

IRAP-анализ для оценки генетической стабильности эндемичных и исчезающих видов флоры Западного Кавказа в коллекции *in vitro*

И.И. Супрун¹, В.И. Маляровская², И.В. Степанов¹, Л.С. Самарина²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур, Сочи, Россия

² Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства и виноделия, Краснодар, Россия

e-mail: supruni@mail.ru; malyarovskaya@yandex.ru

Характеристика генетического разнообразия является одной из главных составляющих создания коллекций геноресурсов. Молекулярные маркеры – наиболее эффективный инструмент характеристики и оценки генетического разнообразия. IRAP (inter-retrotransposons amplified polymorphism) маркеры рекомендовали себя как одни из наиболее эффективных для характеристики и оценки геноресурсных коллекций растений, подтверждения генетической стабильности сохраняемых *in vitro* сортов и видов. В связи с этим целью настоящей работы – подобрать IRAP ДНК-праймеры для оценки генетической стабильности трех редких и исчезающих видов растений Западного Кавказа, сохраняемых в коллекции *in vitro*. Выполнена апробация 16 IRAP-праймеров на исследуемых видах: синеголовник приморский (*Eryngium maritimum* L.), подснежник Воронова (*Galanthus woronowii* Losinsk.) и колокольчик твердолистный (*Campanula sclerophylla* Kolak). Результаты апробации маркеров позволили выявить наиболее перспективные для использования в анализе генетической стабильности растения-регенеранты. У синеголовника приморского по 8 из 16 использованных в работе IRAP-праймеров были получены ПЦП-продукты. В ходе апробации на образцах подснежника Воронова фрагменты амплификации были обнаружены у 8 из 16 IRAP-праймеров, при этом число фрагментов варьировало от 2 до 12. У колокольчика твердолистного в выборке из 16 апробированных IRAP-праймеров у 9 была установлена амплификация. Количество фрагментов у образцов, в зависимости от маркера, варьировало от 1 до 11. Результаты генотипирования регенерантов сопоставлялись с данными по маточным растениям, экспланты которых были введены в стерильную культуру и размножены *in vitro*. Всего в работе было задействовано по 60 регенерантов для каждого из видов природной флоры Западного Кавказа. Полученные в ходе генотипирования сведения позволяют предположить отсутствие генетических изменений в процессе консервации *in vitro* у всех изученных видов. Расширенная выборка регенерантов для каждого вида была проанализирована для определения генетической стабильности с использованием ранее апробированных ISSR-маркеров. Эти результаты свидетельствуют о низкой вероятности возникновения генетических изменений в процессе размножения и сохранения *in vitro* трех исследуемых видов.

Ключевые слова: *Eryngium*; *Galanthus*; *Campanula*; IRAP; сохранение геноресурсов; генетическое разнообразие.

Для цитирования: Супрун И.И., Маляровская В.И., Степанов И.В., Самарина Л.С. IRAP-анализ для оценки генетической стабильности эндемичных и исчезающих видов флоры Западного Кавказа в коллекции *in vitro*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(1):8-14. DOI 10.18699/VJ19.455

IRAP-analysis for evaluating the genetic stability of endemic and endangered species of the Western Caucasus flora in the collection *in vitro*

I.I. Suprun¹, V.I. Malyarovskaya², I.V. Stepanov¹, L.S. Samarina²

¹ Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops, Sochi, Russia

² North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Wine-making, Krasnodar, Russia

e-mail: supruni@mail.ru; malyarovskaya@yandex.ru

The characterization of genetic diversity is one of the main components of the genetic resources collection and management. Molecular markers are the most effective tool for characterizing and assessing genetic diversity in plant collections. IRAP (inter-retrotransposons amplified polymorphism) markers have proven to be some of the most effective for characterizing and evaluating germplasm, confirming the genetic fidelity of *in vitro* preserved cultivars and species. In this regard, the aim of this work is to test several IRAP primers to identify genetic polymorphism and study the genetic fidelity of three rare and endemic flora species of the Western Caucasus during *in vitro* conservation. Approbation of 16 IRAP-primers on the investigated species was carried

