донора тысячи регенерантов. В связи с коротким периодом времени пребывания органов растений на питательной среде с регуляторами роста снижается риск влияния ауксинов на генетический материал растений. Культура протопластов основана на выращивании в жидкой питательной среде изолированных растительных клеток в присутствии регуляторов роста и ингибиторов образования клеточной стенки. Отдельные клеточные линии могут быть заморожены в жидком азоте, что в будущем позволяет провести регенерацию, по пути, соматического эмбриогенеза. Соматический эмбриогенез – более длительный процесс, связанный с формированием развитого растительного зародыша из группы клеток. Обычно данный процесс связан с каллусогенезом. Дедифференцировка клеток вызывается изменением соотношения регуляторов роста в сторону ауксинов. Многие авторы отмечают значительные генетические изменения в каллусной культуре, особенно при длительной пролиферации клеток (Ghorbanpoura, Khadivi-Khub, 2015; Mgbeze, Iserhienrhien, 2014; Muthusamy, Jayabalan, 2014). Данная культура, как и культура протопластов, наиболее подвержена соматоклональной изменчивости. В большинстве случаев изменения в генотипе не затрагивают работу генов гомеобокса или генов, отвечающих за формирование фенотипа растения, что связано с высоким присутствием аллелей данных генов. Так как больше половины генома представлено мобильными генетическими элементами, вариации проявляются только в размере генома (Kumar, Bennetzen, 1999). Но с повышением генетической неоднородности клеток появляется вероятность формирования новых признаков, особенно при длительном культивировании клеток в каллусной культуре. Сохраняя соматоклональные варианты, можно получить новые морфологические формы растений, изменения в генеративных функциях, и выделить новые сельскохозяйственные признаки (Biswas et al., 2009; Li et al., 2010; Sun et al., 2013). Для исследования полиморфизмов клеточных линий каллусных культур в основном используют метод RAPD-анализа (Ehsanpour et al., 2007). Получаемые данные являются довольно досто-

верными, но без учета геномных и хромосомных изменений сложно представить полную картину произошедших мутаций. Кроме того, зачастую проводят анализ только каллусных культур без учета данных полиморфизма регенерантов. Целью наших исследований является анализ геномных изменений в культуре клеток и тканей *Inula britannica* L. (девясила британского). Основными задачами является индукция и поддержание каллусной культуры на протяжении 12 месяцев с формированием нескольких групп соматоклонов на разных стадиях пролиферации каллуса, с последующим кариологическим, цитогенетическим и молекулярно-генетическим анализом.

Материалы и методы

Культивирование *in vitro* изолированных тканей и органов растений мы осуществляли согласно общепринятым рекомендациям с вариациями (Butenko, 1999). На различных этапах экспериментальной работы использовали минеральную основу питательных сред по прописи Мурасиге – Скуга (MS) с добавлением 30 г/л сахарозы, 100 мг/л мезоинозитола, 3 г/л фитогеля (Murashige, Skoog, 1962). Поверхностную стерилизацию листьев проводили в течение 15 мин. в 0,5 % растворе гипохлорита натрия. В качестве исходного материала для индукции каллусогенеза была использована область по периферии центральной жилки листа *I. britannica* с одного экземпляра, которую делили на фрагменты и помещали на питательные среды. Для индукции и поддержания каллусогенеза экспланты культивировали на твердой питательной среде MS с добавлением бензиладенина-6 (БА) и α -нафтилуксусной кислоты (НУК) в концентрациях 1 мг/л и 2 мг/л, соответственно (Skaptsov, Kutsev, 2013). Каллусные ткани отделяли от первоначального экспланта и субкультивировали в климатической камере с фотопериодом день (8 ч) : ночь (16 ч) и температурой 23 °С. После 3 месяцев культивирования часть каллусных тканей переносили на среды MS без регуляторов роста и субкультивировали до образования побегов. Формирование побегов наблюдали через 3 месяца после субкультивирования. Полученные побеги срезали и переносили на питательную среду $\frac{1}{2}$ MS, содержащую 0,25 мг/л НУК и 1 мкМ 24-эпибрассинолида с целью индукции ризогенеза и акклиматизации. Сформировавшиеся растения переносили в песчано-торфяную смесь и доращивали до стадии цветения в тепличных условиях. Те же этапы со-

вершали с каллусными тканями девяти месяцев культивирования.

