

УДК 635.9:582.916.16+577.21

Е.М. Лях

E.M. Lyakh

## ИЗМЕНЕНИЕ МЕТОДИКИ ЭКСТРАКЦИИ ГЕНОМНОЙ ДНК ДЛЯ СОРТОВ *SYRINGA VULGARIS* L.

### CHANGES IN METHODS OF EXTRACTING GENOMIC DNA FOR *SYRINGA VULGARIS* L. CULTIVARS

Усовершенствована техника выделения геномной ДНК из образцов листьев длительного хранения с целью ПЦР анализа для идентификации сортов *Syringa vulgaris* (сирени обыкновенной) в результате совместных исследований ЦСБС СО РАН с Университетом Хельсинки (Helsinki University, Finland).

#### Введение

Сирень – одно из самых популярных садовых растений, многие виды и сорта хорошо растут и обильно цветут в умеренной зоне. Сорта *Syringa vulgaris* (сирени обыкновенной) являются наиболее ценными декоративными кустарниками в озеленении городов Сибири.

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН сотрудничает со многими зарубежными ботаническими садами по разным аспектам изучения растений. В 2012 году ЦСБС СО РАН с Факультетом Сельскохозяйственных Наук университета Хельсинки (Department of Agricultural Sciences, University of Helsinki) и Исследовательским Институтом сельскохозяйственной продукции Финляндии (MTT Agrifood Research Finland) начали совместный проект «Генетические ресурсы Сирени обыкновенной» (*'Syringa vulgaris* genetic resources'). Проект был поддержан Академией наук Финляндии, руководителем проекта была доктор Леена Линден (Dr. Leena Linden, Helsinki University). Цель проекта состояла в проведении молекулярно-генетического анализа для идентификации сортов и генотипов *Syringa vulgaris* на базе исторических садов и парков города Хельсинки и в совершенствовании технологии клонального размножения сортов и генотипов сирени обыкновенной для сохранения и дальнейшего культивирования (Lyakh et al., 2013).

Очень важной проблемой является правильное определение сортовой принадлежности растений. Традиционно сорта сирени характеризуются на основе морфологических характеристик. Но часто в коллекциях существует путаница сортов и морфологическая оценка не достаточно надежна, особенно если касаются таких субъективных характеристик как аромат и оттенок цвета кистей. В последние десятилетия развитие молекулярных методов позволило использовать молекулярные маркеры для идентификации растений (Хлесткина, 2011; Матвеева и др., 2011). Определение экспериментальным путем ДНК маркеров с помощью ПЦР-реакции является важным инструментом для проверки идентичности культурных сортов растений и способно эффективно дополнить классические методы идентификации.

#### Материалы и методы

Для генетической идентификации сортов сирени обыкновенной использовался метод ISSR-маркирования (Gupta et al., 1994).

Первым этапом для проведения ПЦР является выделение ДНК из растительного материала. Для выделения ДНК мы использовали молодые листья. Образцы листьев были собраны в июне 2012 года в исторических садах и парках города Хельсинки. Также в своих исследованиях мы использовали образцы сортов сирени, собранные в 2006 и 2009 годах и хранящиеся в Факультете Сельскохозяйственных Наук университета Хельсинки.

Для идентификации сортов мы запросили и получили 13 справочных образцов из международных коллекций Ботанического сада Нанси, Франция (Conservatoire et Jardins Botaniques de Nancy, France). Справочный материал для проверки сортов также включал 3 образца (2009) из Ботанического сада Монреаля, Канада (Jardins Botaniques de Montréal, Canada), 3 образца (2009, 2012) из Арборетума Арнольда Гарвардского университета, США (Arnold Arboretum, Harvard University, USA). Экспериментальный материал состоял из 60 образцов листьев. Мы благодарим наших коллег за присланные материалы.

Сразу после сбора свежие листья 2012 года в полиэтиленовых пакетах хранились при -20 °С до изоляции ДНК. Справочные образцы, присланные из других стран, также были заморожены при -20 °С в день прибытия. Все образцы 2006 и 2009 годов хранились в тех же условиях в Университете Хельсинки. Для извлечения геномной ДНК замороженные листья растирались с жидким азотом и хранились при -80 °С.

ДНК извлекали из ткани листа, используя СТАВ метод Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1990). Концентрация ДНК определялась с помощью программы Nanodrop.

### Обсуждение результатов

Было проведено 32 изоляции ДНК из образцов 2012 года. Концентрация матрицы в экстрактах из свежих образцов была достаточной (52–410 мкг/мл) для дальнейшего ПЦР анализа. Однако концентрация ДНК, выделенной из старых образцов 2006 и 2009 годов, была не достаточна для дальнейшего анализа (12,1–30,9 мкг/мл). Для получения нужной концентрации путем серии экспериментов метод был нами адаптирован. Протокол был изменен следующим образом:

0. Добавить меркаптоэтанол (mercaptoethanol) в СТАВ буфер в концентрации 2 % вместо 0,2 %, то есть увеличить в 10 раз.

4. Хранить осадок (precipitat) после осаждения 2/3 объемом холодного изопропанола (isopropanol) один или два часа при температуре -20° С, а не при комнатной температуре.

5. Центрифугировать осадок после добавления изопропанола на максимальной скорости при температуре +4°С 30 минут вместо 10 мин.

6. Промывать ДНК-осадок (pellet) в 0,5 мл 70 % этанола, а не в 1 мл.

В результате были выделены 60 образцов ДНК для ПЦР анализа. Усовершенствована техника извлечения ДНК из листьев долгого хранения. Работа по идентификации сортов сирени продолжается и в Университете Хельсинки, и в ЦСБС СО РАН. Планируется расширение исследований для других сортов сирени обыкновенной.

### ЛИТЕРАТУРА

*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.

*Хлесткина Е.К.* Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2011. – Т. 15, № 4. – С. 757–767.

*Doyle, J.J. and Doyle, J.L.* Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus, 1990. – Vol. 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 E., Nukari A., Linden L., Laamanen J., Uosukainen M.* «*Syringa vulgaris* Genetic Resources Pilot Project in Finland», Lilacs, Quarterly Journal of the International Lilac Society, Winter 2013. – Vol. 42, No. 1. – P. 21–23.

*Lyakh E.M.* DNA Fingerprinting: Common Lilac cultivars from Historic Park and Botanical Garden Collections. Public Garden., 2014. – Vol. 28, No. 4. – P. 24–26.

### SUMMARY

Technology of extraction of DNA from long storage leaves for PCR analysis for identification of *Syringa vulgaris* (common lilac) cultivars was improved as a result of collaboration researches in Central siberian botanical Garden SB RAS with Helsinki University (Helsinki University, Finland).