out for *Eryngium maritimum* L., *Galanthus woronowii* Losinsk. and *Campanula sclerophylla* Kolak. The results made it possible to select the most efficient of them for genetic fidelity analysis of micropropagated plants. Out of 16 IRAP primers 8 amplified PCR products in *Eryngium maritimum*. In *Galanthus woronowii* as well 8 of 16 IRAP primers resulted in the amplification with the number of DNA fragments ranging from 2 to 12. In *Campanula sclerophylla* 9 of 16 IRAP primers amplified 1 to 11 fragments, depending on the marker. The results of the genotyping of regenerants were compared with data on stock *in situ* plants, which were the source of explants for *in vitro* conservation. In total, 60 regenerants for each species of the natural flora of the Western Caucasus were involved in the study. The results obtained demonstrated no genetic changes of the regenerants in all the studied species. These results were confirmed using ISSR analysis of an extended sample set of microplants for each species. The results obtained can serve as evidence of a low probability of genetic disorders during *in vitro* propagation and conservation of the species *Eryngium maritimum* L., *Galanthus woronowii* Losinsk. and *Campanula sclerophylla* Kolak.

Key words: *Eryngium*; *Galanthus*; *Campanula*; IRAP; germplasm conservation; biodiversity.

For citation: Suprun I.I., Malyarovskaya V.I., Stepanov I.V., Samarina L.S. IRAP-analysis for evaluating the genetic stability of endemic and endangered species of the Western Caucasus flora in the collection *in vitro*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(1):8-14. DOI 10.18699/VJ19.455 (in Russian)

Введение

Характеристика растительных генетических ресурсов – важная задача сохранения биоразнообразия, позволяющая принимать технически обоснованные решения при выборе образцов для долгосрочных природоохранных мероприятий. Понимание генетического разнообразия видов, представленных в генофонде, важно для разработки надежных стратегий консервации и для эффективного использования генофонда в конкретных селекционных программах (Ferreira, 2006). Сохранение генетических ресурсов в природной агроэкосистеме, в которой они эволюционировали (*in situ*), в настоящее время рассматривается как дополнение к стратегиям, основанным на создании дублирующих генбанков (*ex situ*), с целью предотвращения генетической эрозии растительных ресурсов (Negri et al., 2000; Lucchin et al., 2003). *In vitro* депонирование гермоплазмы является частью консервации генетических ресурсов *ex situ* и, как известно, обладает рядом преимуществ. Однако при долговременном субкультивировании в течение нескольких лет необходимы проверка и подтверждение генетической стабильности эксплантов (Liu, Yang, 2012; Супрун и др., 2014а). Кроме того, для грамотного сохранения биоразнообразия эндемичных видов растений в *ex situ* коллекциях необходимы популяционные исследования внутривидового разнообразия с использованием молекулярно-генетических маркеров (Ferreira, 2006). Молекулярная характеристика – эффективный инструмент для определения разнообразия путем генотипирования отдельных геномов и гаплотипирования индивидуальных генов, выявления генетической стабильности в процессе консервации (Lanteri, Varcaccia, 2006). Известно несколько типов молекулярных маркеров, но наиболее информативными, полиморфными и воспроизводимыми из них признаны SSR и SNP (Börner et al., 2012). Кроме них, высоким полиморфизмом и надежностью для характеристики внутри- и межвидового биоразнообразия отличаются ISSR- и IRAP-маркеры.

IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism) маркеры – сравнительно новый тип маркеров, разработанный на основе LTR-последовательностей ретротранспозов. Несмотря на то, что ретротранспозоны рассеяны по геному, они также могут встречаться кластеризованно. Этот

феномен кластеризации делает возможным использование IRAP-метода маркирования, который детектирует инсерционный полиморфизм путем амплификации участка ДНК между двумя ретротранспозонами (Kalendar et al., 2011). IRAP-праймеры успешно использовались для определения генетического разнообразия внутри видов *Vicia faba* (Tomás et al., 2016), *Monilophthora pernicioso* (Santana et al., 2012), межвидового разнообразия капусты (*Brassica* sp.) (Mahjoob et al., 2016), ячменя (*Hordeum* sp.) (Singh et al., 2017), для оценки генетической стабильности культивируемых *in vitro* растений полыни горькой (*Artemisia absinthium*) (Kour et al., 2014), альбиции ленкоранской (*Albizia julibrissin*) (Rahmani et al., 2015), а также для популяционных исследований геноресурсных коллекций (Боронникова, 2009; Боронникова, Календарь, 2010).