Для дальнейших исследований формировали четыре номинальные популяции с выборкой по 15 образцов в каждой (табл.).

Меристематические клетки для исследования хромосомного состава были получены из кончиков корней регенерантов девяссила. Корни помещали в воду с температурой таяния льда и инкубировали 24 часа в темноте. Предфиксационную обработку проводили в 0,05 % растворе колхицина при температуре 25 °С в течение 3 часов, затем фиксировали в фиксаторе (уксусном спирте). Фиксированные образцы инкубировали в 45 % уксусной кислоте при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем образцы нагревали в 2 % ацетоорсеине и окрашивали 30 мин. при комнатной температуре. Для получения монослоя клеток проводили раздавливание наиболее интенсивно окрашенных участков материала в 45 % уксусной кислоте под покровным стеклом. Полученные препараты исследовали методом прямой световой микроскопии (Tanaka, 1959).

Относительное содержание ДНК определяли при помощи метода проточной цитометрии с окраской изолированных ядер иодидом пропидия. Для этого молодые листья регенерантов девяссила измельчали при помощи лезвия в 500 мкл охлажденного буфера Otto I с модификациями (0,1 М лимонной кислоты, 0,5 % Triton) и инкубировали 10 мин. при комнатной температуре (Otto, 1990). Образцы фильтровали через нейлоновую мембрану с размером пор 50 мкм и смешивали с раствором для окрашивания, состоящим из 1 мл Tris-MgCl₂ буфера (0,4 М Tris-основание, 4 mM MgCl₂·6H₂O) с PI (50 мкг/мл), РНазы (50 мкг/мл) и β-меркаптоэтанола (1 мкг/мл) (Doležel et al., 1998; Pfosser et al., 1995). Для ин-

терпретации данных использовали пики с не менее чем 1000 детектируемых частиц.

В качестве внешнего стандарта использовали изолированные ядра *Pisum sativum* L. сорта Адагумский с известным содержанием ДНК 2С = 8,0 пг (Skaptsov et al., 2014). Данные флюоресценции изолированных ядер детектировали при помощи проточного цитометра Partec CyFlow PA (Partec, GmbH) с лазерным источником излучения с длиной волны 532 нм. Сигналы записывались в логарифмическом представлении данных флюоресценции (логарифмическая шкала). Для трансформации данных из логарифмического в линейное представление использовали формулу 1 (Marie, Brown, 1993). Содержание ДНК рассчитывали согласно формуле 2. Полученные результаты обрабатывали при помощи ПО Statistica 8.0 (StatSoft Inc.) и штатного ПО проточного цитометра CyView (Partec, GmbH).

Формула 1. $f = 10^{X/64}$, где f – индекс (разница между средними значениями пика образца и стандарта в линейной шкале); X – разница между средними значениями пиков (каналов) стандарта и образца в логарифмической шкале; 64 – частное между количеством каналов шкалы прибора на количество декад на полной логарифмической шкале (256/4 для Partec CyFlow PA).

Формула 2. $2C = f^*M$, где f – см. формулу 1; M – среднее значение пика образца.

В качестве основы молекулярно-генетического анализа использовали фрагментный анализ ДНК RAF (Randomly Amplified DNA Fingerprints) (Waldron et al., 2002). ДНК изолировали, используя СТАБ-метод (Doyle J. J., Doyle J. L., 1987). Для работы использовали олигонуклеотиды серии RAF, а именно K-02b 5'-GTCTCCGCAG-3'.

