

УРОВНИ ПЛОИДНОСТИ И ОТНОСИТЕЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ ДНК
В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ *IN VITRO*

М.В. Скапцов, М.А. Краснобородкина, М.Г. Куцев, С.В., Смирнов, А.И. Шмаков, А.В. Матсура
Алтайский государственный университет, 656049, Барнаул, пр-т Ленина, 61

E-mail: mr.skaptsov@mail.ru, mariakholodkova@gmail.com, m_kucev@mail.ru, serg_sm_@mail.ru, ssbghot@mail.ru, amatsyura@gmail.com

В данном исследовании представлены сведения об изменчивости в уровнях плоидности и размера генома регенерантов *R. acetosa* полученных методами не прямого и прямого морфогенеза в культуре *in vitro*. Культивирование мезофильных эксплантов проводили в присутствии ауксинов для поддержания пролиферации каллуса с последующим стимулированием непрямого морфогенеза. Для стимулирования прямого морфогенеза, апикальные меристемы проростков культивировали на питательных средах с преобладанием цитокининов. Исследование уровня плоидности и размера генома проводили методами проточной цитометрии и световой микроскопии. Нами установлено, что максимальные вариации в размере генома регенерантов отмечаются для растений, полученных через процесс непрямого морфогенеза. Также, в данном случае, были отмечены тетраплоидные формы с удвоенным содержанием ДНК.

Ключевые слова: *R. acetosa*, каллус, проточная цитометрия, размер генома, полиплоидия, соматическая изменчивость

PLOIDY LEVEL AND RELATIVE NUCLEAR DNA CONTENT IN THE PLANT CELL
AND TISSUE CULTURE *IN VITRO*

M.V. Skaptsov, M.A. Krasnoborodkina, M.G. Kutsev, S.V. Smirnov, A.I. Shmakov, A.V. Matsyura
Altai State University, 656049, Barnaul, Lenina ave, 61

E-mail: mr.skaptsov@mail.ru, mariakholodkova@gmail.com, m_kucev@mail.ru, serg_sm_@mail.ru, ssbghot@mail.ru, amatsyura@gmail.com

We presented results of variations in the ploidy level and the genome size of the *R. acetosa* regenerants. These regenerants was obtained by indirect and direct morphogenesis in *in vitro* culture. Explants were prepared from seedlings on the three-leaf stage of plant development. More than 100 explants were used to stimulate the indirect and direct morphogenesis. Mesophilic explants were cultured on the MS nutrient medium containing auxin to callus proliferation (2 mg/L NAA, 1 mg/L BA). Cultivation of the callus was maintained for 4 weeks followed by an indirect morphogeneses. Indirect morphogenesis stimulated on the MS medium with cytokinin and gibberellic acid predominance (0.5 mg/L BA, 0.2 mg/L GA3). Direct stimulate morphogenesis from the apical meristem of seedlings on nutrient media with a predominance of cytokinins (1 mg/L BA, 0.25 mg/L NAA). Rhizogenesis have stimulated by transferring of the regenerants to the 1/2MS medium supplemented with 0.2 mg/L of NAA. Research of a ploidy level and genome size was performed by flow cytometry used propidium iodide staining with *Vicia faba* cv "Innovec" (2C=26.90 pg) as internal DNA standard. We calculated the relative DNA content (2C) for *R. acetosa* equal to 6,98 pg. Cytogenetical analysis showed that the maximum genome size variation recorded for regenerants obtained through the indirect morphogenesis. Variations in the genome size of the regenerants obtained by direct morphogenesis deviates from the control group to 0.30 pg (2C=7.28 pg) and after indirect morphogenesis to 1.04 pg (2C=8.2 pg). Cytogenetical analysis of the regenerated plants showed the presence of different somatic chromosome numbers ranging from 2n = 14 to 2n = 28. The relative DNA content of tetraploid forms was 11.87 pg. In our study was shown, that the most effective method of plant conservation in the *in vitro* culture is a direct morphogenesis. Analysis of the relative nuclear DNA content and chromosome counts of regenerants obtained by indirect morphogenesis from the callus cultures showed significant variations in the DNA content, as well as the appearance of polyploid forms. Therefore, long-term cultivation of callus cultures increases the probability of genomic aberrations, which reduces the stability of the plant genome.

