

ИЗУЧЕНИЕ СОРТОВ *SYRINGA VULGARIS* ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОГО СИБИРСКОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА СО РАН

Е.М. Лях

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,
630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101, e-mail: syringa_l@rambler.ru

В результате совместных исследований ЦСБС СО РАН с учеными лаборатории культуры тканей Садов Лонгвуд (Longwood Gardens, Pennsylvania, USA) и Исследовательского института сельскохозяйственной продукции Финляндии (MTT Agrifood Research Laukaa, Finland) была разработана технология размножения 11 сортов *Syringa vulgaris* L. *in vitro* из коллекции ЦСБС. Частично усовершенствована техника извлечения ДНК из свежих листьев для ПЦР-анализа с целью идентификации сортов сирени обыкновенной в совместных исследованиях с Университетом Хельсинки (Helsinki University, Finland).

Ключевые слова: *Syringa vulgaris*, сирень обыкновенная, сохранение *in vitro*, выделение ДНК, идентификация.

RESEARCH OF *SYRINGA VULGARIS* CULTIVARS FROM CENTRAL SIBERIAN BOTANICAL GARDEN'S COLLECTION SB RAS

Е.М. Lyakh

Central Siberian Botanical Garden, SB RAS,
630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya str., 101, e-mail: syringa_l@rambler.ru

Technology of propagation *in vitro* of *Syringa vulgaris* L. cultivars from the CSBG collection was developed as a result of collaboration researches between CSBG SB RAS and scientists from the research laboratory of tissue culture of Longwood Gardens (Pennsylvania, USA) and Research Institute of Agricultural Production of Finland (MTT Agrifood Research Laukaa, Finland). Technology of extraction of DNA from fresh leaves for analysis PCR for identification of common lilac cultivars was partially improved as a result of collaboration researches with Helsinki University (Finland).

Key words: *Syringa vulgaris*, common lilac, *in vitro* conservation, DNA extraction, identification.

ВВЕДЕНИЕ

Сирень обыкновенная (*Syringa vulgaris* L.) является одним из самых востребованных пейзажных растений в прохладных и умеренных областях.

В Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН, в лаборатории дендрологии с 1986 г. ведутся работы с сортами сирени обыкновенной для создания коллекции с последующим отбором наиболее перспективных сортов для резко континентального климата лесостепной зоны Западной Сибири и введения их в озеленение сибирских городов. За период работы с сортами *Syringa vulgaris* испытано 116 сортов зарубежной и отечественной селекции. В настоящее время в коллекции сиреней ЦСБС насчитывается 33 сорта, выделенных как наиболее устойчивых к условиям резко континентального климата западно-сибирского региона (Древесные растения..., 2008). Сорта *Syringa vulgaris* в ЦСБС СО РАН характеризуются высокой

зимостойкостью. Они хорошо приспособлены и могут быть рекомендованы для широкого использования в озеленении городов более холодных климатических зон России, а также в Северной Европе и Северной Америке.

В ботанических садах и питомниках сирень размножают зелеными черенками или прививками, однако не все ее сорта хорошо размножаются этими способами. Существуют трудности в размножении наиболее декоративных сортов (Окунова и др., 2008). Применение метода размножения культурой клеток и тканей решает многие проблемы традиционного размножения, такие как большие энергетические затраты на содержание теплиц (полив, освещение), зависимость успехов укоренения от определенной фазы вегетации растений. Клональное размножение в лаборатории открывает большую перспективу в преодолении этих ограничений.

Из литературных источников известно, что на процессы успешного побегообразования влияет большое количество факторов, таких как тип экспланта, оптимальные сроки его взятия, генотип растения, использование различных комбинаций фитогормонов в питательных средах (Einset, Alexander III J., 1984; Tomson et al., 2007).

Главной проблемой является правильное определение сортовой принадлежности растений. Традиционно сорта сирени характеризовались на основе морфологических особенностей. Однако в коллекциях существует путаница сортов, поэтому их оценка недостаточно надежна, особенно если касается таких характеристик, как аромат и оттенок цвета кистей, которые субъективны и не сохраняются в гербарии. Использование молекулярно-генетических методов является важным инструментом для проверки идентичности культурных сортов растения. В частности, определение экспериментальным путем ДНК-маркеров с помощью ПЦР (полимеразная цепная реакция) для генетической идентификации.

Разработка методов идентификации и размножения лучших генотипов сирени важна для успешного введения этих сортов в озеленение городов Сибири и климатически сходных регионов. Результаты исследований обеспечат успешное размножение и сохранение ценных сортов.