Сохранение эндемичных и исчезающих видов Западного Кавказа *ex situ* ведется на базе Всероссийского научно-исследовательского института цветоводства и субтропических культур (г. Сочи) с 2003 г. (Рындин и др., 2015). В течение последних пяти лет в коллекции *in vitro* сохраняются виды: синеголовник приморский (*Eryngium maritimum* L.), подснежник Воронова (*Galanthus woronowii* Losinsk.) и колокольчик твердолистный (*Campanula sclerophylla* Kolak) (Маляровская и др., 2013; Коломиец и др., 2014а, б; Kolomiets et al., 2016). Однако подбор молекулярных маркеров, эффективных для генотипирования этих видов, до сих пор не осуществлен. В недавнем времени авторами проведена работа по подбору ISSR-праймеров для указанных видов природной флоры (Супрун и др., 2014а, б, 2017). Цель настоящих исследований – подобрать информативные IRAP ДНК-праймеры для оценки генетической стабильности редких и исчезающих видов растений Западного Кавказа, сохраняемых в коллекции *in vitro*.

Материалы и методы

Растительный материал для анализа – исчезающие эндемичные виды Западного Кавказа *Galanthus woronowii* Losinsk. (подснежник Воронова), *Campanula sclerophylla* Kolak (колокольчик твердолистный) и *Eryngium maritimum* L. (синеголовник приморский), занесенные в Красную книгу Российской Федерации и входящие в ка-

тегорию 2 – виды с неуклонно сокращающейся численностью, которые при продолжении воздействия стрессовых факторов могут в короткие сроки попасть в категорию находящихся под угрозой исчезновения. Для выделения ДНК использовали листья от растений из природной флоры и из коллекции *in vitro*, сохраняемые в течение пяти лет (10–13 субкультивирований) во Всероссийском научно-исследовательском институте цветоводства и субтропических культур.

IRAP ДНК-праймеры апробировали для видов *Eryngium maritimum* L. (с учетом ранее опубликованных результатов (Jawdat et al., 2010), а также для видов *Galanthus woronowii* Losinsk. и *Campanula sclerophylla* Kolak.

Выделение ДНК проводилось по стандартной ЦТАБ (цетилтриметиламмония бромид) методике (Murray, Thompson, 1980). Количество и фрагментацию ДНК проверяли электрофорезом в 1.5–2.5 % агарозном геле и буфере, приготовленном на основе 0.5 М Трис-борат-ЭДТА буфера с добавлением 7 мкл 1 % этидиум бромид, при напряженности поля 10 В/см и напряжении 150 В в течение 30 мин.

Структура 16 IRAP-праймеров, использованных в работе, представлена в Приложении 1¹. ПЦР проводили согласно следующей программе: 3 мин предварительной денатурации при температуре 95 °С; последующие 35 циклов: денатурация 35 с при 95 °С, отжиг праймеров 1 мин при 55 °С, элонгация 1.5 мин при 72 °С и финальный цикл синтеза при температуре 72 °С в течение 5 мин. 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 продуктов ПЦР проводили в 2 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Для генотипирования регенерантов IRAP-праймерами применяли электрофорез продуктов ПЦР в 3.5 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

Результаты

Отбор IRAP-праймеров для проведения генотипирования синеголовника приморского (*Eryngium maritimum*). Из использованных в работе 16 IRAP-праймеров у синеголовника приморского продукты амплификации получены для восьми маркеров. Для амплифицированных маркеров была характерна различная степень выраженности ПЦР-продуктов. Количество фрагментов варьировало от 12 (Cass2 и MET2R) до 1 (LTR3). Отсутствовала амплификация у маркеров IRAP-TDK1F; IRAP-TDK2R; IRAP-TDK12F; IRAP-TDK12R; IRAP-TDK13F; IRAP-TDK13R; LTR2BARE1; LTR15 (см. рисунок, а). По качеству и информативности ДНК-фингерпринтов для проведения генотипирования растений-регенерантов было отобрано четыре IRAP-праймера: IRAP-TDK1R, MET2F, MET2R и Cass2 (табл. 1).

Отбор IRAP-праймеров для проведения генотипирования подснежника Воронова (*Galanthus woronowii*). В ходе апробации на образцах подснежника Воронова для 8 из 16 IRAP-праймеров прошла амплификация. Количе-

