



HORTUS BOTANICUS

Журнал Совета ботанических садов СНГ при МААН

12 / 2017

HORTUS BOTANICUS

Журнал Совета ботанических садов СНГ при МААН

12 / 2017

ISSN 1994-3849

Эл № ФС 77-33059 от 11.09.2008

Главный редактор

А. А. Прохоров

Редакционный совет

П. Вайс Джексон
А. С. Демидов
Т. С. Маммадов
В. Н. Решетников
Т. М. Черевченко

Редакционная коллегия

Г. С. Антипина
Е. М. Арнаутова
А. В. Бобров
Ю. К. Виноградова
Е. В. Голосова
Ю. Н. Карпун
В. Я. Кузеванов
Е. Ф. Марковская
Ю. В. Наумцев
Е. В. Спиридович
К. Г. Ткаченко
А. И. Шмаков

Редакция

А. В. Еглачева
С. М. Кузьменкова
К. О. Романова
А. Г. Марахтанов

Адрес редакции

185910, Республика Карелия, г. Петрозаводск, ул. Анохина, 20, каб. 408.

E-mail: hortbot@gmail.com

<http://hb.karelia.ru>

© 2001 - 2017 А. А. Прохоров

На обложке:

Оранжереи Главного ботанического сада им. Н. В. Цицина Российской Академии Наук

Разработка и техническая поддержка

Отдел объединенной редакции научных журналов ПетрГУ, РЦ НИТ ПетрГУ,
Ботанический сад ПетрГУ

Петрозаводск
2017

Адаптация молекулярных методов для идентификации сортов *Syringa vulgaris* L.

ЛЯХ
Елена Михайловна

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,
ул. Золотолинская, 101, Новосибирск, 630090, Россия
llyakh@rambler.ru

Ключевые слова:

садоводство,
идентификация, гербарий,
анализ ДНК, ISSR-праймер,
сирень обыкновенная,
Syringa vulgaris, *Oleaceae*,
сорт

Аннотация: Правильное определение видовой и сортовой принадлежности растений является одной из важных проблем как в науке, так и в садоводстве. Часто в коллекциях ботанических садов, университетов, а особенно в исторических садах и парках существуют трудности с идентификацией сортов сирени. Определен способ идентификации сортов *Syringa vulgaris* на основе анализа электрофоретических спектров ДНК-маркеров. Объектами исследования были 9 сортов сирени обыкновенной из коллекции ЦСБС СО РАН (Новосибирск). Адаптирована методика выделения чистой геномной ДНК из сухих листьев сортов *S. vulgaris*. Проведены амплификации ДНК 9-ти сортов с пятнадцатью ISSR-праймерами. В результате ПЦР анализа, определены 5 наиболее информативных ISSR-праймеров для идентификации сортов сирени обыкновенной.

Получена: 03 декабря 2017 года

Подписана к печати: 21 декабря 2017 года

Введение

Syringa vulgaris L. (Сирень обыкновенная) - кустарник, естественно произрастающий в Балканских горах, одно из самых декоративных пейзажных растений прохладных и умеренных областей. Мировая коллекция сирени к настоящему времени насчитывает около 2300 сортов, большинство из которых являются сортами сирени обыкновенной (Vrugtman, 2006). Традиционно сорта сирени представлены в большинстве ботанических садов. Часто в коллекциях ботанических садов, университетов, а особенно в исторических садах и парках существуют трудности с идентификацией сортов (Lyakh, 2014).

Правильное определение видовой и сортовой принадлежности растений является одной из важных проблем. Сирень, прежде всего, характеризуется морфологически. Оценка таких особенностей как оттенок соцветия и аромат, часто субъективны и не сохраняются в гербарии. Такая внешняя оценка недостаточно надежна. Анализ ДНК является важным методом для различения видов растений и идентификации культурных сортов. Для решения проблемы генетической идентификации необходимо использование ДНК маркеров (Матвеева и др., 2011). Одним из самых распространенных и информативных методов является анализ электрофоретических спектров межмикросателлитных последовательностей ДНК (ISSR). Цель работы – определение наиболее информативных ISSR-праймеров для идентификации сортов сирени обыкновенной.