Таблица

Процентное содержание полиморфных локусов и раз					
Популяция	%P	I	T, сут.	мин. 2С, пг	макс. 2С, пг
Pop1	75,00 %	0,398	-	1,95	2,15
Pop2	85,94 %	0,421	180	1,83	2,25
Pop3	78,13 %	0,340	180	1,99	2,11
Pop4	75,00 %	0,295	360	1,53	1,92
Среднее	78,52 %	-	-	-	-
SE	2,58 %	-	-	-	-

Примечание: Pop1 – растения-доноры эксплантов, выращенные из семян; Pop2 – изолированные каллусные ткани, прошедших субкультивацию отдельно друг от друга в течение 6 месяцев; Pop3 – регенеранты после 6 месяцев культивирования каллуса; Pop4 – регенеранты после 12 месяцев культивирования каллуса; I – индекс Шеннона; SE – стандартная ошибка; T – время субкультивирования каллуса до индукции органогенеза.

Для ПЦР использовали 25 мкл реакционной смеси, содержащую 5 нг ДНК, 2,5 мкл 10х ПЦР буфера, 25 mM MgCl₂, 1 мкл 5mM смеси dNTPs, 1 мкл каждого 10mM праймера и 1 ед. Taq-полимеразы. ПЦР проводили, используя RAF протокол: 94,0 °C – 5 мин. [94,0 °C – 30 сек., 57,0 °C – 1 мин., 56,0 °C – 1 мин., 55,0 °C – 1 мин., 54,0 °C – 1 мин., 53,0 °C – 1 мин.]x35, 72,0 °C – 10 мин., 4,0 °C в конце процесса. Фрагменты ДНК разделяли с помощью техник микрофлюидного электрофореза на автоматической электрофоретической станции Exregion (Bio-Rad, USA) с использованием набора Exregion DNA 1K Analysis Kit (Bio-Rad, USA). При анализе были сформированы матрицы на основе присутствия (1) или отсутствия (0) фрагментов равной длины (Kutsev, 2009; Kutsev et al., 2013). Для дальнейшего анализа было

использовано 64 фрагмента для каждого из 60 образцов. Далее набор данных был использован для расчета молекулярной дисперсии (AMOVA), полиморфизма популяций, индекса Шэннона и генетических дистанций Нея (с использованием программного обеспечения GeneALEX 6.5 (Nei, 1978; Peakall, Smouse, 2012)).

Результаты и обсуждение

Активную пролиферацию каллусных клеток наблюдали через две недели после переноса эксплантов на питательные среды. 100 % эксплантов формировали каллусные ткани. После отделения каллусных клеток от первоначального экспланта формировались твердые зеленые каллусы, которые мы культивировали в течение 12 месяцев.



Рис. 1. Этапы культивирования *I. britannica in vitro* и дорастивание условиях закрытого грунта: а – органогенез из каллусных тканей; б – мультипликация побегов; в – отделение единичных побегов и ризогенез; г – мутантная форма – ускоренное развитие генеративной части растения; д – фенотип *I. britannica* в норме; е – мутантная форма корзинки; ж – форма корзинки в норме.

После субкультивирования каллусных тканей трех и девяти месяцев культивирования на безгормональных питательных средах мы в течение трех месяцев наблюдали индукцию органогенеза и мультипликацию побегов (рис. 1а, б). После мультипликации на среде для ризогенеза отдельные побеги образовывали корни (рис. 1в). Морфология ювенильных растений, выращенных из семян (Pop1), не отличалась от регенерантов, полученных как после шести месяцев культивирования каллуса (Pop3), так и после двенадцати (Pop4). Формирование генеративных побегов наблюдали в течение 6 месяцев выращивания в условиях закрытого грунта. Отличий в формировании генеративных органов регенерантов Pop3 от Pop1 не наблюдалось, тогда как у представителей Pop4 в 12 случаях из 15 наблюдали схожие мутации в морфологии генеративных побегов и цветков. В случае с представителями Pop1 в норме формировался генеративный побег

длиной до 40–45 см (рис. 1д). Форма корзинки соответствовала дикой форме *I. britannica* (рис. 1ж). У представителей Pop4 длина генеративного побега не достигала 10–15 см, также у них наблюдалось ускоренное цветение. Часто корзинки формировались без развития цветоноса (рис. 1г). В большинстве случаев у мутантных форм Pop4 отмечались недоразвитые трубчатые и язычковые цветки, листочки обертки корзинки в 1,5–2 раза были длиннее нормы (рис. 1е).