Keywords: *R. Acetosa*, callus, flow cytometry, genome size, polyploidy, somadonal variation

Citation:

Skaptsov, M.V., Krasnoborodkina, M.A., Kutsev, M.G., Smirnov, S.V., Shmakov, A.I., Matsyura, A.V. (2016). Ploidy level and relative nuclear DNA content in the plant cell and tissue culture *in vitro*. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelniitskiy Melitopol State Pedagogical University*, 6 (3), 33–38.

Поступило в редакцию / Submitted: 19.09.2016

Принято к публикации / Accepted: 15.10.2016

crossref <http://dx.doi.org/10.15421/201667>

© Skaptsov, Krasnoborodkina, Kutsev, Smirnov, Shmakov, Matsyura, 2016

Users are permitted to copy, use, distribute, transmit, and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0. License

ВВЕДЕНИЕ

Культура клеток и тканей растений *in vitro* используется для микроразмножения, сохранения биоразнообразия, исследования поведения генома изолированных клеток, исследования экспрессии транскриптов уже многие десятилетия. Явление тотипотентности клеток растений позволяет вызвать дедифференцировку клеток и под воздействием регуляторов роста стимулировать регенерацию. Данное явление открывает широкие возможности практического применения культуры клеток и тканей растений. Значительное распространение данного метода получило в растениеводстве, в качестве основы клонального микроразмножения растений, селекции, генной инженерии, биотехнологии, природоохранной деятельности и многих других смежных областях науки. Одной из основных требований к культурам клеток и тканей является гомогенность полученных регенерантов. Однако, при длительном культивировании в присутствии регуляторов роста растений были обнаружены значительные фенотипические изменения. Данное явление было названо соматоклональной изменчивостью (Larkin & Scowcroft, 1981). Соматоклональная изменчивость характеризуется фенотипическими, молекулярно-генетическими, цитогенетическими или эпигенетическими изменениями.

Изменения фенотипа характеризуются мутациями в общей форме габитуса, листовых пластинок и их размерах. В работе Li et al., 2010, соматоклональные варианты *Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze отличались уменьшенным вдвое габитусом и укороченными побегами. Однако, чаще всего фенотипические изменения наблюдаются в органах, выполняющих генеративные функции. Так для *Torenia fournieri* Lind. выявлены морфологические изменения в структуре пыльцы, что повлияло на ее жизнеспособность. В зависимости от длительности культивирования *in vitro* на питательных средах в присутствии регуляторов роста наблюдалось снижение жизнеспособности пыльцевых зерен (Sun et al., 2013). Клонально размноженные представители рода *Chrysanthemum* отличаются вариациями в цвете и пигментации соцветий (Miler & Zalewska, 2014). Изменчивость в форме соцветий, симметрии и пигментации, также характерны для регенерантов рода *Coreopsis* (Trader et al., 2006).

Среди молекулярно-генетических и эпигенетических изменений в основном выделяют точечные мутации, делеции и утраты, активацию мобильных генетических элементов, изменение динамики метилирования генов и активности промоторов, модификации гетерохроматина (Kaerpler et al., 2000). Крупные цитогенетические перестройки часто происходят на длительных сроках культивирования. К таким изменениям можно отнести утраты частей или целых хромосом, полиплоидия и эндополиплоидия. Зачастую подобные вариации выявляются исследованием состава и картирования хромосом, а также методами проточной цитометрии. На примере *Trifolium alexandrinum* L. было показано формирование полиплоидных регенерантов с плоидностью 2n, 4n и 6n в результате частичного или полного эндомитоза в каллусной культуре (Masoud, Namta, 2008). Кроме кратного увеличения хромосомного состава, особенно при длительном культивировании, наблюдаются утраты нескольких хромосом. Например, соматоклональные варианты *Gossypium hirsutum* L. отличались хромосомными утратами 4-5 хромосом (Jin et al., 2008). Тем самым применение методов хромосомного анализа и цитометрии позволяет на ранних стадиях развития регенерантов выявлять соматоклональные варианты. Данные методы позволяют оптимизировать подходы к культивированию растений *in vitro*, особенно если необходима высокая гомогенность популяций регенерантов.

