

Сохранение эндемика Западного Саяна *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) в коллекции *in vitro*

Д.С. Мурасева , Н.С. Звягина, Т.И. Новикова, О.В. Дорогина

Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Разработана эффективная система микроразмножения и сохранения в коллекции *in vitro* эндемика Западного Саяна *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst и проведена оценка генетической стабильности регенерантов после депонирования. Установлена эффективность использования сегментов луковичных чешуй в качестве первичных эксплантов. Наиболее оптимальной питательной средой на этапах инициации культуры *in vitro* и размножения являлась среда BDS, дополненная 5.0 мкМ 6-бензиламинопурина (БАП) и 2.0 мкМ 1-нафтилуксусной кислоты (НУК). Коллекция микрорастений поддерживается в условиях активного ($+23 \pm 2$ °C) и замедленного роста ($+7$ °C). При переводе микроклонов *F. sonnikovae* в условия замедленного роста при температуре $+7$ °C период беспересадочного субкультивирования удалось увеличить до 9–12 мес. Оценка регенерационного потенциала микрорастений при последующем культивировании сегментов чешуй на питательной среде BDS, дополненной 5.0 мкМ БАП и 2.0 мкМ НУК, позволила выявить стимулирующий эффект хранения при низких температурах: в первом пассаже после депонирования частота регенерации составила 93 %, количество адвентивных побегов – 6.9 ± 1.7 шт./эксп. Однако дальнейшее субкультивирование приводило к снижению активности побегообразования, и к третьему пассажу регенерация достигала уровня до депонирования. На основании анализа ISSR-ПЦР-фрагментов установлено генетическое соответствие материнских растений и регенерантов, полученных в ходе прямого органогенеза в первом пассаже после депонирования (12 мес.).

Ключевые слова: *Fritillaria sonnikovae*; коллекция *in vitro*; ISSR-анализ; соматоклональная изменчивость; депонирование *in vitro*; сохранение биоразнообразия.

Conservation of the West Sayan endemic *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) in *in vitro* collection

D.S. Muraseva , N.S. Zvyagina, T.I. Novikova, O.V. Dorogina

Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk, Russia

An effective system of micropropagation and *in vitro* conservation of the West Sayan endemic *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst was developed and the genetic stability of regenerants after slow-growth storage was assessed. The efficiency of bulb scale segments as primary explants was established. The optimum nutrient medium for stages of *in vitro* culture initiation and multiplication was BDS supplemented with BAP (5.0 μ M) and NAA (2.0 μ M). The microplant collection was maintained in active-growth ($+23 \pm 2$ °C) and slow-growth ($+7$ °C) conditions. The period of subculturing at $+7$ °C was prolonged to 9–12 months when microclones of *F. sonnikovae* were transferred to slow-growth conditions. Assessment of microplant regeneration potential in further cultivation of bulb scales on BDS nutrient medium supplemented with BAP (5.0 μ M) and NAA (2.0 μ M) revealed a stimulating effect of conservation at low temperatures: the regeneration rate reached 93 % and the number of bulblets per explant was 6.9 ± 1.7 at the first passage after slow-growth storage. However, further cultivation led to decrease of shoot development, and the regeneration rate reached the level before slow-growth storage at the third passage. The genetic fidelity of regenerants obtained during direct organogenesis at the first passage after slow-growth storage (12 months) was established by analysis of ISSR-PCR-fragments.

Kew words: *Fritillaria sonnikovae*; *in vitro* collection; ISSR; somaclonal variation; slow-growth storage; biodiversity conservation.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Мурасева Д.С., Звягина Н.С., Новикова Т.И., Дорогина О.В. Сохранение эндемика Западного Саяна *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) в коллекции *in vitro*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(5):554-560. DOI 10.18699/VJ17.272

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Muraseva D.S., Zvyagina N.S., Novikova T.I., Dorogina O.V. Conservation of the West Sayan endemic *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) in *in vitro* collection. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(5):554-560. DOI 10.18699/VJ17.272 (in Russian)

Решение проблемы сохранения биоразнообразия растений на современном этапе невозможно без поиска новых стратегий и подходов. В связи с этим в последние десятилетия отмечено развитие перспективного направления – биотехнологии сохранения растений (Benson, 2002; Cruz-Cruz et al., 2013). Это новая междисциплинарная наука, основная задача которой – дополнение традиционных методов сохранения биоразнообразия *ex situ* современными биотехнологическими инструментами, обеспечивающими возможность устойчивого управления генетическими ресурсами. В рамках этого направления многие ботанические сады помимо банков семян и пыльцы, полевых коллекций создают коллекции *in vitro* редких и эндемичных растений, а также видов, находящихся под угрозой исчезновения.