В результате цитологического исследования установлено, что количество хромосом *I. britannica* в норме равно $2n = 16$ (рис. 2а). В результате цитофлюориметрического исследования относительное содержание ДНК *I. britannica* в норме составило $2C = 2,09$ пг (рис. 2б). Размер геномных изменений особей, регенерировавших из каллусов после 6 месяцев культивирования, являлся незначительным и варьировал в пределах $\pm 6-7\%$ ($2C = 1,95$ пг) (рис. 2в). В некоторых

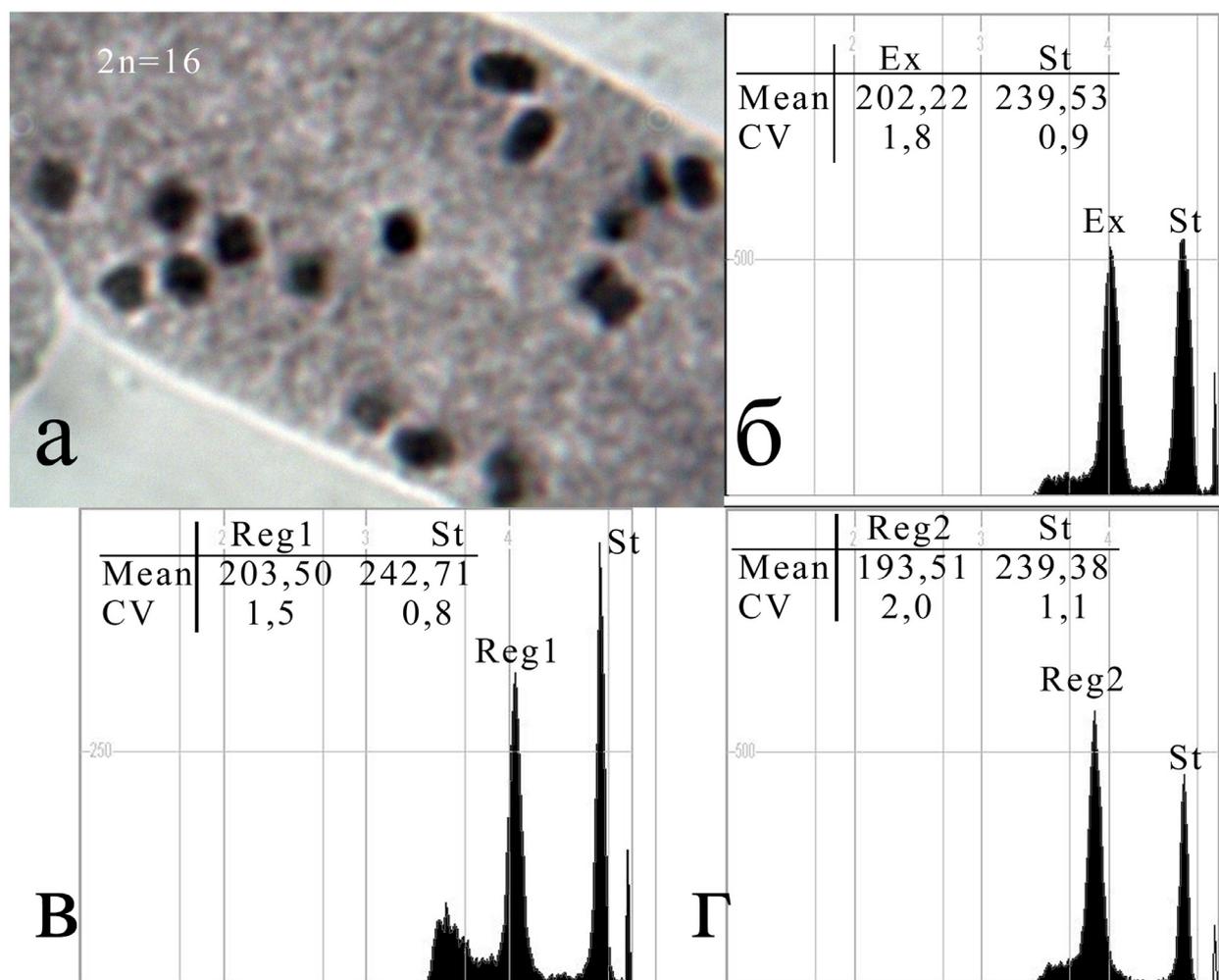


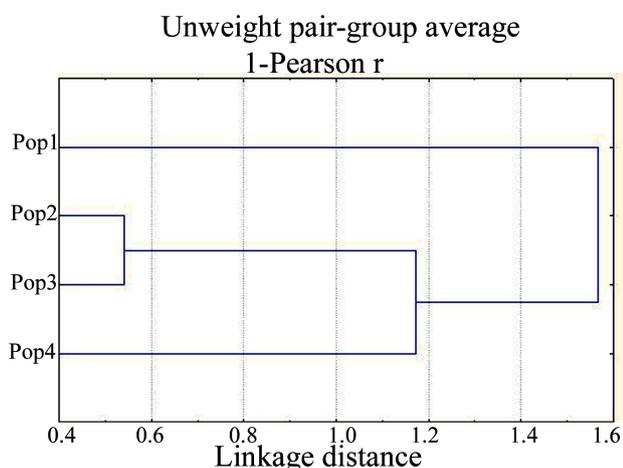
Рис. 2. Кариологические и цитогенетические исследования регенерантов *I. britannica*: а – хромосомный состав *I. britannica*; б – гистограмма относительного содержания ДНК *I. britannica* в норме, $2C = 2,09$ пг; в – гистограмма относительного содержания ДНК регенерантов *I. britannica* из популяции Pop3, $2C = 1,95$ пг; г – гистограмма относительного содержания ДНК регенерантов *I. britannica* из популяции Pop4, $2C = 1,53$ пг.

случаях наблюдалось значительное уменьшение относительного содержания ДНК в Pop4 – до 26 % (рис. 2г). Полученные данные, связанные с незначительным уменьшением размера генома, можно объяснить крупными делециями; более крупные мутации в геноме, связанные со снижением содержания ДНК до 1,56 пг, скорее всего, связаны с хромосомными мутациями.