Целью данного исследования является анализ полиморфизма относительного содержания ДНК в культуре клеток и тканей растений *R. acetosa* L.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали ювенильные растения *Rumex acetosa* L. Поверхностную стерилизацию семян проводили в 70% этаноле в течение 1 минуты, затем переносили в 10%-ый раствор коммерческого отбеливателя «Domestos» на 15 минут и трижды в течение 2 минут промывали стерильной дистиллированной водой. Стерильные семена переносили на поверхность питательной среды по прописи Murashige-Skoog (MS) содержащую 0,3% фитагеля, 100 мг/л цефотаксима и культивировали в климатической камере с флуоресцентными лампами холодного белого света при 25 °C с 16-ти часовым фотопериодом до прорастания и формирования листовых пластинок. Для введения в культуру *in vitro* листовые пластинки разрезали скальпелем в стерильных условиях на участки размером 0,5×0,5 мм (Butenko, 1999; Murashige & Skoog, 1962).

Мезофильные экспланты культивировали на питательной среде MS, дополнительно содержащей 3% сахарозы, 0,3% фитагеля, нафтилуксусной кислоты (НУК) (2 мг/л) и бензиладенина (БА) (1 мг/л), до формирования каллуса. Культивирование проводили при 25 °C с 16-ти часовым фотопериодом используя флуоресцентные лампы с холодным белым светом. Каллусы культивировали в течение 1 месяца и переносили на среду для регенерации (MS с 0,5 мг/л БА и 0,2 мг/л гибберелловой кислоты). Побеги (3-4 см) срезали и переносили на среду 1/2 MS с 0,2 мг/л НУК и 0,005 мг/л 24-эпибрассинолида (Skartsov & Kutsev, 2013). Прямую регенерацию стимулировали из апикальных меристем проростков на питательных

средах MS дополнительно содержащих 1 мг/л БА и 0,25 мг/л НУК. В течении 1 месяца наблюдали побегообразование. Побеги культивировали до образования корней и акклиматизации. Листовые экспланты и регенеранты (полученные из каллусов, а также после прямой регенерации) были использованы для дальнейших исследований.

Меристематические клетки для исследования хромосомного состава были получены из кончиков корней регенерантов. 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 смеси этанола и ледяной уксусной кислоты (3:1). Мацерацию проводили путем нагревания в 2% ацетоорсеине и окрашивали в течение 30 минут при комнатной температуре. Препараты готовили методом раздавливания под покровным стеклом (Tanaka, 1959). Митотические клетки исследовали с использованием световой микроскопии.

Относительное содержание ДНК определяли при помощи техник проточной цитометрии с использованием иодида пропидия (PI). Молодые листья регенерантов измельчали при помощи лезвия в 500 мкл охлажденного буфера Otto I с модификациями (0,1 М лимонной кислоты, 0,5 % Triton X-100) 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 (0,2 М Tris-HCl, 4 mM MgCl₂·6H₂O) с PI (50 мкг/мл), РНазы (50 мкг/мл) и β-меркаптоэтанола (1 мкл/мл) (Doležel et al., 1998; Pfoesser et al., 1995; Skaptsov et al., 2014).

В качестве внутреннего стандарта для определения относительного содержания ДНК использовали *Vicia faba* cv "Inovec" (2C=26,90 пг) (Doležel et al., 1992). Данные флюоресценции изолированных ядер детектировали при помощи проточного цитометра Partec CyFlow PA (Partec, GmbH) с лазерным источником излучения с длиной волны 532 нм и УФ-лампой. Обработку данных цитометрии осуществляли с использованием ПО Flowing software 2.5.1. Статистические данные обрабатывали методом дисперсионного анализа ANOVA с использованием ПО GeneALEx (v. 6.5).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Растения, полученные после прямого морфогенеза, отличались увеличенным содержанием ДНК без изменения уровня ploидности. Средний уровень относительного содержания ДНК составлял 7,28 пг. Регенеранты полученные после 2 месяцев культивирования каллуса формировали популяции с двумя уровнями ploидности (рис. 1).