Table 1. Efficiency of 16 IRAP primers for *Eryngium maritimum* genotyping

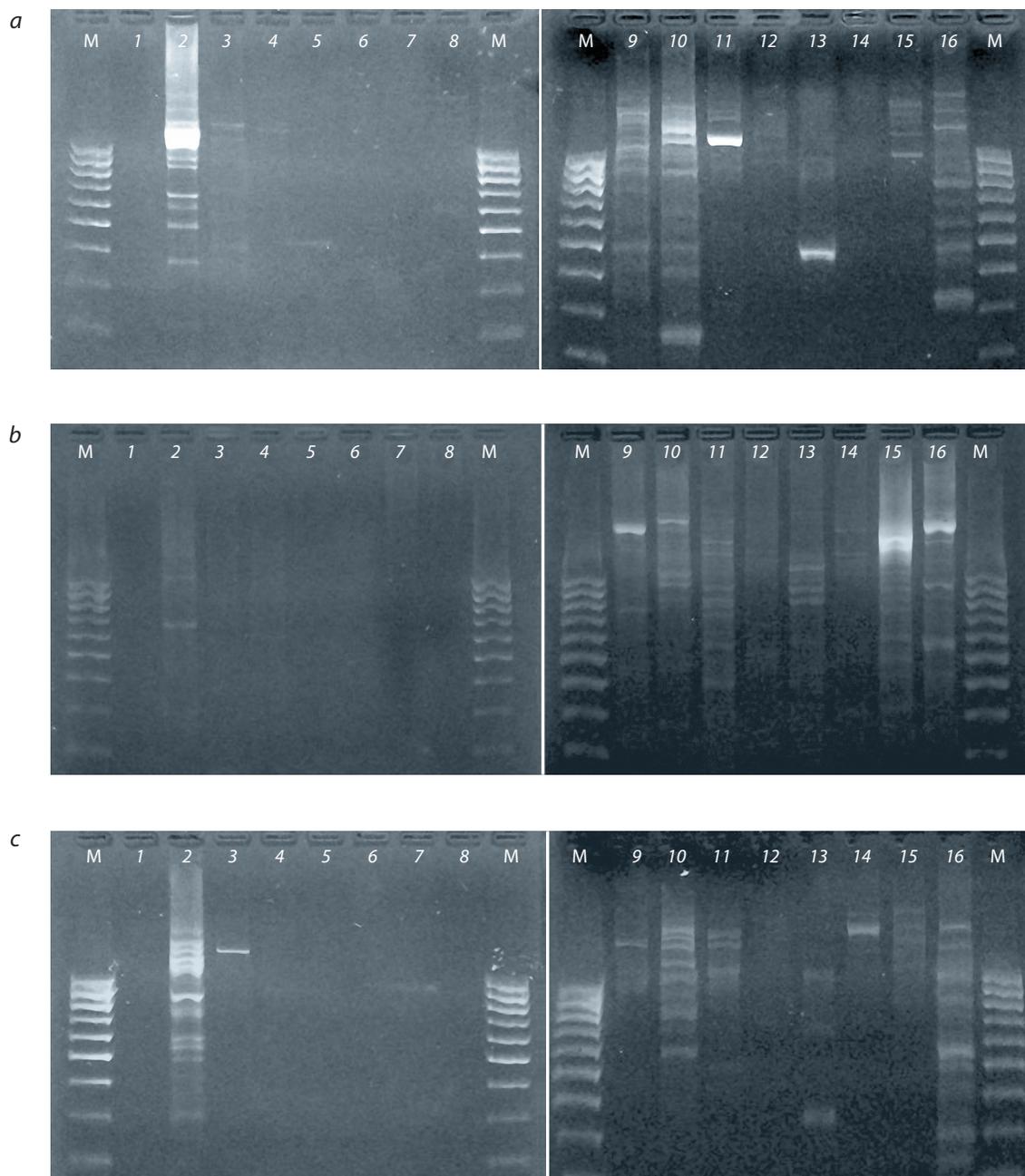
IRAP primer	Number of DNA fragments	Prioritization*
IRAP-TDK1F	–	IV
IRAP-TDK1R	11	I
IRAP-TDK2F	6	III
IRAP-TDK2R	–	IV
IRAP-TDK12F	–	IV
IRAP-TDK12R	–	IV
IRAP-TDK13F	–	IV
IRAP-TDK13R	–	IV
MET2F	10	I
MET2R	12	I
LTR1BARE1	6	III
LTR2BARE1	–	IV
LTR3	1	III
LTR15	–	IV
Cass1	6	II
Cass2	12	I

* Here and in Tables 2, 3: I, top priority; II, medium priority; III, bottom priority; IV, use is futile.