После проведения электрофоретического разделения было получено 64 фрагмента для каждого образца. Анализ выборки методом генетических дистанций Нея и расчета полиморфизма популяций (с помощью индекса Шеннона) по всем 64 генетическим признакам показал, что длительное культивирование клеток на питательных средах в присутствии ауксинов и цитокининов вызывает увеличение полиморфизма соматоклонов. Удаление регуляторов роста из состава питательной среды с преобладанием цитокининов и гиббереллинов вызывает снижение полиморфизма популяций. При этом после регенерации растения и переноса его на питательные среды без гормонов наблюдается полное восстановление полиморфизма популяций (табл.). Другая ситуация наблюдается с генетическими дистанциями между данными группами. Генетические дистанции Нея между популяциями Pop1–Pop4 увеличиваются прямо пропорционально длительности культивирования и максимальны между популяциями Pop1 и Pop4, что наглядно демонстрирует UPGMA-анализ матрицы генетических дистанций Нея (рис. 3). Эти данные свидетельствуют о возникновении значительной генетической неоднородности между растением-донором, каллусами и регенерантами. Индекс видового разнообразия (индекс Шеннона) косвенно подтверждает эти данные и достигает

максимальных значений у представителей Pop2. AMOVA-анализ для четырех номинальных популяций показал, что 85 % вариаций были внутри популяций, когда 15 % были связаны с вариациями между популяциями ($P < 0,001$). Среднее попарное значение Φ_{ST} (аналог F_{ST} – показатель генетической дифференциации) составило 0,148, что может означать относительно высокий уровень генетической дифференциации. Максимальное значение Φ_{ST} наблюдалось между популяциями Pop1 и Pop4 (0,236), минимальное – между Pop1 и Pop3 (0,075).