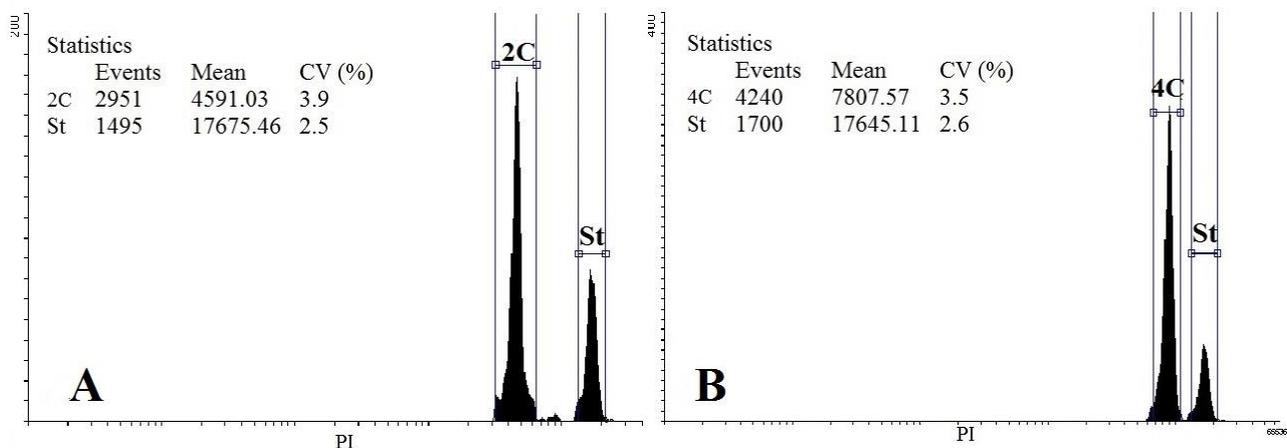


Рис. 1. Типичные гистограммы характерные для диплоидных (А) и тетраплоидных (В) форм регенерантов *R. acetosa in vitro*.

Диплоидные особи с содержанием ДНК равным 8,02 пг и тетраплоидные с содержанием ДНК равным 11,87 пг (табл. 1). ANOVA-анализ данных цитометрии для регенерантов и растений доноров показал, что 96 % вариаций были внутри популяций, тогда как всего 4 % были связаны с вариациями между популяциями ($P < 0,001$). Максимальное среднее попарное значение PhiPT составило 0,043, что означает относительно не высокий уровень дифференциации. Максимальное значение PhiPT наблюдалось между регенерантами полученными посредством прямого морфогенеза и непрямого морфогенеза (0,089), минимальное – между растением-донором и регенерантами после прямого морфогенеза (0,018).

Полученные данные свидетельствуют о более высоком уровне соматональной изменчивости регенерантов полученных путем непрямого морфогенеза, через каллусные культуры. Несмотря на тот факт, что полученные регенеранты не отличались фенотипически, изменчивость размера генома и уровня ploидности находилась на высоком уровне. Возможные фенотипические мутации могут возникать в генеративных органах. Так для двулетних, многолетних и особенно древесных растений должно пройти

продолжительное время, чтобы выявить мутации, связанные с генеративными функциями. Например, для *Elaeis guineensis* Jacq. характерно появление до 5% мутантных форм, тогда как выявить подобные мутации возможно только через 5-6 лет. В связи с этим использование молекулярно-генетических и цитогенетических методов исследования имеет все большее значение в биотехнологии растений (Giorgetta, Castiglione, 2016).

Таблица 1. Анализ данных плоидности, количества хромосом и относительного содержания ДНК на различных стадиях культивирования *R. acetosa in vitro*

Стадия культивирования	x	2n	2C, пг	1C, Мбп ¹
Эксплант	2	14	6,98±0,18	3413,21±88
Прямой морфогенез	2	14	7,28±0,04	3559,92±19
Непрямой морфогенез	2	14	8,02±0,26	3921,78±156
	4	28	11,87±0,29	5804,43±142

Примечание: 1 – 1 пг ДНК = 978 Мбп (Doležel et al., 2003)

