

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ

ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД



**СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ  
ДЕЯТЕЛЬНОСТИ БОТАНИЧЕСКИХ  
САДОВ И ДЕРЖАТЕЛЕЙ  
БОТАНИЧЕСКИХ КОЛЛЕКЦИЙ ПО  
СОХРАНЕНИЮ БИОРАЗНООБРАЗИЯ  
РАСТИТЕЛЬНОГО МИРА**

*Материалы Международной научной конференции,  
посвященной 100-летию со дня рождения  
академика Н.В. Смольского*

*Минск, 27-29 сентября 2005 года*

Минск  
ООО «Эдит ВВ»  
2005

УДК 58.006(476)(043.2)

ББК 42.37^6

С 56

Редакционная коллегия:

**В.Н. Решетников**, д-р биол. наук, акад. НАН Беларуси, проф. (гл. ред.);  
**Е.А. Сидорович**, д-р биол. наук, чл.-кор. НАН Беларуси, проф. (зам. гл. ред.);  
**И.К. Володько**, канд. биол. наук; **С.И. Титанкова** (отв. секретарь);  
**А.П. Яковлев**, канд. биол. наук

Рецензенты:

**Б.И. Якушев**, д-р биол. наук, чл.-кор. НАН Беларуси, проф.;  
**З.Я. Серва**, д-р биол. наук, проф.

*Материалы конференции изданы при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований.*

**Современные направления деятельности ботанических садов и держателей ботанических коллекций по сохранению биологического разнообразия растительного мира: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения акад. Н.В. Смольского, Минск, 27-29 сент. 2005 г.** — Мн.: Эдит ВВ, 2005. — 306 с.

ISBN 985-90030-9-2.

В сборник включены материалы, отражающие научную, научно-организационную и общественную деятельность академика Н.В. Смольского. Показана его роль в развитии исследований по интродукции и акклиматизации растений, экологии и охраны окружающей среды, сохранению ботанических коллекций. Приведены результаты работы ученых и специалистов из ботанических садов ближнего и дальнего зарубежья по развитию традиционных и формированию новых направлений биологической науки.

УДК 58.006(476)(043.2)

ББК 42.37^6

ISBN 985-90030-9-2

© Центральный ботанический сад  
НАН Беларуси, 2005  
© Оформление. ООО «Эдит ВВ», 2005

## ОБОГАЩЕНИЕ, СОХРАНЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОФОНДА СИРЕНИ В ЦБС НАН БЕЛАРУСИ

*В.Н. Решетников, Е.В. Спиридович, О.В. Чижик, Т.В. Антипова, А.В. Зубарев  
И.М. Гаранович, Н.В. Македонская*

*Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, ул. Сурганова, 2в*

В создании национального генофонда декоративных растений, в т.ч. коллекции сирени, вложен труд нескольких поколений ботаников-интродукторов: Н.В. Смольского, В.Ф. Бибиковой, Э.А. Бурой, Г.И. Матусевича, Н.В. Македонской.

Первый сирингарий на территории ЦБС был заложен в 1932-1933 гг. на площади 0,4 га из 80 сортов, завезенных с Украины. С 1956 г. под руководством академика Н.В. Смольского заметно активизировалась работа по интродукции сирени и уже тесно увязывалась с задачами максимального внедрения научных достижений в зеленое строительство республики.

Академик Н.В. Смольский стремился к широкому использованию в работе ученых-селекционеров разнообразных селекционно-генетических методов, таких как отбор сеянцев, полученных при свободном опылении, гибридизация. Для получения гибридных сеянцев сирени скрещивали как сорта, так и разные виды, с целью усиления хозяйственных и декоративных признаков интродуцированных растений. Например, В.Ф. Бибикова в 1964 г. получила сорта сирени с простыми крупными и махровыми цветками чистых колеров, обильно и продолжительно цветущие. В настоящее время методом межсортной гибридизации и отбора выведены такие известные сорта и перспективные гибриды как «Лебедушка», «Нестерка», «Павлинка», «Жемчужина», «Минчанка», «Защитникам Бреста», «Вера Хоружая», «Памяти А.Т. Смольской», «Успех», «Константин Заслонов», «Лунный свет», «Зорька Венера», «Партизанка», «Хорошее настроение», «Марат Казей», «Свитязянка», «Белорусские зори», «Полесская легенда».