Основу методов сохранения биоразнообразия *in vitro* составляет поддержание коллекции культур, их регенерационного потенциала путем периодического пересаживания на свежие питательные среды. При этом для коллекций *in vitro* характерна различная продолжительность периода хранения: от 25–30 сут в условиях активного роста (краткосрочное хранение) до четырех лет в беспересадочной культуре в условиях замедленного роста (среднесрочное хранение, депонирование). Депонирование характеризуется сокращением вегетативной активности сохраняемого материала, что приводит к увеличению интервалов между пересадками (от нескольких месяцев до одного года и более) (Jain, Ochatt, 2010; Новикова, 2013; Cordeiro et al., 2014). Наиболее изученным фактором, обеспечивающим среднесрочное хранение коллекций *in vitro*, является температура. Культивирование при низкой положительной температуре (для растений умеренной зоны +2–5 °C, для тропических видов +15–20 °C) эффективно замедляет ростовые процессы растений большинства таксонов (Bell, Reed, 2002; Engelmann, 2011). Так, среднесрочное хранение при низких температурах успешно применяли для культур *Gladiolus imbricatus* L. (Rakosy-Tican et al., 2012), а также Восточных и Азиатских гибридов лилий (Bonnier, Van Tuyl, 1997). В целом данный тип хранения генетического материала применяется во многих лабораториях.

Важным аспектом хранения коллекций *in vitro* является контроль генетической стабильности регенерантов. Необходимо учитывать, что риск появления полиморфизма у регенерантов в культуре *in vitro* повышается при наличии каллусной стадии, использовании регуляторов роста, а также при увеличении периода культивирования (Bairu et al., 2011). Для идентификации соматоклональной изменчивости, имеющей эпигенетическую или генетическую природу, используют разнообразные методы, включающие оценку как морфологических признаков, так и молекулярно-генетических маркеров (Rani et al., 1995; Bublyk et al., 2012). Одним из эффективных методов, востребованных в этих исследованиях, является ISSR-анализ (inter simple sequence repeats), основанный на амплификации межмикросателлитных участков геномной ДНК (Liu, Yang, 2012; Al Khateeb et al., 2013). Популярность данного метода объясняется высокой воспроизводимостью, удобством, чувствительностью и экономичностью (Bairu et al., 2011).

Среди представителей рода *Fritillaria* L. (рябчик) много эндемичных и редких видов. Так, недавно описанный эн-

демик *F. sonnikovae* Schaulo et A. Erst имеет узколокальный ареал в пределах Западного Саяна (Шауло, Эрст, 2010). Ограниченность ареала повышает риск исчезновения данного вида, являющегося предположительно неморальным реликтом конца третичного периода Алтае-Саянской флористической провинции (Шауло, Эрст, 2010). Поскольку многие природные виды рябчиков находятся под угрозой исчезновения из-за нерегулируемого сбора луковиц и цветущих побегов, необходим поиск новых эффективных подходов для их сохранения. С учетом преимуществ методов биотехнологии наши исследования направлены на изучение особенностей микроразмножения и депонирования *in vitro* эндемичного вида *F. sonnikovae*.

Цель исследования – разработать эффективную систему микроразмножения и сохранения в коллекции *in vitro* эндемичного вида *F. sonnikovae* и провести оценку генетической стабильности регенерантов после депонирования.

Материалы и методы

Исходным материалом для введения в культуру *in vitro* послужили луковицы эндемичного вида *F. sonnikovae*, полученные из естественных мест произрастания (Россия, Красноярский край, хребет Борус).

Инициация культуры *in vitro*. Перед введением в культуру *in vitro* интактные луковицы выдерживали при пониженной температуре (+5±2 °C) в течение 3–4 нед для преодоления периода покоя, характерного для всех геофитов. Луковицы перед поверхностной стерилизацией тщательно очищали от загрязнений и промывали в проточной воде в течение 1 ч. Стерилизацию проводили по предложенной ранее методике последовательным погружением в 70 % этанол (30 с), затем в 0.1 % раствор хлорида ртути (HgCl₂) с добавлением Tween 80 (30 мин) и трехкратной промывкой стерильной дистиллированной водой (Кульханова и др., 2015). Стерильные чешуи в асептических условиях разделяли на сегменты размером 5 × 5 мм и использовали в качестве первичных эксплантов. Сегменты чешуй помещали раневой поверхностью на питательную среду по 4–5 шт. в каждый культуральный сосуд.

На этапе введения в культуру *in vitro* использовали среды по прописям В₅ (Gamborg, Eveleigh, 1968) и BDS (Dunstan, Short, 1977), дополненные 5.0 мкМ 6-бензиламинопурина (БАП) и 2.0 мкМ 1-нафтилуксусной кислоты (НУК). Длительность первого пассажа составила 50–60 сут. Полученные адвентивные микролуковички отделяли от тканей первичного экспланта и переносили на среды для размножения.

В качестве контроля на всех этапах использовали безгормональные питательные среды.

Размножение *in vitro*. На этапе оптимизации стадии собственно размножения использовали агаризованные питательные среды по прописям В₅ или BDS, дополненные экзогенными регуляторами роста: цитокининами (БАП и тидиазурон (ТДЗ) в концентрациях 0.1–10.0 мкМ) и ауксином НУК в концентрации 2.0 мкМ (табл. 1; протокол представлен в Доп. материалах¹).