В культурах клеток *Citrus limon* (L.) Burm., методами проточной цитометрии были выявлены цитохимерные линии, содержащие диплоидные и тетраплоидные клетки (Orbović et al., 2008). Явление эндополиплоидии было выявлено в культурах клеток *Mammillaria san-angelensis* Sanchez-Mejorada, где уровень плоидности клеток доходил до восьми (Palomino et al., 1999). Системная эндополиплоидия с полиплоидным рядом 2C, 4C и 8C была обнаружена в культуре *in vitro* *Spathoglottis plicata* Blume (Yang & Loh, 2004). Удвоение генома было выявлено в регенерантах *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana* полученных после индукции развития протокорм и боковых почек *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen на средах с преобладанием цитокининов (Chen et al., 2009; Gomes et al., 2014). Одним из наиболее эффективных методов размножения растений в культуре *in vitro*, является прямой соматический эмбриогенез. На примере *Smilax sonchifolius* (Poepp. and Endl.) H. Robinson было показано, что анализ относительного содержания ДНК не выявил значительных отклонений в размере генома регенерантов (Viehmannova et al., 2014). Регенеранты *Coriandrum sativum* L. полученные в результате соматического эмбриогенеза, также отличались размером генома схожим с образцами растений доноров (Ali et al., 2016). Несмотря на присутствие в составе питательных сред ауксинов, для *Lepidosperma concavum* R.Br. и *L. laterale* R.Br. было выявлено только 0,2% регенерантов с миксоплоидией, а вариации относительного содержания ДНК находились в пределах природных популяций (Kodum et al., 2012). Полученные данные, а также данные литературных источников позволяют утверждать, что значительное влияние на полиморфизм генома культур тканей *in vitro*, оказывает длительность стадии активной пролиферации каллусных культур. Тогда как стимуляция прямого морфогенеза или эмбриогенеза позволяет снизить активность геномных перестроек, часто связанных с длительным культивированием тканей в присутствии регуляторов роста растений.

ВЫВОДЫ

Культура клеток и тканей растений *in vitro* является перспективным способом сохранения биоразнообразия видов и сортов растений. Как показано в нашем исследовании наиболее эффективным методом консервации является прямой морфогенез. Анализ относительного содержания ДНК и хромосомного состава регенерантов полученных путем непрямого морфогенеза из каллусных культур показал значительные вариации в относительном содержании ДНК, а также появление полиплоидных форм. Тем самым, длительное культивирование каллусных культур увеличивает вероятность геномных перестроек, что снижает стабильность генома растений.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 16-34-00313.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе: учеб. пособие. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
- 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.
- Скапцов М.В. Куцев М.Г. Влияние 24-эпибрассинолида на продолжительность культивирования щавеля (*Rumex acetosa* L.) *in vitro* // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2013. – Т. 22(2). – С. 52–56.
- Ali M., Mujib A., Tonk D., Zafar N. Plant regeneration through somatic embryogenesis and genome size analysis of *Coriandrum sativum* L. // *Protoplasma*. – 2016. (In press).