Объекты и методы исследований

Работа проводилась с 2014 по 2016 годы. Объектами исследования были 9 сортов сирени обыкновенной (рис. 1, 2) из коллекции Центрального сибирского ботанического сада Сибирского отделения Российской Академии наук (ЦСБС СО РАН) в Новосибирске:

1. 'Память о С. М. Кирове' ('Pamyat o S. M. Kirove')
2. 'Огни Донбасса' ('Ogni Donbassa')
3. 'Индия' ('India')
4. 'Кружевница' ('Kruzevniza')
5. 'Надежда' ('Nadezdha')
6. 'Алтайская розовая' ('Altaiyskaya rozovaja')
7. 'Дафна' ('Dafna')
8. 'Олимпиада Колесникова' ('Olimpiada Kolesnikova')

9. 'Красавица Москвы' ('Krasavitsa Moskvu')

В настоящее время коллекция насчитывает 26 сортов, отобранных из 116 сортов зарубежной и отечественной селекции как наиболее устойчивые к условиям Западной Сибири.

Для генетической идентификации сортов сирени обыкновенной использовался метод ISSR-маркирования (Gupta et al., 1994). ДНК выделяли из 10-12 мг растительной ткани высушенных листьев различных годов сбора с помощью СТАВ-метода (Doyle, Doyle, 1990) с некоторыми модификациями. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе C1000 Thermal Cycler (BioRad Laboratories, USA). Для амплификации использовали 15 ISSR-праймеров. Продукты амплификации разделяли при помощи электрофореза в 1 % агарозном геле в 1×TBE буфере, с красителем SYBR-Green. Гели фотографировали в УФ-излучении (Bio-Rad GelDoc XR+).



Рис. 1 Сорт 'Память о С. М. Кирове' в коллекции ЦСБС.

Fig. 1 Cultivar 'Pamyat o S. M. Kirove' from the Central Siberian Botanical Garden collection.



Рис. 2. Сорт 'Надежда'.

Fig. 2. Cultivar 'Nadezdha'.

Результаты и обсуждение

При экстракции ДНК из растительных объектов часто необходимо удалить вторичные метаболиты, которые мешают изолированию ДНК, а также отрицательно влияют на полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Для экстракции высококачественной ДНК *S. vulgaris* был модифицирован СТАВ-метод (Doyle, Doyle, 1990) для 9-ти сортов из коллекции ЦСБС.

Адаптированная нами методика позволяет получать высокую концентрацию ДНК из свежих образцов (52-410 мкг/мл). Однако концентрация ДНК, выделенной этим методом из старого гербарного материала, была не достаточна для дальнейшего анализа. Для получения нужной концентрации путем серии экспериментов была усовершенствована техника выделения геномной ДНК из образцов листьев длительного (от 4 до 10 лет) хранения. Протокол был изменен следующим образом: увеличена концентрация 2-меркаптоэтанола в лизирующем СТАВ буфере до 2 %; осаждение ДНК изопропанолом при -20° С в течение 2 часов; центрифугирование осадка ДНК после добавления изопропанола на скорости 12 г при температуре +4° С 30 минут; очистка осадка в 0,5 мл 70 % этанола (Лях, 2015).

Амплификации ДНК всех 9 сортов проводились с каждым из пятнадцати ISSR-праймеров в двукратной повторности. Были получены и проанализированы 60 электрофореграмм продуктов амплификации ДНК, всего в процессе исследований было проанализировано 540 данных ПЦР.

Несмотря на большой подбор основных параметров ПЦР, таких как концентрация $MgCl_2$; температура отжига и др., при ПЦР с 4-мя праймерами мы не обнаружили продуктов амплификации ДНК на электрофореграммах. Следующие 6 праймеров имели высокий уровень консервативности и не выявили различий между сортами. И только 5 праймеров показали четкие отличия сортов (рис. 3).