¹ Дополнительные материалы см. в Приложении по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2017-21/appx8.pdf>

Table 1. Modifications of nutrient media employed in *F. sonnikovae* propagation proper

Mineral base		Growth regulator, μM		
		BAP	NAA	TDZ
BDS	B ₅	–	–	–
BDS	B ₅	0.1	–	–
BDS	B ₅	0.5	–	–
BDS	B ₅	5.0	–	–
BDS	B ₅	5.0	2.0	–
BDS	B ₅	10.0	2.0	–
–	B ₅	–	–	0.1
BDS	B ₅	–	–	0.5
–	B ₅	–	–	5.0
BDS	B ₅	–	2.0	5.0
BDS	B ₅	–	2.0	10.0

Культивирование микрорастений проводили в условиях свето-культуральной комнаты: интенсивность освещения 3.5–4.0 клк, фотопериод – 16 ч свет, 8 ч темнота, температура $+23 \pm 2$ °C. Продолжительность пассажа 35–40 сут.

Морфологию структур, сформированных *de novo*, анализировали с помощью стереомикроскопа Stereo Discovery V 12 (Carl Zeiss, Германия) на базе Центра коллективного пользования ЦСБС СО РАН.

Коллекция *in vitro*. Для депонирования отбирали выровненные микрорастения с луковичками не менее 4–5 мм, имеющие 1–2 листа, которые поддерживали в условиях замедленного роста при температуре $+7$ °C, фотопериоде 16/8, интенсивности освещения 1.5–3.0 клк (световой термостат RuMed, Германия). На данном этапе использовали безгормональные питательные среды 1/2 BDS и 1/2 B₅, содержащие 30.0 г/л сахарозы и 0.5 г/л активированного угля.

По завершении депонирования проводили оценку регенерационного потенциала микрорастений. Для этого у лукович, находящихся на хранении в течение 12 мес., изолировали луковичные чешуи, разделяли их на сегменты (5×5 мм) и культивировали в стандартных условиях ($+23 \pm 2$ °C, длительность пассажа 35–40 сут). В эксперименте использовали среды, отмеченные как наиболее оптимальные на стадии собственно размножения.

На этом этапе проводили также оценку генетической стабильности регенерантов, полученных в первом пассаже после депонирования. Анализировали сформированные микролуковички (регенеранты) и сегменты чешуй материнских растений (контроль). Для выявления генетической стабильности регенерантов первого поколения применили ISSR-анализ.

Экстракция ДНК и ISSR-анализ. Экстракцию ДНК проводили с помощью набора для выделения ДНК из пищевых продуктов и сырья (BioSilica, Россия). Чистоту (соотношение величин оптической силы при длине волн 260 и 280 нм) и концентрацию полученных экстрактов

ДНК определяли на спектрофотометре BioSpectrometer kinetic (Eppendorf, Германия), используя микрокювету $\mu\text{Cuvette G1.0}$ (Eppendorf, Германия).

В исследовании испытано 12 ISSR-праймеров: (CA)₆GT, (CA)₆AG, (CT)₈TG, (CAC)₃GC, (CTC)₃GC, (AC)₈CG, (AC)₈YG, (CA)₆AC, (CA)₆GG, (GA)₈YC, (GAA)₆, (GACAC)₄. Однако только первые пять праймеров, характеризующихся репрезентативностью ISSR-паттерна и наиболее высоким полиморфизмом амплифицированных фрагментов, были привлечены для идентификации стабильности регенерантов. Реакционная ПЦР-смесь объемом 25.0 мкл содержала 2.7 mM MgCl₂, 1.25 mM праймера, 0.4 mM мононуклеотидов, 1×PCR-буфер, 1.5 ед. Taq ДНК-полимеразы (Медиген, Россия) и 5.0 нг матрицы. Программа амплификации состояла из следующих этапов: денатурация ДНК – 1.30 мин при 94 °C; 35 циклов амплификации – 0.40 мин при 94 °C, 0.45 мин отжига праймера при 42–51 °C и 1.30 мин при 72 °C; заключительный этап пролонгирования нуклеотидной цепи – 5 мин при 72 °C. ПЦР проводили в C 1000 Thermal Cycler (BioRad Laboratories, США). Оптимальная температура отжига ($T_{\text{опт.}}$) подобрана эмпирически в ходе предыдущих исследований (Zvyagina et al., 2016). Полученные ISSR-фрагменты окрашивали SYBR-Green (Медиген, Россия). Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1.5 % агарозном геле в 1×TBE-буфере. Размер ISSR-фрагментов определяли путем сравнения их подвижности с маркером молекулярного веса (Медиген, Россия). ISSR-профиль изучаемых образцов визуализировали с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+ и анализировали с использованием программного обеспечения Image Lab Software (BioRad Laboratories, США). Каждый амплифицированный фрагмент рассматривали как доминантный маркер и для изучаемых образцов отмечали его присутствие (1) либо отсутствие (0).

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты проводили трижды, по 7–10 эксплантов в каждом опыте. Обработывали полученные данные с помощью пакета программ Microsoft Office Excel 2007. На диаграммах приведены средние арифметические величины и доверительные интервалы. Обсуждаются различия, достоверные при 95 % уровне значимости.