Table 2. Efficiency of 16 IRAP primers for *Galanthus woronowii* genotyping

IRAP primer	Number of DNA fragments	Prioritization
IRAP-TDK1F	–	IV
IRAP-TDK1R	2	III
IRAP-TDK2F	–	IV
IRAP-TDK2R	–	IV
IRAP-TDK12F	–	IV
IRAP-TDK12R	–	IV
IRAP-TDK13F	–	IV
IRAP-TDK13R	–	IV
MET2F	4	II
MET2R	8	I
LTR1BARE1	8	I
LTR2BARE1	–	IV
LTR3	4	III
LTR15	2	III
Cass1	12	I
Cass2	8	I

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2019-23/appx1.pdf>



Electrophoregram of *Eryngium maritimum* (a), of *Galánthus wóronowii* (b) and *Campanula sclerophylla* (c) with 16 IRAP primers. 1, IRAP-TDK1F; 2, IRAP-TDK1R; 3, IRAP-TDK2F; 4, IRAP-TDK2R; 5, IRAP-TDK12F; 6, IRAP-TDK12R; 7, IRAP-TDK13F; 8, IRAP-TDK13R; 9, MET2F; 10, MET2R; 11, LTR1BARE1; 12, LTR2BARE1; 13, LTR3; 14, LTR15; 15, Cass1; 16, Cass2; M, DNA molecular weight ladder (100–3000 bp).

ство ДНК-фрагментов маркеров варьировало от 2 до 12. По качеству и информативности ДНК-фингерпринтов для проведения генотипирования растений-регенерантов было отобрано четыре IRAP-праймера: MET2R, LTR1BARE1, Cass1, Cass2 (см. рисунок, б; табл. 2).

Отбор IRAP-праймеров для проведения генотипирования колокольчика твердолистного (*Campanula sclerophylla*). В выборке из апробированных 16 IRAP-праймеров амплификация была установлена у 9 из них (см. рисунок, в; табл. 3). Количество фрагментов у образ-

цов, в зависимости от маркера, варьировало от 1 до 11. По качеству и информативности ДНК-фингерпринтов для проведения генотипирования растений-регенерантов было отобрано три IRAP-праймера: MET2R, IRAP-TDK1R, Cass2.

Анализ генетической стабильности регенерантов трех видов *in vitro*. Из апробированных 16 IRAP-праймеров для генотипирования регенерантов синеголовника приморского было отобрано 4, которые, по данным других исследователей, показывали высокий внутривидовой

Table 3. Efficiency of 16 IRAP markers
for *Campanula sclerophylla* genotyping

IRAP primer	Number of DNA fragments	Prioritization
IRAP-TDK1F	–	IV
IRAP-TDK1R	11	I
IRAP-TDK2F	1	III
IRAP-TDK2R	–	IV
IRAP-TDK12F	–	IV
IRAP-TDK12R	–	IV
IRAP-TDK13F	–	IV
IRAP-TDK13R	–	IV
MET2F	1	III
MET2R	8	I
LTR1BARE1	4	II
LTR2BARE1	–	IV
LTR3	3	III
LTR15	2	III
Cass1	4	II
Cass2	10	I

полиморфизм – до 82 % (Jawdat et al., 2010; Yuying et al., 2011). В общей сложности было проанализировано 60 растений-регенерантов и маточное растение, из которого были получены регенеранты. У всех клонов ДНК-фингерпринты не отличались от маточного растения (Приложение 2).

Для генотипирования регенерантов колокольчика твердолистного было отобрано 4 из 16 IRAP-праймеров. Генотипирование 60 растений-регенерантов и исходного маточного растения не выявило различий между образцами.

Отсутствие различий у растений-регенерантов в сравнении с исходным маточным растением было подтверждено с помощью ISSR-маркеров X10 (для синеголовника приморского) и ASSR15 (для колокольчика твердолистного), в результате чего были получены идентичные ДНК-фингерпринты.

Обсуждение

Для эффективного анализа результатов мультилокусного маркирования, в частности IRAP-маркеров, необходимо высокое качество получаемых ДНК-фингерпринтов. Особенно важное значение это приобретает при анализе идентичности исследуемых клонов, так как на результат могут повлиять любая неточность и недостоверная их интерпретация.

Ошибки в интерпретации могут быть вызваны неправильным определением количества ДНК-фрагментов на электрофореграмме, а также при некорректной оценке их размера в парах нуклеотидов. К причинам, способным вызывать подобные ошибки, можно отнести фоновое свечение