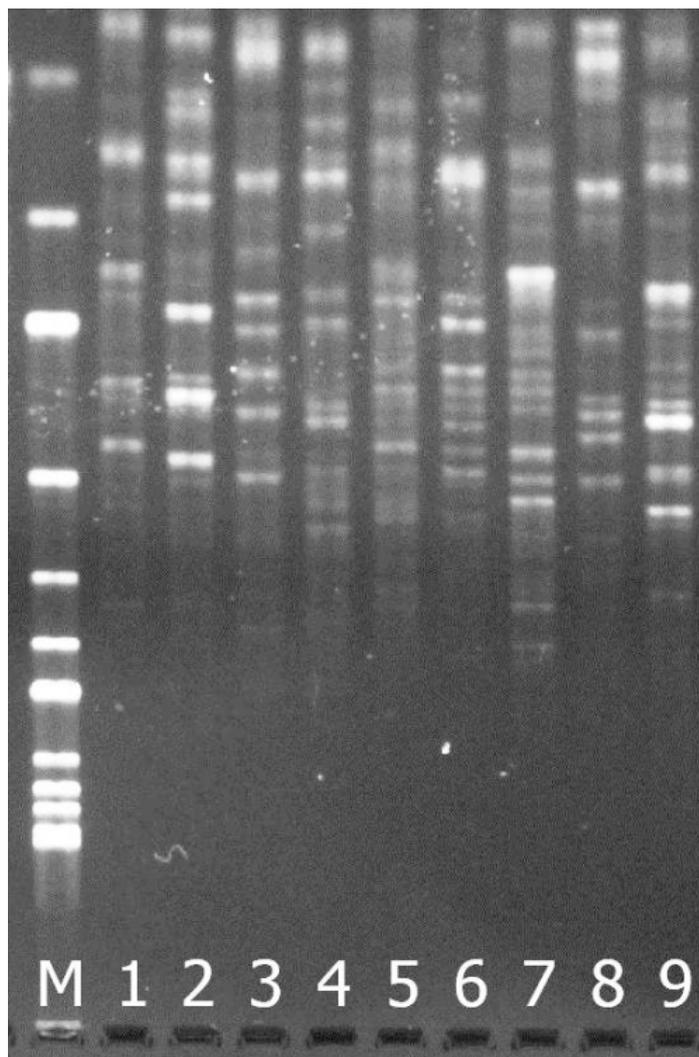


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК (метод ISSR-PCR) 9 сортов *Syringa vulgaris*.

Примечание – (праймер $(AC)_4CG$): М–маркер молекулярных масс, с 1 по 9 – номера сортов.

Fig. 3. Electrophoregram of DNA amplification products (ISSR-PCR method) of 9 *Syringa vulgaris* cultivars.

Note – (primer $(AC)_4CG$): M-marker of molecular masses, from 1 to 9 – number of cultivars.

Выводы и заключение

По данным ПЦР анализа определены 5 наиболее информативных ISSR-праймеров: $[(CA)_6AC$, $(CA)_6RG$, $(CA)_6AG$, $(AC)_4CG$, $(CTC)_3GC]$ для дальнейшей успешной идентификации сортов сирени обыкновенной. Адаптированные нами методы выделения ДНК, постановки ПЦР и отобранные информативные ISSR-маркеры позволяют проводить идентификацию таксонов *S. vulgaris*.

В статье использовались материалы “Биоресурсной коллекции ЦСБС СО РАН”, [УНУ “Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте”, USU 440534](#).

Литература

Лях Е. М. Изменение методики экстракции геномной ДНК для сортов *Syringa vulgaris* L. // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: сб. научн. стат. по матер. XIV междунар. науч.-практ. конф. (25–29 мая 2015 г., Барнаул). Барнаул: Изд-во Алт. ГУ, 2015. С. 351–352.