Статистический анализ вариативности регенерантов проводили в программе TFPGA (Miller, 1997) методами расчета генетического расстояния (genetic distance, D) и генетического сходства (genetic identity, I), предложенными М. Nei (1972).

Результаты и обсуждение

Введение в культуру *in vitro* подземных органов растений осложняется высокой степенью грибной и микробной контаминации, поэтому при использовании луковичных чешуй в качестве источников первичных эксплантов мы применили наиболее эффективный способ стерилизации, обеспечивающий высокий выход неинфицированных и жизнеспособных эксплантов (Кульханова и др., 2015). Используемый режим поверхностной стерилизации луковичных чешуй оказался оптимальным, доля асептических эксплантов составила 96 %. Развития каллусной ткани на этапе инициации культуры *in vitro* не происходило, наблю-

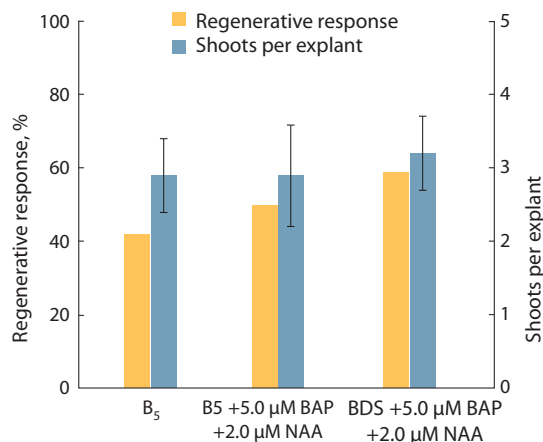


Fig. 1. Effect of nutrient medium composition on the regeneration of *F. sonnikovae* adventitious shoots from primary explant tissues (bulb scales).

дали исключительно прямую регенерацию адвентивных микролуковичек.

Наиболее эффективно использование питательной среды BDS, дополненной 5.0 мкМ БАП и 2.0 мкМ НУК (рис. 1). Разделение луковичной чешуи на сегменты стимулировало процессы морфогенеза. Подобные результаты положительного влияния поранений можно объяснить активацией клеточных делений в области повреждений, что составляет одну из основ регенерации (Song et al., 2011). В то же время не отмечали более активной регенерации в области донца. При этом наши результаты расходятся с данными, полученными другими исследователями. Так, согласно (Joshi et al., 2007), при культивировании сегментов луковичных чешуй *Fritillaria roylei* Hook базальная часть чешуи отличалась более высоким морфогенетическим потенциалом в сравнении с дистальной. Подобные результаты получены и для других геофитов, например, *Lilium longiflorum* Thunb. (Marinangeli et al., 2003) и декоративных луков подрода *Melanocrommyum* Webb et Berthel. (Полубоярова, Новикова, 2013).

Полученные на этапе инициации культуры *in vitro* луковички использовали для оптимизации стадии собственно размножения. Согласно нашим данным, основной тип морфогенного ответа в культуре ткани *F. sonnikovae* – прямой геммогенез. Установлено, что добавление в питательную среду BDS 5.0 мкМ БАП и 2.0 мкМ НУК индуцировало формирование адвентивных почек *de novo* и обеспечивало активную регенерацию микролуковичек: количество микролуковичек на эксплант 4.6 ± 0.4 шт., частота регенерации – 56 %. Данная среда являлась оптимальной. Культивирование *F. sonnikovae* на средах с низким содержанием цитокининов (0.1 и 0.5 мкМ) вызывало образование желто-зеленого каллуса (38 %), длительное пассирование (более 5 нед) которого приводило к закладке адвентивных микропочек. Однако частота регенерации побегов на поверхности каллусной ткани не превышала 28 %. Данная тенденция особенно ярко прослеживалась на питательной среде BDS, дополненной 0.5 мкМ ТДЗ: несмотря на высокий процент регенерации и количество

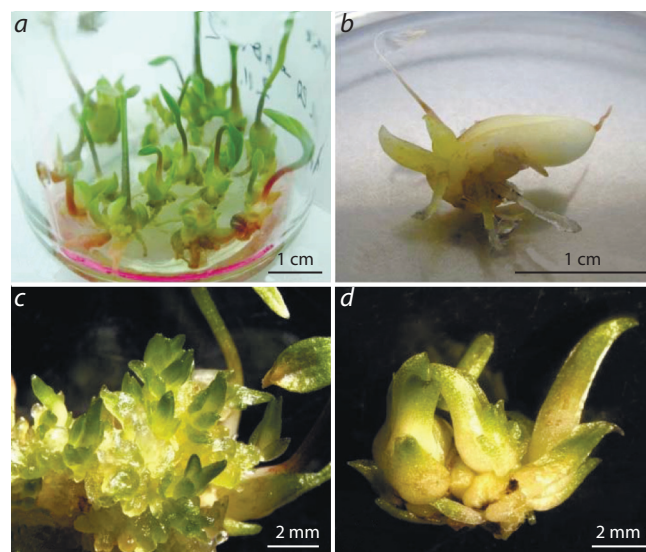


Fig. 2. *Fritillaria sonnikovae* microplants: a, before deposition; b, in the course of deposition; c, d, shoot formation in the first and third passages after 12-month storage, respectively. Nutrient medium: BDS + 5.0 µM BAP + 2.0 µM NAA.