Ранее методы фрагментного анализа, такие как RAF, DAF, ISSR и прочие, находили свое применение в основном для определения генетических дистанций природных популяций. В биотехнологии растений данные методы активно применяются для исследования влияния соматоклональной изменчивости в культуре *in vitro*. В некоторых работах анализируются процессы генетических изменений лишь в каллусной культуре. Авторы замечают значительные изменения в геноме в процессе пролиферации каллуса, но не учитывают полиморфизм растений-доноров и регенерантов (Encheva et al., 2003; Ghorbanpoura, Khadivi-Khub, 2015). В нашем случае после одного года пролиферации каллуса на питательной среде с ауксинами полиморфизм восстанавливается на уровне, близком к первоначальному. В нашей работе мы использовали RAF-анализ для оценки генетических различий искусственно созданных (номинальных) популяций *in vitro*. Культура *in vitro* позволяет в течение короткого времени проследить активность мутационных процессов на уровне генома и генотипа. До 90 % мутаций, происходящих в процессе длительного культивирования, оказываются леталь-



**Pairwise Population Matrix
of Nei Genetic Distance**

Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	
0,000				Pop1
0,105	0,000			Pop2
0,107	0,058	0,000		Pop3
0,118	0,085	0,095	0,000	Pop4

Рис. 3. Статистическая обработка данных фрагментного анализа. Дендрогрamma UPGMA на основе матрицы генетических дистанций Нея.

ными. Несмотря на тот факт, что внутри таких искусственных популяций растут генетические различия, полиморфизм генов в каллусах увеличивается, но не зависит от длительности культивирования. AMOVA косвенно подтверждает полученные данные. Примечательно, что при анализе молекулярных вариаций минимальный показатель генетической дифференциации PhiPT мы наблюдали между популяциями Pop1 и Pop3, тогда как генетическая гетерогенность между популяциями Pop1 (растение-донор) и Pop2 (каллус) была несколько выше (0,086). Значения полиморфизма, индекса Шеннона и значения генетической дифференциации PhiPT позволяют утверждать, что уже на стадии пролиферации каллуса наблюдается значительное увеличение генетической гетерогенности. Несмотря на восстановление полиморфизма в популяции регенерантов Pop4, матрица генетических дистанций Нея показывает различие в генетических дистанциях между популяциями. Обработка данных матрицы в UPGMA тесте с построением UPGMA-дендрограммы разбивает популяции на 3 основных кластера, причем максимальная генетическая дистанция наблюдается между популяциями Pop1 и Pop4, что подтверждается значением генетической дифференциации PhiPT.

Соматоклональная изменчивость – важный генетический фактор культур клеток и тканей растений *in vitro*. Данное явление проявляется практически при любом типе культивирования, особенно при длительной пролиферации каллуса. Детекция соматоклональной изменчивости важна в работах, связанных с сохранением биоразно-

образия в культуре *in vitro*, микроразмножением, культивированием растительных тканей медицинских растений, селекцией и прочими задачами. В результате исследований культур клеток и тканей *I. britannica in vitro* методами проточной цитометрии и фрагментного анализа выявлено, что на ранних стадиях (6 месяцев) изменения в размере генома достоверно не фиксируются, тогда как RAF-анализ показал генетическую неоднородность популяции регенерантов и увеличение генетической дистанции между регенерантами и растением-донором эксплантов. На более поздних стадиях (12 месяцев) соматоклональная изменчивость фиксируется методом проточной цитометрии как значительная редукция генома, и проявляется фенотипически. Таким образом, для отслеживания явления соматоклональной изменчивости необходимо использовать комплексные подходы, включающие молекулярно-генетические методы, хромосомный анализ, а также проточную цитометрию растений. Использование этих методов в комплексе позволит анализировать как изменения кариотипа, генотипа, так и цитотипа культивируемых растений.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 14-04-31156. Работы, связанные с культивированием *in vitro* растительного материала, выполнялись при поддержке Минобрнауки РФ в рамках базовой части государственного задания в сфере научной деятельности ФГБОУ ВПО «АлтГУ», код проекта: 316.