Матвеева Т. В., Павлова О. А., Богомаз Д. И., Демкович А. Е., Лутова Л. А. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений // Генетика популяций. 2011. Т. IX. № 1. С. 32–43.

Doyle J. J., Doyle J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus*. 1990. № 12. P. 13—15.

Gupta M., Chyi Y.S., Romero-Severson J., Owen J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats // *Theoret. Appl. Genet.* 1994. Vol. 89. P. 998—1006.

Lyakh Elena M. DNA Fingerprinting: Common Lilac cultivars from Historical Park and Botanical Garden Collections // *Public Garden*. 2014. Vol. 28. № 4. P. 24—26.

Vrugtman Freek. International register and checklist of cultivar names in the genus *Syringa* L. (Oleaceae) – Hamilton, Ontario, Canada, Royal Botanical Gardens, 2006. 280 p.

Adaptation of molecular methods for *Syringa vulgaris* L. cultivars identification

LYAKH
Elena Mikhailovna

Central Siberian Botanical Garden of SB RAS,
Zolotodolinskaja, st. 101, Novosibirsk, 630090, Russia
llyakh@rambler.ru

Key words:

horticulture, identification,
herbarium, analysis of DNA, ISSR
primer, common lilac, *Syringa*
vulgaris, *Oleaceae*, cultivar

Summary:

Correct definition of a cultivar and species is a major issue both in science and gardening. Collections of botanical gardens, universities and especially historical gardens and parks often have troubles with identifying lilac cultivars. Analyzing electrophoretic patterns of DNA markers is required to identify *Syringa vulgaris* cultivars. Nine common lilac cultivars from the Central Siberian Botanical Garden's collection in Novosibirsk were studied. A method of pure genomic DNA extraction from dry leaves of *S. vulgaris* has been adapted. DNA amplifications for each of the 9 cultivars using fifteen ISSR-primers were carried out. As a result of PCR analysis, we have defined five best primers for genotyping common lilac cultivars.

Is received: 03 december 2017 year

Is passed for the press: 21 december 2017 year

References

- Lyakh E. M. Izmenenie metodiki ekstraktsii genomnoj DNK dlya sortov *Syringa vulgaris* L. // Problemy botaniki Yuzhnoj Sibiri i Mongolii: sb. nauchn. stat. po mater. XIV mezhdunar. nauch.-prakt. konf. (25–29 maya 2015 g., Barnaul). Barnaul: Izd-vo Alt. GU, 2015. S. 351—352.
- Matveeva T. V., Pavlova O. A., Bogomaz D. I., Demkovitch A. E., Lutova L. A. Molekulyarnye markery dlya vididentifikatsii i filogenetiki rastenij // Genetika populyatsij. 2011. T. IX. № 1. С. 32—43.
- Doyle J. J., Doyle J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. 1990. № 12. P. 13—15.
- Gupta M., Chyi Y.S., Romero-Severson J., Owen J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simplesequence repeats // Theoret. Appl. Genet. 1994. Vol. 89. P. 998—1006.
- Lyakh Elena M. DNA Fingerprinting: Common Lilac cultivars from Historical Park and Botanical Garden Collections // Public Garden. 2014. Vol. 28. № 4. P. 24—26.
- Vrugtman Freek. International register and checklist of cultivar names in the genus *Syringa* L. (*Oleaceae*) – Hamilton, Ontario, Canada, Royal Botanical Gardens, 2006. 280 p.

Цитирование: Лях Е. М. Адаптация молекулярных методов для идентификации сортов *Syringa vulgaris* L. // Hortus bot. 2017. Т. 12, 2017, URL: <http://hb.karelia.ru/journal/article.php?id=4942>.

DOI: [10.15393/j4.art.2017.4942](https://doi.org/10.15393/j4.art.2017.4942)

Cited as: Lyakh E. M. (2017). Adaptation of molecular methods for *Syringa vulgaris* L. cultivars identification // Hortus bot. 12, 363 - 366. URL: <http://hb.karelia.ru/journal/article.php?id=4942>