закладающихся почек (до 11 шт.), в результате развития конгломерата удавалось получить лишь 3.1 ± 1.2 шт. хорошо сформированных микролуковичек.

Использование ТДЗ на этапе размножения приводило к образованию адвентивных микропочек, однако частота и скорость развития побегов из этих почек оставались низкими. При этом наблюдали формирование гипергидратированных почек со слабой дифференциацией листовых примордиев. Ранее негативное влияние ТДЗ на регенерацию различных видов и сортов лилий, выражающееся в морфологических аномалиях побегов и замедлении их развития, отмечалось в работах (Vacchetta et al., 2003; A. Parić et al., 2011).

В результате проведенной работы получены микрорастения, составляющие коллекцию *in vitro*. Растения поддерживали в условиях активного роста при температуре $+23 \pm 2$ °C и фотопериоде (16/8) и длительности пассажа 35–40 сут, что обеспечивало поддержание регенерационного потенциала на высоком уровне.

При переводе микроклонов *F. sonnikovae* в условия замедленного роста (депонирование) при температуре $+7$ °C на фотопериоде длительность беспересадочного субкультивирования достигла 9–12 мес. При этом жизнеспособность микрорастений после хранения составляла 87 %. Легкость депонирования можно объяснить физиологическими механизмами, характерными для геофитов в период зимнего покоя (Jevremović et al., 2010).

Отмечено, что для микрорастений, находящихся в условиях минимального роста, характерны гипергидратация луковичных чешуй, отмирание имеющихся ее листьев, продолжение роста луковичи и увеличение ее размеров до двух раз к концу субкультивирования (рис. 2). На протяжении всего пассажа (9–12 мес.) наблюдали закладку единичных побегов в базальной части луковички, однако частота побегообразования не превышала 11 %.

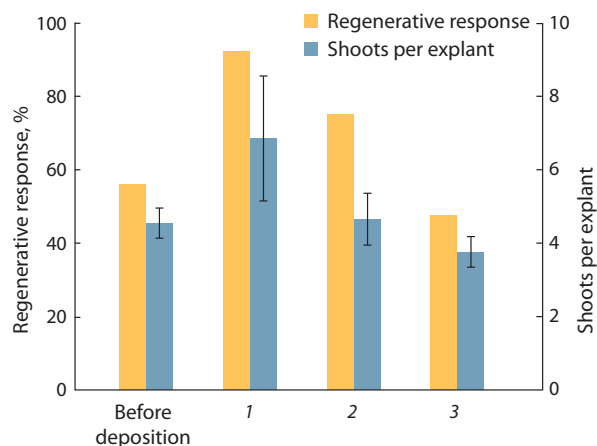


Fig. 3. Variation of the regenerative response of *F. sonnikovae* after deposition (12 months).

Nutrient medium: BDS + 5.0 μ M BAP + 2.0 μ M NAA; 1–3, passages.

Длительность депонирования ограничивалась не только жизнеспособностью микроклонов, но также истощением питательной среды и, как следствие, уменьшением ее объема. Это указывает на необходимость постоянного контроля объема среды в культуральных сосудах. По завершении этапа хранения (+7 °C) микрорастения переносили на свежие питательные среды и культивировали при +23 ± 2 °C. В дальнейшем при необходимости начинали очередной цикл хранения.

На основании оценки регенерационного потенциала микрорастений при последующем культивировании сегментов чешуй на питательной среде BDS, дополненной 5.0 мкМ БАП и 2.0 мкМ НУК, выявлен стимулирующий эффект хранения при низких температурах: в первом пассаже частота регенерации составила 93 %, количество адвентивных побегов 6.9 ± 1.7 шт./эксп. Высокий морфогенетический потенциал отмечали и на безгормональной питательной среде BDS. На данных средах развития каллуса не происходило, наблюдали разрастание ткани луковичной чешуи и образование плотных конгломератов побегов, формирующиеся луковички имели размер не более 2–3 мм. Однако при дальнейшем субкультивировании активность побегообразования снижалась и к третьему пассажу достигала уровня регенерации до депонирования (рис. 3).

Активацию побегообразования после депонирования в условиях низких положительных температур можно объяснить физиолого-морфологическими механизмами, протекающими в тканях геофитов в осенне-зимние месяцы (Kamenetsky, Okubo, 2013). Смена температурного режима, аналогичная смене сезонов года (при переводе культур из режима +7 °C в условия +23 ± 2 °C), индуцирует процессы морфогенеза *in vitro* в тканях луковичных чешуй и стимулирует развитие геофитов после относительного зимнего покоя. Усиление роста после периода низких температур наблюдала М. Nikolić с коллегами (2008) при оценке влияния температуры культивирования на преодоление покоя и накопление углеводов в луковичах *F. meleagris* L., полученных в культуре *in vitro*.