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ

Методики исследований основывались на общепринятых классических приемах с культурами изолированных тканей (Бутенко, 1999). В экспериментальной работе использовали апикальные и латеральные почки зрелых и молодых побегов, а также меристему. Меристема – изолированный из апекса или пазушной почки побега конус нарастания с одним или двумя листовыми примордиями

Первым этапом работы был выбор типа эксплантов и времени начала микроразмножения. Оптимальным временем размножения сирени считается период массового цветения – июнь. Из годичных побегов брали небольшие части побега (1.0–1.5 см) с двумя боковыми почками и апексы. Экспланты помещали для стерилизации в 20%-й хлорсодержащий раствор “Chlorax” на 20 мин и затем промывали в большом количестве стерильной воды. Стерильные экспланты помещали в пробирки на агаризованную питательную среду Мурасиге и Скуга (MS) (Murashige, Skoog, 1962), содержащую никотиновую кислоту – 1 мг/л, пиридоксин HCl – 1 мг/л, тиамин HCl – 1 мг/л, сахарозу – 30 г/л, агар – 7 г/л, с ИУК (индолилуксусной кислотой) и БАП (бензиламинопурин) в различных концентрациях, и выращивали при температуре 21–23 °C, освещенности 1800 лк и фотопериоде 16 ч.

ЦСБС СО РАН сотрудничает со многими зарубежными ботаническими садами по разным аспектам изучения растений. Наша совместная работа по изучению особенностей клонального размножения сортов *Syringa vulgaris* и других видов рода *Syringa* проводилась в исследовательской лаборатории культуры тканей Садов Лонгвуд (Longwood Gardens, Pennsylvania, USA) под руководством Джима Харбаджа (PhD Jim Harbage) в 2009 г.

Цель этих исследований – оценить типы регуляторов роста и их концентраций для размножения и укоренения культурных сортов сирени обыкновенной и также 3 видов рода *Syringa*. Исходный материал (одревесневшие черенки) для исследований получали из 10-летних растений сирени обыкновенной, произрастающих в экспозиции этого ботанического сада, а также привезенные черенки сортов сирени из коллекции ЦСБС СО РАН. Для нашего проекта были также присланы черенки 4 сортов *Syringa vulgaris* и 2 видов *S. wolfii* и *S. laciniata* из Арборетума Арнольда, г. Бостон (Arnold Arboretum, Boston) и 8 сортов *Syringa vulgaris* и 1 вида *S. patula* из Ботанического сада Рочестер, Нью-Йорк (Rochester Garden, New-York). В экспериментах использовали как свежесрезанные черенки, так и хранящиеся в холодильной камере при температуре +8 °C. Всего исследовано 20 сортов сирени обыкновенной и 3 вышеуказанных вида.

Данные эксперимента анализировались через 5, 7 и 9 дней. Результат первого эксперимента был неудовлетворительный. Несмотря на обработку в хлорсодержащем растворе, наблюдалось массовое заражение эксплантов грибами и бактериями. Доля незагрязненных эксплантов через 5 дней эксперимента составляла от 10 (сорт “Мадам Лемуан”) до 27.5 % (“Людвиг Шпет”). Эксперимент был повторен с другим типом экспланта – меристемой. Как и в первом эксперименте, апексы и пазушные почки также обрабатывали в 15%-м растворе “Chlorax” 15 мин. Используя световой микроскоп, мы подготовили из стерилизованного материала экспланты меристемы размером 0.5–1.0 мм. Через 9 дней доля развившихся побегов составила 97–99 %, не было отмечено ни одного зараженного образца.

Для выяснения влияния генотипа исходного растения на коэффициент размножения в культуре *in vitro* были исследованы 20 сортов, из них были выбраны 5 модельных сортов: “Мадам Лемуан” (“Madam Lemoine”), “Людвиг Шпет” (“Ludwig Spaeth”), “Монж” (“Monge”), “Красавица Москвы” (“Krasavitza Moskvi”), “Капитан Бальтэ” (“Capitain Baltet”). Через 3 недели регенеранты представляли собой (здоровые) не зараженные уко-

роченные побеги 3–5 мм с сформировавшимися листьями. Размеры и количество листьев варьировали в зависимости от сорта. Больше число регенерантов с более сформированным побегом и более крупными листьями было у сорта “Людвиг Шпет”. Субкультивирование было повторено 3 раза через 4 недели, и через 4 месяца это были растения-регенеранты с побегом 2–3 см из 2–3 междоузлий (см. рисунок, а).