дорожки и интенсивность свечения ДНК-фрагмента. На основе изложенных выше критериев был проведен отбор IRAP-праймеров, апробированных на трех изучаемых видах растений. При этом для максимальной достоверности амплификацию по каждому из маркеров тестировали в трехкратной повторности. При проверке генетической стабильности регенерантов с использованием отобранных ДНК-маркеров амплификацию и электрофорез продуктов ПЦР по каждому из праймеров проводили дважды. В работе было задействовано 16 IRAP-последовательностей из различных публикаций по генотипированию цветковых растений (Jawdat et al., 2010; Yuying et al., 2011; Senková et al., 2013). Праймеры Cass1 и Cass2, используемые ранее в работе словацких исследователей (Senková et al., 2013) для дифференциации генотипов сливы (*Prunus domestica* L.), оказались эффективны в нашей работе для всех трех изучаемых видов флоры. При анализе сливы авторы получали 10–18 фрагментов ДНК, нами было получено 4–10, 6–12 и 8–12 фрагментов у трех видов. Из апробированных 16 IRAP-праймеров для генотипирования регенерантов синеголовника приморского и подснежника Воронова было отобрано по 4, которые, по данным других исследователей, показывали высокий внутривидовой полиморфизм – до 82 % (Jawdat et al., 2010; Yuying et al., 2011), а для колокольчика твердолистного – 3 праймера. В сравнении с результатами зарубежных коллег, которые применяли IRAP-анализ для популяционных исследований рода *Eryngium* с праймерами серии IRAP-TDK (Jawdat et al., 2010), в нашей работе у вида *E. maritimum* количество амплифицированных этими праймерами фрагментов получено в два-три раза меньше. Молекулярные данные этих авторов показали, что синеголовник приморский, произрастающий в прибрежных засоленных грунтах, генетически дистантен от других видов синеголовника, произрастающих в горных местностях, это может объяснять различие эффективности указанных праймеров. В целом следует отметить небольшое количество фрагментов амплификации отобранными IRAP-праймерами у трех изученных видов флоры Западного Кавказа в сравнении с данными других авторов (Боронникова, Календарь, 2010; Jawdat et al., 2010; Senková et al., 2013), которые получали в два-четыре раза большее количество ампликонов в результате IRAP-анализа.

Заключение

В настоящей работе проведена апробация 16 IRAP-праймеров на генотипах трех видов флоры Западного Кавказа. Для каждого вида был установлен свой набор маркеров, дающих качественные ДНК-фингерпринты и выявляющих внутривидовой полиморфизм, что позволяет использовать их для поиска генетических отклонений при микроразмножении и консервации изучаемых видов. Для каждого вида было отобрано три-четыре наиболее информативных маркера для проведения генотипирования выборки регенерантов и маточных растений. По всем исследованным видам ДНК-фингерпринты были идентичны у регенерантов и исходных маточных растений, из тканей которых они были размножены. Исходя из полученных результатов работы, можно заключить, что использованные в работе IRAP-праймеры дают стабильные и достоверные

данные, свидетельствующие о генетической идентичности регенерантов с маточным растением. Однако для более полной оценки генетической стабильности регенерантов в процессе микроклонального размножения необходимо проведение REMAP-анализа, сочетающего ISSR- и IRAP-полиморфизм.