Согласно литературным данным, наиболее доступными способами создания коллекций растений *in vitro*, находящихся в состоянии замедленного роста, являются снижение температуры культивирования и уменьшение концентрации минеральных компонентов среды (Engelmann, 2011). Подобные меры (температура +4–6 °C, 1 % сахара) позволили сохранить в беспересадочной культуре микроклоны *F. meleagris* в течение 18 мес. (Таварткиладзе, Вечернина, 1999). Также имеются работы, свидетельствующие об успешном длительном хранении представителей родов *Allium* L. и *Lilium* L. при температуре –2 °C (Keller, 1992; Bonnier, Van Tuyl, 1997).

Для идентификации генетической стабильности культивируемых растений осуществлен компаративный анализ ISSR-регионов геномной ДНК материнских растений и соответствующих регенерантов. В результате ISSR-ПЦР-амплификаций матриц, выполненных с пятью праймерами, получено от 14 до 23 амплифицированных фрагментов размером от 200 до 1800 п.н. Температура отжига праймеров варьировала в диапазоне от 42 до 51 °C (табл. 2).

При анализе матриц не выявлен полиморфизм амплифицированных ISSR-ПЦР-фрагментов (рис. 4). Установлено отсутствие ($D = 0$) генетической изменчивости у регенерантов, сформированных в ходе прямого органогенеза в первом пассаже, следующим за депонированием в течение 12 мес. Таким образом, не обнаружено генетических различий между материнскими растениями и регенерантами *F. sonnikovae*.

В недавних исследованиях отсутствие соматической изменчивости установлено в работах с *Moringa peregrina* (Forsk.) Fiori (Al Khateeb et al., 2013), а также с Восточными гибридами лилий (Liu, Yang, 2012). При этом генетическая однородность регенерантов объясняется тем, что формирование растений происходит в результате неполового процесса, включающего только митотическую активность клеток (Vasil, Thorpe, 1994; Bairu et al., 2011).

В ряде работ отмечено, что частота соматической изменчивости возрастает у растений, полученных после длительного хранения *in vitro* (Vinci, Parekh, 2003; Bairu et al., 2006). Однако депонирование не всегда приводит к генетической неоднородности регенерантов. Так, с использованием RAPD-анализа установлено полное генетическое соответствие между материнскими растениями различных видов рода *Lilium* и регенерантами, полученными из сегментов луковичных чешуй, хранящихся *in vitro* в течение 6 и 18 мес. (Varshney et al., 2001). Длительное хранение *in vitro* также не вызывало изменений в структуре ДНК у 14 сортов картофеля (Антонова и др., 2004). Наше исследование культуры *F. sonnikovae* подтверждает сведения о том, что длительное депонирование не приводит к возникновению соматической изменчивости и может использоваться для создания коллекций *in vitro* с целью сохранения биоразнообразия флоры.

В результате разработанных систем клонального микро-размножения коллекция *in vitro* лаборатории биотехнологии ЦСБС СО РАН пополнена эндемичным видом Западного Саяна *F. sonnikovae*. В настоящее время коллекция в условиях активного роста насчитывает более 150 растений-регенерантов *F. sonnikovae*, а в условиях замед-

Table 2. ISSR primers used in the study

ISSR primer, 5'–3'	Annealing temperature, °C	Number of amplified fragments	ISSR fragment lengths, bp
(CA) ₆ GT	48	23	200–1400
(CAC) ₃ GC	42	21	470–1600
(CA) ₆ AG	48	18	620–1100
(CT) ₈ TG	51	15	480–1200
(CTC) ₃ GC	42	14	600–1800

ленного роста – 50 образцов. В процессе изучения особенностей среднесрочного хранения *in vitro* нам удалось увеличить период беспересадочного субкультивирования до 9–12 мес., с использованием наиболее доступных приемов по замедлению ростовых процессов – снижение температуры культивирования и уменьшение концентрации минеральных компонентов питательной среды. При этом проведенный ISSR-анализ позволил установить генетическое соответствие материнских растений и регенерантов, полученных после депонирования.

Коллекции *in vitro* служат не только для сохранения уязвимых таксонов в условиях *ex situ*, но также для репатриации *in situ* (Reed et al., 2011). Подобные реинтродукционные мероприятия проводят во многих странах мира для восстановления естественных популяций растений (Krishnan et al., 2011). Однако при осуществлении этих работ необходимо учитывать, что прямое высаживание ограниченного количества генотипов может привести к снижению генетического разнообразия природных популяций. В дальнейших исследованиях планируется предварительная оценка внутривидовой изменчивости выборки растений *F. sonnikovae* из природных популяций с целью отбора полиморфных генотипов и их массового размножения с помощью разработанного протокола как для расширения банка гермоплазмы *in vitro*, так и для репатриации в естественные местообитания.

Acknowledgments

This study was supported by the Integrated Program of Basic Research, Siberian Branch of the RAS, project II.2P/VI.52-1.