Черенки, срезанные в начале вегетативного периода (в апреле) и упакованные в пластиковые пакеты, хранили 4 месяца в условиях холодильной камеры при температуре +8 °С. Затем эксперимент повторяли с использованием меристемы на тех же 5 модельных сортах “Людвиг Шпет”, “Мадам Лемуан”, “Монж”, “Капитан Бальтэ”, “Красавица Москвы”. Так же как и в июле, доля развившихся регенерантов была очень высокая (97–99 %) и они были не заражены. Через 3 недели мы могли наблюдать хорошо развитые растения-регенеранты.

Работа по изучению сортов сирени обыкновенной была продолжена в 2012 г. с Отделом сельскохозяйственных наук Университета Хельсинки (Department of Agricultural Sciences, University of Helsinki) и Исследовательским институтом сельскохозяйственной продукции Финляндии (MTT Agrifood Research Laukaa, Finland).

Сирень типична и для исторических парков, и для небольших садов в городах Финляндии. Как известно из исторических сводок, она была привезена и введена в культуру в этой стране в начале XVIII столетия как одно из первых экзотических растений, выращенных в исключительно декоративных

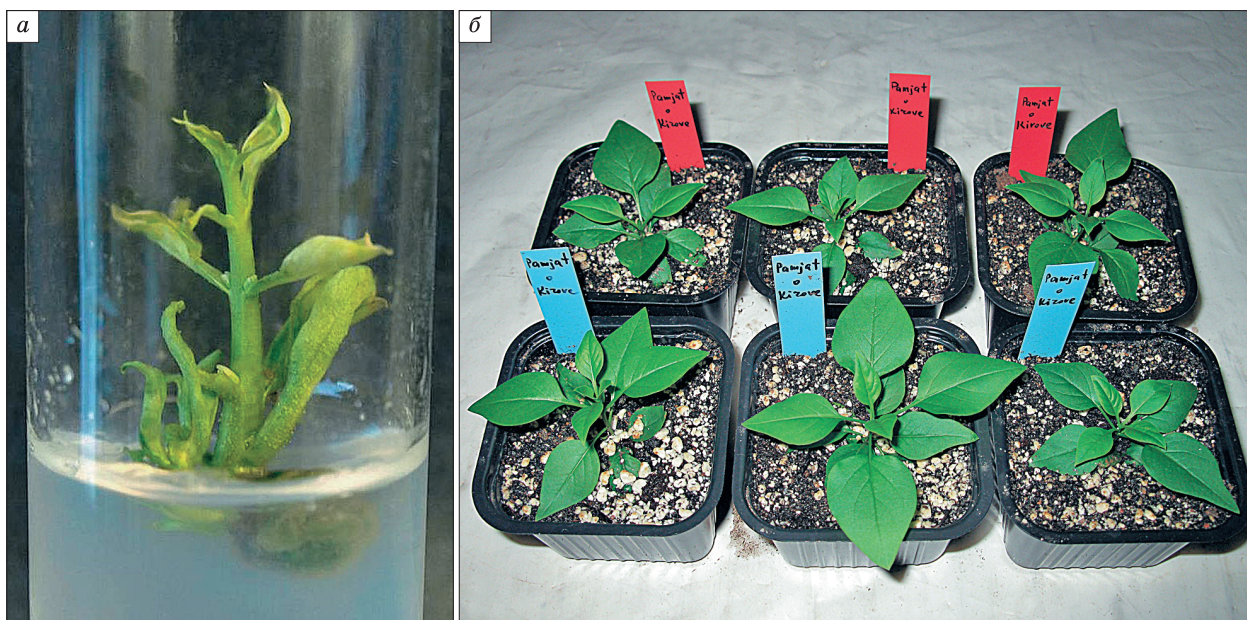
целях. У сортов сирени в финских и российских коллекциях есть культурные исторические связи. Растения из питомников Санкт-Петербурга привозили и выращивали в Хельсинки в конце XIX и в начале XX веков. В настоящее время эти старые культурные сорта сирени обыкновенной находятся и в коллекции ЦСБС СО РАН в Новосибирске.

Весной 2012 г. был начат совместный проект, поддержанный Академией наук Финляндии “Генетические ресурсы сирени обыкновенной”. Главная цель проекта состояла в совершенствовании технологии клонального размножения (для сохранения и дальнейшего культивирования) и проведении молекулярно-генетического анализа для идентификации сортов и генотипов сирени обыкновенной. Для исследования использовали зимние одревесневшие черенки 11 интродуцированных сортов *Syringa vulgaris* из коллекции в ЦСБС (Lyakh et al., 2013) и 60 образцов листьев с неидентифицированных сортов, растущих в Финляндии.