Список литературы / References

- Боронникова С.В. Генетическая паспортизация популяций редких видов растений рода *Adonis* с использованием ISSR- и IRAP-маркеров. Изв. ТСХА. 2009;1:82-88.
[Boronnikova S.V., Genetic certification of populations of rare plant species of the genus *Adonis* using ISSR and IRAP markers. Izvestiya Timiryazevskoy Selskokozyaystvennoy Akademii = Bulletin of the Timiryazev Agricultural Academy. 2009;1:82-88. (in Russian)]
- Боронникова С.В., Календарь Р.Н. Использование IRAP-метода для анализа генетической изменчивости популяций ресурсных и редких видов растений. Генетика. 2010;46(1):44-50.
[Boronnikova S.V., Calendar R.N. Using IRAP markers for analysis of genetic variability in populations of resource and rare species of plants. Russ. J. Genet. 2010;46(1):36-42.]
- Коломиец Т.М., Маляровская В.И., Гвасалия М.В., Самарина Л.С., Соколов Р.Н. Микроразмножение *in vitro* субтропических, декоративных культур и эндемиков Западного Кавказа: оригинальные и оптимизированные протоколы. С.-х. биология. 2014;3:49-58.
[Kolomiets T.M., Malyarovskaya V.I., Gvasaliya M.V., Samarina L.S., Sokolov R.N. *In vitro* propagation of subtropical and ornamental plants and endemic species of Western Caucasus: developed and improved protocols. Selskokozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2014;3:49-58. (in Russian)]
- Коломиец Т.М., Соколов Р.Н., Маляровская В.И. Микроразмножение синеголовника приморского (*Eringium maritimum* L.) в культуре *in vitro*. Субтропическое и декоративное садоводство. 2014;50:196-204.
[Kolomiets T.M., Sokolov R.N., Malyarovskaya V.I. Micropropagation of *Eringium maritimum* L. *in vitro*. Subtropicheskoye i Dekorativnoye Sadovodstvo = Subtropical and Ornamental Horticulture. 2014;50:196-204. (in Russian)]
- 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*. Науч. журн. КубГАУ (Электронный ресурс). 2013;10(094). <http://ej.kubagro.ru/2013/10/pdf/12.pdf>.
[Malyarovskaya V.I., Kolomiets T.M., Sokolov R.N., Samarina L.S. Effect of the light spectral distribution on the growth and development of *Lilium caucasicum* *in vitro*. Nauchnyy Zhurnal KubGAU = Scientific Journal of KubSAU (Electronic resource). 2013;10(094). Available at <http://ej.kubagro.ru/2013/10/pdf/12.pdf>. (in Russian)]
- Рындин А.В., Белоус О.Г., Питула З.В., Маляровская В.И. Лаборатория биотехнологии, физиологии и биохимии растений Всероссийского научно-исследовательского института цветоводства и субтропических культур: вчера, сегодня, завтра. Субтропическое и декоративное садоводство. 2015;54:9-21.
[Ryndin A.V., Belous O.G., Pritula Z.V., Malyarovskaya V.I. The Laboratory of Biotechnology, Plant Physiology and Biochemistry, Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops: yesterday, today, tomorrow. Subtropicheskoye i Dekorativnoye Sadovodstvo = Subtropical and Ornamental Horticulture. 2015;54:9-21. (in Russian)]
- Супрун И.И., Коломиец Т.М., Маляровская В.И., Соколов Р.Н., Самарина Л.С., Слепченко Н.А. Апробация ISSR ДНК-маркеров для генотипирования редких видов растений Западного Кавказа: *Lilium caucasicum* Misch. ex Grossh., *Galanthus woronowii* Kolak., *Pancreatum maritimum* L. Науч. журн. КубГАУ. (Электронный ресурс). 2014a;103(09):<http://ej.kubagro.ru/2014/09/pdf/37.pdf>.
[Suprun I.I., Kolomiets T.M., Malyarovskaya V.I., Sokolov R.N., Samarina L.S., Slepchenko N.A. Test of ISSR markers for genotyping of rare plant species of Western Caucasus: *Lilium caucasicum* Misch. ex Grossh., *Galanthus woronowii* Kolak., *Pancreatum maritimum* L. Nauchnyy Zhurnal KubGAU = Scientific Journal of KubSAU (Electronic resource). 2014a;103(09). Available at <http://ej.kubagro.ru/2014/09/pdf/37.pdf>. (in Russian)]
- Супрун И.И., Коломиец Т.М., Маляровская В.И., Соколов Р.Н., Самарина Л.С. Поиск оптимальных ISSR маркеров для проведения генотипирования панкрата морского. Плодоводство и виноградарство Юга России (Электронный ресурс). 2014b;30(06):<http://journal.kubansad.ru/pdf/14/06/02.pdf>.
[Suprun I.I., Kolomiets T.M., Malyarovskaya V.I., Sokolov R.N., Samarina L.S. The search of optimal ISSR markers for sea daffodil genotyping. Plodovodstvo i Vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit Farming and Viticulture in Southern Russia (Electronic resource). 2014b;30(06). Available at <http://journal.kubansad.ru/pdf/14/06/02.pdf>. (in Russian)]
- Супрун И.И., Маляровская В.И., Степанов И.В., Коломиец Т.М., Самарина Л.С., Слепченко Н.А. Апробация ISSR ДНК-маркеров для генотипирования вида *Galanthus woronowii* Losinsk. и анализ генетической стабильности растений, полученных в культуре *in vitro*. Науч. журн. КубГАУ (Электронный ресурс). 2017;133(09):<http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-133-088>.
[Suprun I.I., Malyarovskaya V.I., Stepanov I.V., Kolomiets T.M., Samarina L.S., Slepchenko N.A. Test of ISSR markers for genotyping *Galanthus woronowii* Losinsk. and analysis of the genetic stability of plants obtained *in vitro*. Nauchnyy Zhurnal KubGAU = Scientific Journal of KubSAU (Electronic resource). 2017;133(09). Available at <http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-133-088>. (in Russian)]
- Börner A., Khlestkina E.K., Chebotar S., Nagel M., Arif M.A., Neumann K., Kobiljski B., Lohwasser U., Röder M.S. Molecular markers in management of *ex situ* PGR – A case study. J. Biosci. 2012;37(5):871-877.
- Ferreira M.E. Molecular analysis of gene banks for sustainable conservation and increased use of crop genetic resources. Eds. J. Ruane, A. Sonnino. The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources. Rome: FAO, 2006;121-127. <http://www.fao.org/biotech/docs/ferreira.pdf>.
- Jawdat D., Al-Faoury H., Ayyoubi Z., Al-Safadi B. Molecular and ecological study of *Eryngium* species in Syria. Biologia. 2010;65(5):796-804. DOI 10.2478/s11756-010-0086-7.
- Kalendar R., Flavell A.J., Ellis T.H.N., Sjakste T., Moisy C., Schulman A.H. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. Heredity. 2011;106(4):520-530. DOI 10.1038/hdy.2010.93.
- Kolomiets T.M., Malyarovskaya V.I., Samarina L.S. *In vitro* conservation of *Campanula sclerophylla* Kolak – endemic endangered species of Western Caucasus. Plant Tissue Cult. & Biotech. 2016;26(2):143-149.
- Kour B., Kour G., Kaul S., Dhar M.K. *In vitro* mass multiplication and assessment of genetic stability of *in vitro* raised *Artemisia absinthium* L. plants using ISSR and SSAP molecular markers. Adv. Bot. 2014;13(8):1-7. DOI 10.1155/2014/727020.
- Lanteri S., Barcaccia G. Molecular markers based analysis for crop germplasm preservation. Eds. J. Ruane, A. Sonnino. The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources. Rome: FAO, 2006;55-66.
- 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;48:72-179.
- Lucchin N., Barcaccia G., Parrini P. Characterization of a flint maize (*Zea mays* var. *indurata*) Italian landrace: I. Morpho-phenological and agronomic traits. Gen. Res. Crop Evol. 2003;50(3):315-327.
- Mahjoob B., Zarini H.N., Hashemi S.H., Shamasbi V. Comparison of ISSR, IRAP and REMAP markers for assessing genetic diversity in different species of *Brassica* sp. Russ. J. Genet. 2016;52:1272. DOI 10.1134/S1022795416120073.

- Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 1980;8(19):4321-4325.
- Negri V., Tosti N., Falcinelli M., Veronesi F. Characterization of thirteen cowpea landraces from Umbria (Italy). Strategy for their conservation and promotion. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2000;47:141-146.
- Rahmani M.-S., Rahmani P.M., Pijut P.M., Pijut N., Shabaniyan N., Shabaniyan M.N. Genetic fidelity assessment of *in vitro*-regenerated plants of *Albizia julibrissin* using SCoT and IRAP fingerprinting. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 2015;51(4):407-419. DOI 10.1007/s11627-015-9692-y.
- Santana M.F., de Araújo E.F., de Souza J.T., Mizubuti E.S.G., de Queiroz M.V. Development of molecular markers based on retrotransposons for the analysis of genetic variability in *Monilophthora perniciosa*. *Eur. J. Plant. Pathol.* 2012;134:497-507. DOI 10.1007/s10658-012-0031-4.
- Senková S., Žiarovská J., Bežo M., Štefúnová V., Ražná K. Utilization of IRAP technique for plums genotypes differentiation. *Biosci. Res.* 2013;10(1):1-7.
- Singh S., Nandhaa P.S., Singh J.S. Transposon-based genetic diversity assessment in wild and cultivated barley. *Crop J.* 2017;5(4):296-304. DOI 10.1016/j.cj.2017.01.003.
- Tomás D., Dias A.L., Silva M., Oliveira H.R., Suso M.J., Viegas W., Veloso M.M. Genetic diversity assessment of Portuguese cultivated *Vicia faba* L. through IRAP markers. *Diversity.* 2016;8(2):8. DOI 10.3390/d8020008.
- Yuying S., Xiajunb D., Feia W., Binhuua C., Zhihonga G., Zhena Z. Analysis of genetic diversity in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) based on REMAP and IRAP molecular markers. *Sci. Hortic.* 2011;132(5):50-58. DOI 10.1016/j.scienta. 2011.10.005.

ORCID ID

V.I. Malyarovskaya orcid.org/0000-0003-4213-8705
L.S. Samarina orcid.org/0000-0002-0500-1198

Acknowledgements. This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 16-44-230274; administration of the Krasnoyarsk Krai; and the Federal Agency for Scientific Organizations, research project 0683-2014-0007.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received April 12, 2018. Revised September 20, 2018. Accepted September 21, 2018.