С 1961 по 2005 гг. интродуцировано более 300 сортов сирени. Все они оценены по декоративности, продуктивности и пригодности для различных технологий выращивания. Более 60 сортов признаны пригодными для промышленного разведения.

В коллекции представлены сорта с простыми (60%) и махровыми (40%) цветками с широкой цветовой гаммой: белой (18%), лиловой (48%), розовой (14%), пурпурной и фиолетовой (20%). Идет пополнение коллекции новыми сортами зарубежной селекции.

Данные, полученные на основе многолетних фенологических наблюдений, изучения особенностей роста и цветения, нуждаются в систематизации и дополнении биохимическими характеристиками. Сложность генетической интерпретации морфологических признаков, связанная с полигенным наследованием и, как правило, сильным влиянием среды на фенотипическое проявление признака, зачастую ограничивает использование методов традиционного описания морфологических и цитологических характеристик растений. Наряду с анализом химического состава вторичных метаболитов, используемом в систематике растений, широко применяются методы биохимического тестирования с помощью молекуляр-

ных маркеров. В рамках проекта «Морфолого-физиологическая и биохимическая паспортизация и создание базы данных на электронном носителе коллекции сирени ЦБС НАН Беларуси» проведены исследования белковых спектров фракций хлоропластов сирени *Syringa vulgaris*, методом градиентного ДСН-электрофореза, при этом показано, что спектры стромальных белков обнаруживают четкие качественные и количественные изменения от сорта к сорту, что дает основание использовать их в целях сортовой идентификации. Денситограммы стромальных белков из хлоропластов сирени, которые позволяют оценивать экспрессию белка и сравнивать образцы между собой вместе с электрофоретическими треками, внесены в компьютерную базу данных. База дополнена данными по фенольным соединениям листьев различных сортов сирени, изученными методом газовой хроматографии. При этом показано, что содержание о-гидроксикоричной кислоты, рутина и др. варьирует незначительно, а тиразола от 0,18 до 0,78 мг/г, что говорит о том, что его можно использовать в качестве хемотаксономического признака при диагностике различных сортов сирени.

Начиная с 2004 г. в ЦБС НАН Беларуси начались работы по изучению генома этой культуры с помощью RAPD-методов, позволяющих маркировать имеющиеся в коллекции дикорастущие виды и культурные сорта.

RAPD технология имеет ряд преимуществ по сравнению с другими подходами исследования генетической изменчивости. Изучение произвольно-амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD) позволяет анализировать большое количество локусов одновременно и сопоставлять значительные участки генома, что повышает точность сравнительного анализа и делает более вероятным нахождение дивергировавших последовательностей. Простота этого метода обеспечивается тем, что он не требует предварительного знания специфической последовательности амплифицируемой ДНК, поэтому для его проведения используются праймеры, отобранные произвольным образом.

Для RAPD-анализа генома сирени из коллекции ЦБС НАН Беларуси были отобраны следующие представители: 4 вида *Syringa amurensis*, *S. pekinensis*, *S. chinensis*, *S. vulgaris* и следующие сорта: Хорошее настроение, Павлинка, Лунный свет, Вера Хоружая, Президент Гречи, Лебедушка, Минчанка, Красавица Москвы, Радж Капур, Роялти, Реомюр, Эстер Стейли, Нестерка, Президент Пуанкаре). Препараты суммарной ДНК получали по методике [2] из листьев растений. В работе использовали 10 олигонуклеотидных десятичленных праймеров. В результате предварительного анализа для RAPD-маркирования генома сирени были отобраны 6 праймеров (табл. 1). Продукты ПЦР разделяли и визуализировали по стандартным методикам [3].

Таблица 1

## Сведения о праймерах

Название праймера	Размер (в нукл.)	Нуклеотидная последовательность (5' - 3')	Температура отжига, °С
Oligo 12	10	CACAACGGGT	28,0
Oligo 13	10	AAACCTGGAC	38,0
Oligo 14	10	AGAAATAGGGC	29,0
Oligo 15	10	ATCGTCCAAC	29,0
Oligo 16	10	GCCCCTCGTC	44,0
Oligo 18	10	CAATCGCCGT	28,0

### Результаты и обсуждение

Первым этапом работы при использовании молекулярных методов исследования ДНК растений, является получение высокоочищенной геномной ДНК из различных растительных тканей. Несмотря на существование ряда опубликованных протоколов по выделению тотальной ДНК растений, при работе со сложными для исследования древесными культурами, к которым относится и сирень, необходима модификация этих методик. Это связано с наличием в клетках этих растений большого количества вторичных метаболитов, в том числе эндогенных полисахаридов и фенольных соединений, которые трудно отделить от ДНК. Образцы ДНК, полученные нами по нескольким стандартным методикам [4, 5] содержали большое количество примесей и не могли быть использованы для дальнейшего RAPD-анализа. Модификация протокола выделения тотальной растительной ДНК с помощью СТАВ-буфера, позволила получить высококачественную тотальную ДНК сирени. В результате данного этапа работы также установлено, что наиболее подходящим растительным материалом являются молодые, активно растущие побеги и листья.