Работа по клональному размножению проводилась в Исследовательском институте сельскохозяйственной продукции Финляндии под руководством научных сотрудников Марьятты Йосукайнен (Marjatta Uosukainen) и Анны Нукари (Anna Nukari).

Наши исследования были направлены на увеличение коэффициента размножения сирени обыкновенной путем изменения состава питательной среды, от которого зависит степень реализации регенерационного потенциала сортов сирени.

Цель эксперимента – разработать условия успешного клонального размножения. В качестве



Регенеранты:

а – сорт “Людвиг Шпет”; б – сорт “Память о Кирове”.

эксплантов использовали меристему апикальных и латеральных почек зрелых и молодых побегов.

В новых исследованиях мы использовали три типа поверхностной стерилизации почек. В первой части эксперимента почки каждого из 11 сортов растения стерилизовали 3- и 10%-м раствором гипохлорита кальция в экспозиции 20 мин и 75%-м этанолом в экспозиции 20 с. Было подготовлено 396 меристем для индукции, меристемы размером 1–2 мм были изолированы от почек с помощью стереомикроскопа.

Для инициирования (индукции) микрокультур меристемы были помещены в пробирки с агарозной средой G-соль (Uosukainen, 1992), содержащей глюкозу 30 и 0.75 мг/л БАП (бензиламинопу-

рин), и выращивали при температуре 21–23 °С, фотопериоде 16 ч, освещенности 1800 лк. Субкультивирование было повторено 3 раза через 4 недели. Затем микропобеги высотой не менее 1 см были высажены на среду для укоренения, где побеги культивировали и через 18 дней растения-регенеранты пересаживали в почву с вермикулитом и выращивали еще 18 дней. Для характеристики ростовых процессов определяли число побегов, их высоту, а также длину корней.

Были успешно инициированы все 11 сортов сирени. Однако наибольшей способностью к регенерации отличились 4 сорта: "Индия", "Огни Донбасса", "Алтайская розовая" и "Память о Кирове" (см. рисунок, б).

ПРОБЛЕМЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ СОРТОВ

Для решения проблемы идентификации сортов сирени обыкновенной мы проводили исследования в рамках проекта в Университете Хельсинки. Работа проводилась под руководством Лены Линден (PhD Leena Linden, Helsinki University).

На первом этапе выделяли ДНК из свежих листьев. Образцы листьев были собраны в июне 2012 г. в исторических садах и парках г. Хельсинки. Также в своих исследованиях мы использовали листья сортов сирени, собранные в 2006 и 2009 гг. и хранящиеся в Университете Хельсинки при –20 °С.

Для идентификации сортов мы запросили и получили 13 справочных образцов листьев из международных коллекций Ботанического сада Нанси, Франция (Conservatoire et Jardins Botaniques de Nancy, France). Справочный материал для проверки сортов также включал 3 образца (2009 г.) из Ботанического сада г. Монреаля, Канада (Jardins Botaniques de Montréal, Canada); 3 образца (2009, 2012 гг.) из Арборетума Арнольда Гарвардского университета, США (Arnold Arboretum of Harvard

University, USA). Всего экспериментальный материал включал 60 образцов.

Сразу после сбора свежие листья 2012 г. в полиэтиленовых пакетах хранились при –20 °С до изоляции ДНК. Справочные образцы, присланные из других стран, также были заморожены при –20 °С в день получения. Для извлечения геномной ДНК замороженные листья растирали с жидким азотом и хранили при –80 °С.

ДНК выделяли из ткани листа, используя E.Z.N.A. ДНК Мини-Кит Протокол (для свежих и замороженных образцов). Было проведено 32 изоляции ДНК из образцов 2012 г. Концентрацию ДНК определяли с помощью программы NanoDrop, ее количества из свежих образцов было достаточно для дальнейшего ПЦР-анализа, но концентрации ДНК, выделенной из старых образцов 2006 и 2009 гг., было мало для дальнейшего анализа. При работе со старыми образцами использовали СТАВ-метод (Doyle J.J., Doyle J.L., 1990). Для получения нужной концентрации путем серии экспериментов метод был нами адаптирован (Lyakh, 2014a).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования показали возможность успешного размножения сортов сирени обыкновенной *in vitro*. При выборе в качестве первичных эксплантов апексов и пазушных почек получены менее успешные результаты размножения по всем сортам сирени обыкновенной, высокие показатели были при размножении с использованием меристемы в качестве первичного экспланта во всех сортах сирени. Неоспоримым преимуществом выбора такого типа эксплантов было то, что работа проводилась с растениями, которые находились в условиях открытого грунта, а не только с растениями из теплиц. При таком выборе типа эксплантов увеличивались календарные сроки успешного размножения в течение и после окончания вегетаци-