ЛИТЕРАТУРА

- Biswas M. K., Dutt M., Roy U. K., Islam R., Hossain M.** Development and evaluation of *in vitro* somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits // *Sci Hortic-Amsterdam*, 2009. – Vol. 122. – P. 409–416. DOI: 10.1016/j.scienta.2009.06.002.
- Butenko R. G.** Higher plant cell biology *in vitro* and biotechnology based on them: a tutorial. – Moscow: FBK-Press, 1999. – 160 p. [In Russian]. (**Бутенко Р. Г.** Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе: учеб. пособие. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.)
- Dang J. C., Kumaria S., Kumar S., Tandon P.** Micropropagation of *Ilex khasiana*, a critically endangered and endemic holly of Northeast India // *AoB Plants*, 2011. – Vol. 2011. – plr012. DOI: 10.1093/aobpla/plr012.
- Doležel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysak M. A., Nardi L., Obermayer R.** Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison // *Ann. Bot.*, 1998. – Vol. 82. – P. 17–26.
- Doyle J. J., Doyle J. L.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochem. Bull.*, 1987. – Vol. 19. – P. 11–15.
- Ehsanpour A.A., Madani S., Hoseini M.B.** Detection of somaclonal variation in potato callus induced by UV-C radiation using RAPD-PCR // *Plant Physiol.*, 2007. – Vol. 33. – P. 3–11.
- Encheva J., Tsvetkova F., Ivanov P. A.** comparison between somaclonal variation and induced mutagenesis in tissue culture of sunflower line Z-8-A (*Helianthus annuus* L.) // *Helia*, 2003. – Vol. 26. – P. 91–98.
- Ghorbanpoura M., Khadivi-Khub A.** Somaclonal variation in callus samples of *Plantago major* using inter-simple sequence repeat marker // *Caryologia*, 2015. – Vol. 68. – No. 1. – P. 19–24. DOI: 10.1080/00087114.2014.998128.
- Kumar A., Bennetzen J. L.** Plant retrotransposons // *Annu Rev Genet*, 1999. – Vol. 33. – P. 479–532.