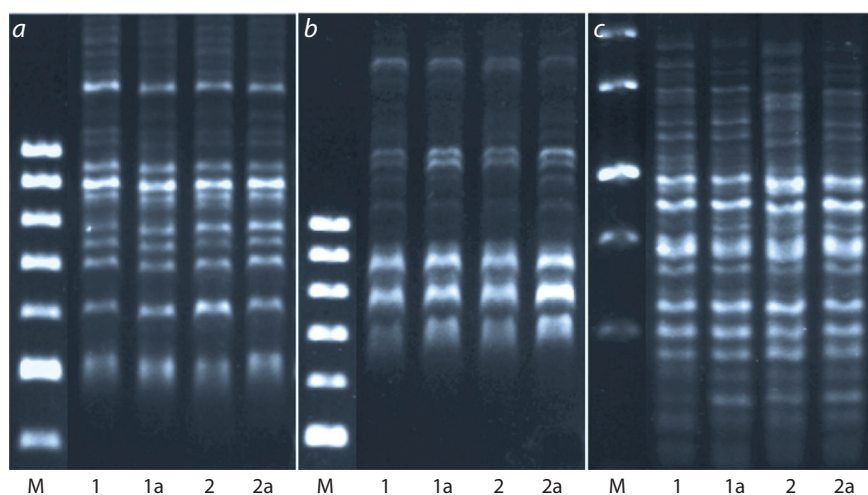


Fig. 4. Electrophoretic resolution of ISSR fragments obtained by PCR with primers: (a) (CAC)₃GC, (b) (CTC)₃GC, (c) (CA)₆GT.

1, 2, Maternal plants; 1a, 2a, first generation of *F. sonnikovae* regenerants. M, molecular weight ladder. Nutrient medium: BDS + 5.0 μM BAP + 2.0 μM NAA.

The authors are grateful to D.N. Shaulo and A.S. Erst, who provided *F. sonnikovae* plants for the experiments.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Al Khateeb W., Bahar E., Lahham J., Schroeder D., Hussein E. Regeneration and assessment of genetic fidelity of the endangered tree *Moringa peregrina* (Forsk.) Fiori using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR). *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 2013;19(1):157-164. DOI 10.1007/s12298-012-0149-z.
- Antonova O.Yu., Truskinov E.V., Frolova D.V., Gavrilenko T.A. Analysis of the genetic stability of potato samples stored under *in vitro* conditions. *Agrarnaya Rossiya = Agricultural Russia*. 2004;6:25-30. (in Russian)
- Bacchetta L., Remotti P.C., Bernardini C., Saccardo F. Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stem nodes of *Lilium*. *Plant. Cell Tiss. Org. Cult.* 2003;74:37-44. DOI 10.1023/A:1023315321931.
- Bairu M.W., Aremu A.O., Van Staden J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul.* 2011;63:147-173. DOI 10.1007/s10725-010-9554-x.
- Bairu M.W., Fennell C.W., Van Staden J. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa AAA* cv. "Zelig"). *Sci. Hortic.* 2006;108(4):347-351. DOI 10.1016/j.scienta.2006.01.039.
- Bell R.L., Reed B.M. *In vitro* tissue culture of pear: Advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation. *Proc. 8th IS on Pear*. 2002;412-418.
- Benson E.E. *Plant Conservation Biotechnology*. L.; Philadelphia P.A.: Taylor and Francis, 2002.