- Chen W.H., Tang, C.Y., Kao Y.L. Ploidy doubling by *in vitro* culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2009. – V. 98(2). – P. 229–238.
- Doležel J., Bartoš J., Voglmayr H., Greilhuber J. Nuclear dna content and genome size of trout and human // *Cytometry*. – 2003. – V. 51. – P. 127–128.
- 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 // *Annals of Botany*. – 1998. – V. 82. – P. 17–26.
- Doležel J., Sgorbati S., Lucretti S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants // *Physiologia Plantarum*. – 1992. – V. 85. – P. 625–631.
- Giorgetta L., Castiglione M. R. Oil palm *in vitro* regeneration: microdensitometric analysis during reproduction and development // *Caryologia*. – 2016. – V. 69(1). – P. 5–11.
- Gomes S.S.L., Saldanha C.W., Neves C.S., Trevizani M., Raposo N.R.B., Notini M.M., Viccini L.F. Karyotype, genome size, and *in vitro* chromosome doubling of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2014. – V. 118(1). – P. 45–56.
- Jin S., Mushke R., Zhu H., Tu L., Lin Z., Zhang Y., Zhang X. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers // *Plant Cell Reports*. – 2008. – V. 27(8). – P. 1303–1316.
- Kaeppeler S.M., Kaeppeler H.F., Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants // *Plant Molecular Biology*. – 2000. – V. 43. – P. 179–188.
- Kodym A., Tensch E.M., Bunn E., Delprat J. Ploidy stability of somatic embryo-derived plants in two ecological keystone sedge species (*Lepidosperma laterale* and *L. concavum*, *Cyperaceae*) // *Australian Journal of Botany*. – 2012. – V. 60(5). – P. 396–404.
- Larkin P.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1981. – V. 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. – V. 129. – P. 96–99.
- Masoud S., Hamta A. Cytogenetic analysis of somaclonal variation in regenerated plants of Berseem clover (*Trifolium alexandrinum* L.) // *Caryologia*. – 2008. – V. 61(4). – P. 392–396.
- Miler N., Zalewska M. Somaclonal variation of *Chrysanthemum* propagated in vitro from different explants types // *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*. – 2014. – V. 13(2). – P. 69–82.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Plant Physiology*. – 1962. – V. 15(13). – P. 473–497.
- Orbović V., Čalović M., Vilorija Z., Nielsen B., Gmitter F.G., Castle W.S., Grosser J.W. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry // *Euphytica*. – 2008. – V. 161(3). – P. 329–335.
- Otto F. Preparation and staining of cells for high-resolution DNA analysis. (In A. Radbruch (Eds.), *Flow cytometry and cell sorting*). – Berlin: Springer Verlag. – 1992. – P. 101–104.
- Palomino G., Doležel J., Cid R., Brunner I., Mendez I., Rubl A. Nuclear genome stability of *Mammillaria san-angelensis* (*Cactaceae*) regenerants induced by auxins in long-term *in vitro* culture // *Plant Science*. – 1999. – V. 141. – P. 191–200.
- Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update // *Bioinformatics*. – 2012. – V. 28. – P. 2537–2539.
- Pfosse 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*. – 1999. – V. 21(4). – P. 387–393.
- Sun S., Zhong J., Li S., Wang X. Tissue culture-induced somaclonal variation of decreased pollen viability in torenia (*Torenia fournieri* Lind.) // *Botanical Studies*. – 2013. – V. 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. – V. 9. – P. 1–16.
- Trader B.W., Gruszecki H.H., Scoggins H.L., Veilleux R.E. Somaclonal variation of *Coreopsis* regenerated from leaf explants // *Horticultural Science*. – 2006. – V. 41(3). – P. 749–752.
- Viehmanna I., Bortlova Z., Vitamvas B., Cepkova P.H., Eliasova K., Svobodova E., Travnickova M. Assessment of somaclonal variation in somatic embryo-derived plants of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. and Endl.) H. Robinson] using inter simple sequence repeat analysis and flow cytometry // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2014. – V. 17(2). – P. 102–106.
- Yang M., Loh C.S. Systemic endopolyploidy in *Spathoglottis plicata* (*Orchidaceae*) development // *BMC Cell Biology*. – 2004. – V. 5(33).

REFERENCES

- Ali, M., Mujib, A., Tonk, D., & Zafar, N. (2016). Plant regeneration through somatic embryogenesis and genome size analysis of *Coriandrum sativum* L. *Protoplasma*, (In press).
- Butenko, R.G. (1999). *Higher plant cell biology in vitro and biotechnology based on them: a tutorial*. Moscow: FBKPress. (In Russian).