- Kutsev M. G.** Fragmentnyy analiz DNK rasteniy: RAPD, DAF, ISSR. – Barnaul: Artika, 2009. – 163 p. [In Russian]. (**Куцев М.Г.** Фрагментный анализ ДНК растений: RAPD, DAF, ISSR. – Барнаул: Артика, 2009. – 163 с.).
- Kutsev M. G., Skaptsov M. V., Kholodkova M. A., Ivanova M. S., Smirnov S. V., Sinitsyna T. A., Friesen N. V.** Using randomly amplified DNA fingerprinting (RAF) for genotyping common and durum wheats varieties (*Triticum durum* and *T. aestivum*) // *Turczaninowia*, 2013. – Vol. 16, No. 3. – P. 157–159 [In Russian]. (**Куцев М. Г., Скапцов М. В., Холодкова М. А., Иванова М. С., Смирнов С. В., Сеницына Т. А., Фризен Н. В.** Использование RAF-анализа для генотипирования сортов мягкой и твердой пшениц // *Turczaninowia*, 2013. – Т. 16, № 3. – С. 157–159). DOI: <http://dx.doi.org/10.14258/turczaninowia.16.3.21>.
- Larkin P., Scowcroft W.** Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // *Theor. Appl. Genet.*, 1981. – Vol. 60. – P. 197–214.
- Li R., Bruneau A. H., Qu R.** Tissue culture-induced morphological somaclonal variation in St. Augustinegrass [*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze] // *Plant Breeding*, 2010. – Vol. 129. – P. 96–99. DOI:10.1111/j.1439-0523.2009.01647.x.
- Marie D., Brown S. C.** A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species // *Biol. Cell*, 1993. – Vol. 78. – P. 41–51.
- Mgbeze G. C., Iserhienrhien A.** Somaclonal variation associated with oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal propagation: A review // *Afr. J. Biotechnol.*, 2014. – Vol. 13, No. 9. – P. 989–997. DOI: 10.5897/AJBX12.011.
- Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Plant. Physiol.*, 1962. – Vol. 15, No. 13. – P. 473–497.
- Muthusamy A., Jayabalan N.** Radiation and chemical mutagen induced somaclonal variations through *in vitro* organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // *Int. J. Radiat. Biol.*, 2014. – Vol. 90, No. 12. – P. 1229–1239. DOI: 10.3109/09553002.2014.923589.
- Nei M.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // *Genetics*, 1978. – Vol. 89. – P. 583–590.
- Otto F.** DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA // *Method Cell*, 1990. – Vol. 33. – P. 105–110.
- Peakall R., Smouse P. E.** GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update // *Bioinformatics*, 2012. – Vol. 28. – P. 2537–2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
- Pfosser M., Amon A., Lelley T., Heberle-Bors E.** Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines // *Cytometry*, 1995. – Vol. 21, No. 4. – P. 387–393. DOI: 10.1002/cyto.990210412.
- Sarasan V., Cripps R., Ramsay M., Atherton C., McMichen M., Prendergast G., Rowntree J. K.** Conservation *in vitro* of threatened plants—progress in the past decade // *In Vitro Cell Dev-Pl*, 2006. – Vol. 42, No. 3. – P. 206–214. DOI: 10.1079/IVP2006769.
- Sivanesan I., Lim Y. M., Jeong B. R.** Micropropagation and greenhouse cultivation of *Scrophularia takesimensis* Nakai, a rare endemic medicinal plant // *Pak. J. Bot.*, 2012. – Vol. 44, No. 5. – P. 1657–1662.
- Skaptsov M. V., Kutsev M. G.** Effect of 24-epibrassinolide on duration of sorrel (*Rumex acetosa* L.) cultivation *in vitro* // *TSU J. Biol.*, 2013. – Vol. 22, No. 2. – P. 52–56 [In Russian]. (**Скапцов М. В., Куцев М. Г.** Влияние 24-эпибрасинолида на продолжительность культивирования щавеля (*Rumex acetosa* L.) *in vitro* // *Вестник Томского гос. ун-та. Биология*, 2013. – Т. 22, № 2. – С. 52–56).
- Skaptsov M. V., Smirnov S. V., Kutsev M. G.** Nuclear DNA content in some plant kinds used as an external standard in flow cytometry // *Turczaninowia*, 2014. – Vol. 17, No. 3. – P. 72–78 [In Russian]. (**Скапцов М. В., Смирнов С. В., Куцев М. Г.** Содержание ядерной ДНК в некоторых сортах растений, используемых в качестве внешних стандартов в проточной цитометрии // *Turczaninowia*, 2014. – Т. 17, № 3. – С. 72–78). DOI: 10.14258/turczaninowia.17.3.8.
- Sun S., Zhong J., Li S., Wang X.** Tissue culture-induced somaclonal variation of decreased pollen viability in *Torenia fournieri* Lind. // *Botanical Studies*, 2013. – Vol. 54, No. 36. – P. 1–7. DOI:10.1186/1999-3110-54-36.
- Tanaka R.** On the speciation of karyotype in diploid and tetraploid species of *Chrysanthemum boreale* (2n = 18) // *Journal of Science of Hiroshima University Series B, Division 2*, 1959. – Vol. 9. – P. 1–16.
- Waldron J., Peace C. P., Searle I. R., Furtado A., Wade N., Findlay I., Gaham M. W., Carroll B. J.** Randomly Amplified DNA Fingerprinting: a culmination of DNA marker technologies based on arbitrarily-primed PCR amplification // *J. Biomed. Biotechnol.*, 2002. – Vol. 3. – P. 141–150. DOI: 10.1155/S1110724302206026.