Следующий этап работы состоял в оптимизации RAPD-метода и идентификации праймеров, которые обнаруживают полиморфизм применительно к отобранным видам и сортам коллекции сирени. Испытано 10 произвольных десятичленных праймеров, различающихся по нуклеотидной последовательности и GC составу (табл. 1). Проведенное электрофоретическое фракционирование продуктов полимеразной цепной реакции препаратов ДНК с этими произвольными десятичленными праймерами (RAPD) позволило выявить широкий спектр амплимерных зон. Следует отметить, что из 10 использованных праймеров, полиморфные спектры были получены по 6 из них для изучаемых образцов ДНК сирени. Анализ по данным праймерам у исследованных образцов обнаружил амплимерные зоны, 29 из которых были полиморфны. На основании полученных RAPD-спектров для всех исследованных сортов сирени были составлены многолокусные RAPD-паспорта (табл. 2). Следует отметить, что в табл. 2 приведены только те амплимерные зоны, электрофоретическая идентификация которых была наглядна и легка, а генетическая детерминация не вызывала никаких сомнений. Для количественной оценки RAPD полиморфизма и определения уровня дивергенции между исследуемыми сортами сирени полученные результаты были представлены в виде матрицы состоящей бинарных признаков, где присутствие фрагмента принималось за 1, отсутствие — за 0. Величина размера каждой амплифицированной зоны вычислялась относительно электрофоретической подвижности маркеров с известной молекулярной массой. Обозначение зон производилось по названию праймера, использованного для полимеразной цепной реакции, и размера зоны (в парах нуклеотидов) в надстрочнике. Так, например, зона размером в 2723 п.н. в электрофоретическом спектре продуктов ПЦР с праймером Oligo16 (Рис.1) была обозначена — Oligo16<sup>2723</sup>. Показано, что популяции различаются по генетической вариабельности их представителей, которая выражалась не только в наличии полиморфных локусов в ДНК некоторых растений, но и в варьировании интенсивности гомологичных фрагментов в профилях амплификации ДНК у разных растений (Рис.1).

Проведенная работа позволила перевести исследование растений сирени на качественно новый уровень, систематизировать по ряду биохимических показателей. В результате проведенных исследований отработан метод выделения высокоочищенной геномной ДНК из листьев сирени, подобраны эффективные праймеры и оптимизированы условия проведения ПЦР, адаптирован метод RAPD-анализа для паспортизации сирени.

В заключении следует отметить, что коллекция сиреней ЦБС НАН

Таблица 2

Многолокусные генетические паспорта 4 видов и 14 сортов сирени, составленные на основе анализа RAPD-спектров

праймер, локусы (п.о.)	Вид				Сорт													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<b>Oligo 12</b>																		
1175	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
572	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1
511	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
406	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0
<b>Oligo 13</b>																		
896	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0
<b>Oligo 14</b>																		
1489	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
1289	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
768	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Oligo 15</b>																		
3288	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
2059	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1
1737	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1271	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
1042	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
937	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
509	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
458	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
<b>Oligo 16</b>																		
2723	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
1968	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
1462	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
1320	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
926	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1
791	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
782	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
732	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1
<b>Oligo 18</b>																		
1477	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
957	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
858	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
655	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
549	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0

1 - *S. amurensis*, 2 - *S. vulgaris*, 3 - *S. Pekinensis*, 4 - *S. Chinensis*, 5 - Хорошее настроение, 6 - Павлинка, 7 - Роялти, 8 - Лунный свет, 9 - Вера Хоружая, 10 - Президент Гриви, 11 - Лебедушка, 12 - Минчанка, 13 - Красавица Москвы, 14 - Радж Капур, 15 - Реомюр, 16 - Эстер Стейли, 17 - Нестерка, 18 - Президент Пуанкаре.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