- Bonnier F.J.M., Van Tuyl J.M. Long term *in vitro* storage of lily: effects of temperature and concentration of nutrients and sucrose. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 1997;49:81-87. DOI 10.1023/A:1005810728215.
- Bublyk O.M., Andreev I.O., Spiridonova K.V., Kunakh V.A. Genetic variability in regenerated plants of *Ungernia victoris*. *Biologia Plantarum*. 2012;56(2):395-400. DOI 10.1007/s10535-012-0106-2.
- Cordeiro S.Z., Simas N.K., Henriques A.B., Sato A. *In vitro* conservation of *Mandevilla moricandiana* (Apocynaceae): short-term storage and encapsulation-dehydration of nodal segments. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 2014;50:326-336. DOI 10.1007/s11627-014-9600-x.
- Cruz-Cruz C.A., González-Arnan M.T., Engelmann F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources*. 2013;2:73-95. DOI 10.3390/resources2020073.
- Dunstan D.J., Short K.C. Improved growth of tissue cultures of the onion *Allium cepa*. *Physiol. Plant.* 1977;41(1):70-72.
- Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 2011;47:5-16. DOI 10.1007/s11627-010-9327-2.
- Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem.* 1968;46(5):417-421.
- Jain S.M., Ochatt S.J. Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants, methods in molecular biology. New Jersey: Humana Press, 2010. DOI 10.1007/978-1-60327-114-1.
- Jevremović S., Petrić M., Zivković S., Trifunović M., Subotić A. Superoxide dismutase activity and isoenzyme profiles in bulbs of snake's head fritillary in response to cold treatment. *Arch. Biol. Sci.* 2010; 62(3):553-558. DOI 10.2298/ABS1003553J.
- Joshi S.K., Dhar U., Andola H.C. *In vitro* bulblet regeneration and evaluation of *Fritillaria roylei* Hook. – a high value medicinal herb of the Himalaya. *Acta Hort.* 2007;756:75-84. DOI 10.17660/ActaHortic.2007.756.8.
- Kamenetsky R., Okubo H. Ornamental geophytes: from basic science to sustainable production. Boca Raton, F.L.: CRC Press, 2013.
- Keller J. Influence of different temperature treatments on viability of *in vitro* cultivated *Allium* shoots and bulblets. *Acta Hort.* 1992;319:307-312. DOI 10.17660/ActaHortic.1992.319.47.
- Krishnan P.N., Decruse S.W., Radha R.K. Conservation of medicinal plants of Western Ghats, India and its sustainable utilization through *in vitro* technology. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 2011;47:110-122. DOI 10.1007/s11627-011-9344-9.
- Kul'khanova D.S., Erst A.A., Novikova T.I. *In vitro* regeneration from bulbous scales of *Fritillaria sonnikovae*, an endemic species. *Ontogenez = Ontogenesis* (Moscow). 2015;46(4):259-266. DOI 10.7868/S0475145015040059. (in Russian)
- Liu X., Yang G. Adventitious shoot regeneration of oriental lily (*Lilium orientalis*) and genetic stability evaluation based on ISSR marker variation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 2012;48:172-179. DOI 10.1007/s11627-012-9429-0.
- Marinangeli P.A., Hernandez L.F., Pellegrini C.P., Curvetto N.R. Bulblet differentiation after scale propagation of *Lilium longiflorum*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 2003;128(3):324-329.
- Miller M.P. Tools for populations genetic analyses (TFPGA) 1.3. A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997. Available at <http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/tlem09/docs/TFPGADOC.PDF>.
- Nei M. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 1972;106:283-292.
- Nikolić M., Misić D., Maksimović V., Jevremović S., Trifunović M., Subotić A. Effect of low temperature on rooting rate and carbohydrate content of *Fritillaria meleagris* bulbs formed in culture *in vitro*. *Arch. Biol. Sci., Belgrade.* 2008;60(1):5-6. DOI 10.2298/ABS080105PN.
- Novikova T.I. Use of biotechnological approaches for the conservation of plant biodiversity. *Rastitelnyy mir Aziatskoy Rossii = Plant Life of Asian Russia*. 2013;2(12):119-128. (in Russian)
- Parić A., Cakar J., Muratović E., Karalić E. Induction of bulblets on leaf and bulb explants of endangered *Lilium bosniacum* (G. Beck) G. Beck ex Fritsch. *Botanica Serbica*. 2011;35(1):31-35.
- Poluboyarova T.V., Novikova T.I. Clonal micropropagation of ornamental onions of the subgenus *Melanocrommyum* from flower organs. *Byulleten Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada = Bulletin of the State Nikitskiy Botanical Gardens*. 2013;107:46-52. (in Russian)
- Rakosy-Tican E., Bors B., Szatmari A.-M. *In vitro* culture and medium-term conservation of the rare wild species *Gladiolus imbricatus*. *African J. Biotech.* 2012;11(81):14703-14712. DOI 10.5897/AJB12.784.
- Rani V., Parida A., Raina S. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. *Plant. Cell. Report.* 1995;14:459-462. DOI 10.1007/BF00234055.
- Reed B.M., Sarasan V., Kane M., Bunn E., Pence V.C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant.* 2011;47:1-4. DOI 10.1007/s11627-010-9337-0.
- Shaulo D.N., Erst A.S. A new species of *Fritillaria* L. (Liliaceae) from West Sayan. *Turczaninowia*. 2010;13(3):46-49. (in Russian)
- Song J.Y., Mattson N.S., Jeong B.R. Efficiency of shoot regeneration from leaf, stem, petiole and petal explants of six cultivars of *Chrysanthemum morifolium*. *Plant. Cell Tiss. Org. Cult.* 2011;107:295-304. DOI 10.1007/s11240-011-9980-0.
- Tavartkiladze O.K., Vechernina N.A. Conservation of the plant gene pool in *in vitro* culture collections. *Izvestiya Altayskogo gosudarstvennogo universiteta = Izvestiya of the Altai State University*. 1999;5:13-15. (in Russian)
- Varshney A., Lakshmikumaran M., Srivastava P.S., Dhawan V. Establishment of genetic fidelity of *in vitro*-raised *Lilium* bulblets through RAPD markers. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 2001;37:227-231. DOI 10.1007/s11627-001-0040-z.
- Vasil I.K., Thorpe T.A. Plant cell and tissue culture. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994.
- Vinci V.A., Parekh S.R. Handbook of industrial cell culture: mammalian, microbial and plant cells. New Jersey: Humana Press, 2003. DOI 10.1007/978-1-59259-346-0.
- Zvyagina N.S., Dorogina O.V., Krasnikov A.A. Genetic differentiation and karyotype variation in *Hedysarum chajrakanicum*, an endemic species of Tuva Republic, Russia. *Indian J. Experim. Biol.* 2016; 54(5):338-344.