- Chen, W.H., Tang, C.Y., & Kao, Y.L. (2009). Ploidy doubling by *in vitro* culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species. *Plant Cell Tiss Org*, 98(2), 229–238.
- Doležel, J., Bartoš, J., Voglmayr, H., & Greilhuber, J. (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry*, 51, 127–128.
- Doležel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysak, M.A., Nardi L., & Obermayer, R. (1998). Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Ann Bot-London*, 82, 17–26.
- Doležel, J., Sgorbati, S., & Lucretti, S. (1992). Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiol Plantarum*, 85, 625–631.
- Giorgetta, L., & Castiglione, M.R. (2016). Oil palm *in vitro* regeneration: microdensitometric analysis during reproduction and development. *Caryologia*, 69(1), 5–11.
- Gomes, S.S.L., Saldanha, C.W., Neves, C.S., Trevizani, M., Raposo, N.R.B., Notini, M.M.,...Viccini, L.F. (2014). Karyotype, genome size, and *in vitro* chromosome doubling of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. *Plant Cell Tiss Org*, 118(1), 45–56.
- Jin, S., Mushke, R., Zhu, H., Tu, L., Lin, Z., Zhang, Y., & Zhang, X. (2008). Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell Rep*, 27(8), 1303–1316.
- Kaepler, S.M., Kaepler, H.F., & Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol Biol*, 43, 179–188.
- Kodym, A., Temsch, E.M., Bunn, E., & Delprat, J. (2012). Ploidy stability of somatic embryo-derived plants in two ecological keystone sedge species (*Lepidosperma laterale* and *L. concavum*, *Cyperaceae*). *Australian Journal of Botany*, 60(5) 396–404.
- Larkin, P.J., & Scowcroft, W.R. (1981). Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet*, 60, 197–214.
- Li, R., Bruneau, A.H., & Qu, R. (2010). Tissue culture-induced morphological somaclonal variation in St. Augustinegrass [*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze]. *Plant Breeding*, 129, 96–99.
- Masoud, S., & Hamta, A. (2008). Cytogenetic analysis of somaclonal variation in regenerated plants of Berseem clover (*Trifolium alexandrinum* L.). *Caryologia*, 61(4), 392–396.
- Miler, N., & Zalewska, M. (2014). Somaclonal variation of Chrysanthemum propagated *in vitro* from different explants types. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 13(2), 69–82.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol*, 15(13), 473–497.
- Orbović, V., Čalović, M., Vilorija, Z., Nielsen, B., Gmitter, F.G., Castle, W.S., & Grosser, J.W. (2008). Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. *Euphytica*, 161(3), 329–335.
- Otto, F. (1992). Preparation and staining of cells for high-resolution DNA analysis. In A. Radbruch (Eds.). *Flow cytometry and cell sorting* (pp. 101–104). Berlin: Springer Verlag.
- Palomino, G., Doležel, J., Cid, R., Brunner, I., Mendez, I., & Rubluo, A. (1999). Nuclear genome stability of *Mammillaria san-angelensis* (Cactaceae) regenerants induced by auxins in long-term *in vitro* culture. *Plant Science*, 141, 191–200.
- Peakall, R., & Smouse, P.E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update. *Bioinformatics*, 28, 2537–2539.
- Pfossner, M., Amon, A., Lelley, T., & Heberle-Bors, E. (1995). Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry*, 21(4), 387–393.
- Skaptsov, M.V., & Kutsev, M.G. (2013). Effect of 24-epibrassinolide on duration of sorrel (*Rumex acetosa* L.) cultivation *in vitro*. *Tomsk State University Journal of Biology*, (22)2, 52–56. (In Russian).
- Skaptsov, M.V., Smirnov, S.V., & Kutsev, M.G. (2014). Nuclear DNA content in some plant kinds used as an external standard in flow cytometry. *Turczaninovia*, 17(3), 72–78 (In Russian).
- Sun, S., Zhong, J., Li S., & Wang, X. (2013). Tissue culture-induced somaclonal variation of decreased pollen viability in *Torenia* (*Torenia fournieri* Lind.). *Botanical Studies*, 54 (36).
- Tanaka, R. (1959). 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*, 9, 1–16.
- Trader, B.W., Gruszewski, H.H., Scoggins, H.L., & Veilleux, R.E. (2006). Somaclonal variation of *Coreopsis* regenerated from leaf explants. *Horticultural Science*, 41(3), 749–752.
- Viehmanna, I., Bortlova, Z., Vitamvas, B., Cepkova, P.H., Eliasova, K., Svobodova, E. & Travnickova, M. (2014). Assessment of somaclonal variation in somatic embryo-derived plants of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. and Endl.) H. Robinson] using inter simple sequence repeat analysis and flow cytometry. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(2), 102–106.
- Yang, M., & Loh, C. S. (2004). Systemic endopolyploidy in *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) development. *BMC Cell Biology*, 5(33).