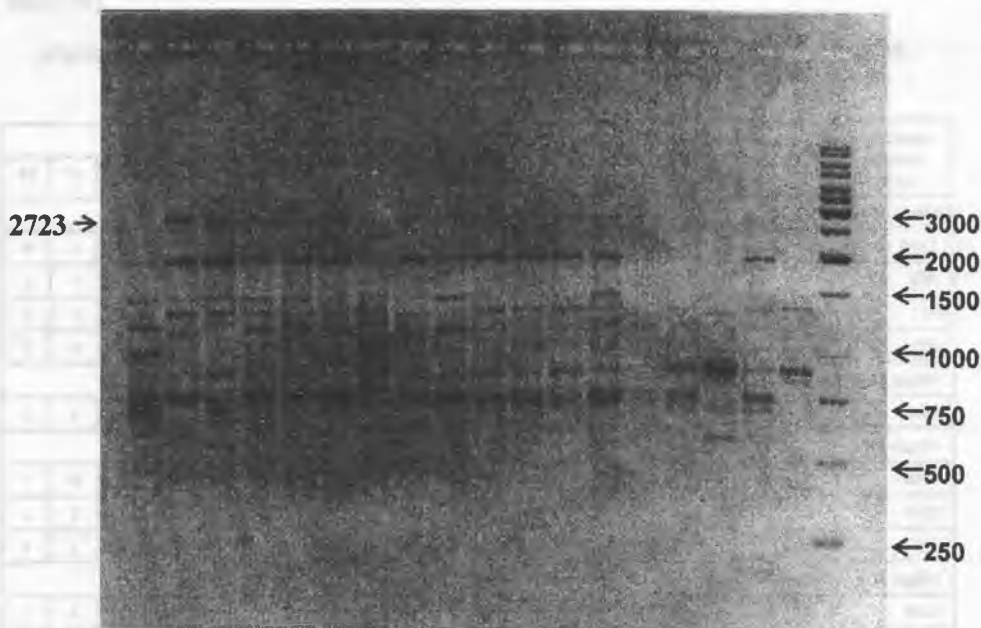


Рис. 1. RAPD-спектры ДНК 4 видов и 14 сортов вида *Syringa*, полученные при использовании праймера Oligo 16.

1 – Президент Пуанкаре; 2 – Нестерка; 3 – Эстер Стейли; 4 – Реомюр; 5 – Радж Капур; 6 – Красавица Москвы; 7 – Минчанка; 8 – Лебедушка; 9 – Президент Гриви; 10 – Вера Хоружая; 11 – Лунный свет;  
 12 – с. Престона (Royalty); 13 – Павлинка; 14 – Хорошее настроение;  
 15 – *S. chinensis*; 16 – *S. pekinensis*; 17 – *S. vulgaris*; 18 – *S. amurensis*  
 19 – маркер молекулярных масс GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, в н.п.).

Беларуси является достаточно обширной по видовому, сортовому и гибридному разнообразию и постоянно пополняется новыми перспективными сортами отечественной и зарубежной селекции. Собранная коллекция представляет разнообразие видов и родов сирени, является фондом для селекционной работы, служит источником для размножения перспективных и редких сортов. Инвентаризация имеющегося материала в рамках выполненных проектов позволила создать компьютерную базу данных, которая объединяет сведения по систематике, фенотипические признаки, геоботанические показатели, условия культивирования, биохимические характеристики, а также рекомендации по использованию растений сирени коллекции ЦБС НАН Беларуси в различных отраслях народного хозяйства республики.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Сиволап Ю.М., Календарь М.Н., Чеботарь С.В. Генетический полиморфизм злаковых растений при помощи ПЦР с произвольными праймерами. - в: Цитология и генетика, 1994, 28:54-61.
2. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from plant tissue / Focus. — V.12. — 1990. — P. 13-15.
3. Westermeier R. Electrophoresis in practice (Third Edition) — WILEY-VCH Verlag: Weinheim, 2001. — 349 p.
4. Kim K.J., Jansen R.K. A chloroplast DNA phylogeny of lilacs (*Syringa*, Oleaceae): plastom groups show a strong correlation with crossing groups // Am. Bot. 1998. V. 85. № 9. P. 1338-1351.
5. Li J., Alexander J.H., Zhang D. Paraphylitic *Syringa* (Oleaceae): evidence from sequences of nuclear ribosomal DNA ITS and ITS regions // System. Botany J. 2002. V. 27. № 3. P. 592-597.