онного периода. Наглядным доказательством является наш опыт успешного микроразмножения сортов, черенки которых хранились 4 месяца при температуре +8 °С, что очень важно для клонального размножения сортов сирени обыкновенной. Всего исследовано 20 сортов *Syringa vulgaris*. Сортные особенности оказывают существенное влияние как на регенерационную способность, так и на коэффициент размножения. Сорта "Память о Кирове", "Индия", "Огни Донбасса", "Алтайская розовая" и "Людвиг Шпет" обладают лучшей регенерационной способностью.

При проведении экспериментов была усовершенствована методика клонального размножения 11 сортов от инициации меристемы до

высадки растений в теплицу. Необходимо продолжить исследования до высадки растений в условия открытого грунта и усовершенствовать методику для других сортов *Syringa vulgaris*.

В результате исследований выделено 60 образцов ДНК для дальнейшей идентификации сортов сирени обыкновенной и усовершенствована техника извлечения ДНК из листьев для ПЦР-анализа (Lyakh, 2014b).

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность канд. биол. наук Зинаиде Ивановне Лучник (Институт садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко, г. Барнаул) и канд. биол. наук Ирине Борисовне Окуновой (Главный ботанический сад РАН, г. Москва) за предоставленный растительный материал сортов сирени обыкновенной, который стал основой коллекции лаборатории дендрологии ЦСБС СО РАН.

Благодарю Джима Харбаджа (Jim Harbage PhD, Longwood Gardens, Pennsylvania, USA), Лену Линден (Leena Linden PhD, Department of Agricultural Sciences, University of Helsinki, Finland), научных сотрудников Марьятту Йосукаинен (Marjatta Uosukainen) и Анну Нукари (Anna Nukari, MTT Agrifood Research Laukaa, Finland) за возможность проведения совместных исследований, также коллег из Арборетума Арнольда, г. Бостон (Arnold Arboretum, Boston, USA), Ботанического сада Рочестер, Нью-Йорк (Rochester Garden, New-York, USA), Ботанического сада Нанси, Франция (Conservatoire et Jardins Botaniques de Nancy, France), приславших образцы для наших исследований. Выражаю благодарность Фрику Вругтману (Freek Vrugtman, Royal Botanical Gardens, Canada), регистратору коллекций сирени за ценные советы.

ЛИТЕРАТУРА

- Бутенко Р.Г.** Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учеб. пособие. М., 1999. 160 с.
- Древесные растения для озеленения Новосибирска /** В.Т. Бакулин, Е.В. Банаев, Т.Н. Встовская и др. Новосибирск, 2008. С. 263–267.
- Окунова И.Б., Михайлов Н.М., Демидов А.С.** Сирень: коллекция ГБС РАН: история и современное состояние. М., 2008. С. 24–41.
- Doyle J.J., Doyle J.L.** Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 1990. No. 12. P. 13–15.
- Einset J., Alexander III J.** Multiplication of *Syringa* species and cultivars in tissue culture // Proc. Inter. Plant Prop. Soc. 1984. V. 34. P. 628–636.
- Lyakh E.** Method Modifications for DNA Extraction in Lilacs // Lilacs. Quarterly J. Inter. Lilac Soc., USA. 2014a. V. 43 (1). P. 17–19.
- Lyakh E.** DNA Fingerprinting: Common Lilac cultivars from Historic Park and Botanical Garden Collections // Public Garden, USA. 2014b. V. 28, No. 4. P. 24–26.
- Lyakh E., Nukari A., Lindén L., Laamanen J., Uosukainen M.** *Syringa vulgaris* Genetic Resources Pilot project in Finland // Lilacs. Quarterly J. Inter. Lilac Soc., USA. 2013. V. 42 (1). P. 21–23.
- Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473–497.
- Tomsone S., Galeniece A., Akere A.** *In vitro* propagation of *Syringa vulgaris* L. cultivars // Biologija. 2007. V. 53, No. 2. P. 28–31.
- Uosukainen M.** Rooting and weaning of apple rootstock YP // Agronomie. 1992. V. 12. P. 803–806.