

УДК 582.912.46: 577.213.3/575.22

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИВЕРГЕНЦИИ СОРТОВ РОДА СИРЕНЬ (*SYRINGA* L.) БЕЛАРУСКОЙ СЕЛЕКЦИИ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСНОГО RAPD- И ISSR-МАРКИРОВАНИЯ

СПИРИДОВИЧ Е.В., ВЛАСОВА А.Б., ЮХИМУК А.Н., РЕШЕТНИКОВ В.Н.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

Разработан и применен комплексный RAPD+ISSR подход молекулярной сертификации сортов сирени белорусской селекции (ЦБС НАН Беларуси) для целей контроля сортовой чистоты при их размножении, поддержании в коллекции и сохранения ценных генотипов. Созданные 93 RAPD и 67 ISSR маркеры (в т.ч. сорт-уникальные) позволили дифференцировать 13 исследованных генотипов, составить генетические паспорта для каждого из них, рассчитать степень генетического родства и уточнить филогенетические связи между сортами. Разработанный метод ДНК-паспортизации сортов сирени является эффективным способом изучения генетического разнообразия и молекулярной сертификации культурных форм сирени, верификации коллекционных фондов при депонировании *in vitro*.

Ключевые слова: *Syringa vulgaris* L., сирень, сорта, молекулярная сертификация, маркеры, RAPD-, ISSR-локусы, генетическая дистанция, *in vitro* коллекция, генетическое разнообразие, сохранение.

Введение

В создание коллекции сирени Центрального ботанического сада НАН Беларуси (ЦБС) вложен труд нескольких поколений ботаников-интродукторов и селекционеров: Н.В. Смольского, В.Ф. Бибиковой, Э.А. Бурой, Г.И. Матусевича, Н.В. Македонской [13]. Сотрудники Центрального ботанического сада в 70–80-х годах начали широко использовать для культуры сирени разнообразные селекционно-генетические методы, такие как отбор семян, полученных от свободного опыления, и гибридизацию. Для получения гибридных семян сирени скрещивали как сорта, так и разные виды. Путем межсортных скрещиваний были предприняты попытки улучшения ряда хозяйственных и декоративных признаков интродуцированных видов сирени. На основе экспериментальных исследований Вероники Фёдоровны Бибиковой были получены сорта сирени с простыми крупными и махровыми цветками чистых колеров, обильно и продолжительно цветущих: ‘Лебедушка’, ‘Нестерка’, ‘Павлинка’, ‘Минчанка’, ‘Защитникам Бреста’, ‘Вера Хоружая’, ‘Памяти А.Т. Смольской’, ‘Успех’, ‘Константин Заслонов’, ‘Лунный Свет’, ‘Зорька Венера’, ‘Партизанка’, ‘Хорошее Настроение’, ‘Марат Казей’, ‘Святязянка’, ‘Белорусские Зори’, ‘Полесская Легенда’ [1]. На основе огромной экспериментальной работы с исходными сортами французской селекции, в условиях ограниченных контактов с селекционерами сирени других стран, минимального доступа к основным источникам информации о сирени, была создана коллекция белорусских сортов, которая, как и коллекция сортов Леонида Колесникова, является уникальной линией эволюции сирени [13].

Наряду с традиционными методами сохранения генетического разнообразия растений *ex situ*, в живых ботанических коллекциях все большее значение приобретает применение клеточных биотехнологий, которые обеспечивают сохранение ценных селекционных образцов прошлых лет, ускоренное получение и размножение новых форм и линий декоративных культур с улучшенными признаками устойчивости к неблагоприятным факторам, повышенной продуктивностью [17]. При микроклонировании наиболее полно реализуется регенерационный потенциал первичных меристем. Это особенно важно для размножения генотипов и декоративных форм растений, ценные характеристики которых сложно сохранить при семенном воспроизведении. В Центральном ботаническом саду НАН Беларуси были получены

растения-регенеранты сирени белорусской селекции с помощью биотехнологических методов [15], большая помощь была оказана сотрудниками Главного ботанического сада им. Цицина [3]. В настоящее время в *in vitro* коллекция рода *Syringa* ЦБС НАНБ представлена 67 сортами; на стадии получения стерильной культуры находятся еще два вида, несколько сортов селекции Л.А. Колесникова и новинки американской селекции. Важной целью работ в данном направлении является введение всех сортов собственной селекции ЦБС в культуру *in vitro* как ценнейших объектов генетического разнообразия и национального наследия.

Необходимым этапом при создании, сохранении и поддержании коллекций *in vitro*, а также при обмене материалом между учреждениями является гармонизация правил содержания коллекций и разработка методик проведения скрининга коллекционных фондов на основе молекулярно-генетических маркеров. Последнее имеет важное практическое значение для паспортизации коллекций, оценки их генетического разнообразия, формирования стержневых коллекций, выявления и отбора особо ценных таксонов для будущей селекции [6].

Систематизация и документирование коллекции сирени ЦБС НАН Беларуси начаты в 2002 году в процессе создания комплексной базы данных коллекции сирени, включающей морфологическое описание генотипов и первые данные об их генетической сертификации [7, 8]. В настоящее время ведется пополнение информационно-поисковой базы данных белорусских *in vitro* коллекций молекулярно-генетическими паспортами их объектов, обеспечивающих эффективное хранение и обработку информации, проведения исследований, расширения сотрудничества и информационного обмена в целях сохранения биоразнообразия [2].

Комплексный подход мультилокусного ДНК-маркирования, когда одновременно применяется несколько маркерных систем, широко применяемый для целей генотипирования генетических ресурсов растений, позволяет с наименьшими временными и финансовыми затратами и высокой разрешающей способностью дифференцировать генотипы как на межвидовом, так и внутривидовом уровнях, разрешить спорные вопросы происхождения и родственности сортов, предоставить ценную информацию для дальнейшей селекции культур [14, 16]. В литературе представлено небольшое количество работ по молекулярному маркированию сортов *S. vulgaris*, и в основном вовлекающих другие маркерные системы и генотипы, отличные от исследованных в данной работе [2, 10].

В данной статье представлены результаты молекулярного генотипирования сортов сирени белорусской селекции коллекции ЦБС НАН Беларуси на основе идентификации полиморфизма RAPD- и ISSR-локусов. Цель данного исследования — разработка эффективных систем генетических маркеров (RAPD и ISSR) для рода *Syringa* с последующей дифференциацией и сертификацией сортов сирени, и созданием генетического паспорта для каждого генотипа. Такие паспорта позволяют не только отличать образцы друг от друга, но и определять степень генетического сходства между ними, выявлять наиболее уникальные генотипы [5, 11, 12], выбирать исходный материал для селекции, следить за генетической чистотой и однородностью сортов при создании коллекционных *in vitro* фондов и размножении растительного материала.

Материалы и методы

В исследование были включены 13 сортов сирени белорусской селекции из коллекции ЦБС НАН Беларуси. Данные о происхождении исследованных сортов приведены ниже (табл. 1).

Сорта сирени белорусской селекции из коллекции ЦБС НАН Беларуси

№	Название сорта	Родительские формы	Видовая принадлежность
1	‘Лебедушка’	Абель Шатане	<i>Syringa vulgaris</i> L.
		Реомюр	<i>Syringa vulgaris</i> L.
2	‘Павлинка’	Абель Шатане	<i>Syringa vulgaris</i> L.
		Реомюр	<i>Syringa vulgaris</i> L.
3	‘Защитникам Бреста’	Абель Шатане	<i>Syringa vulgaris</i> L.
		Реомюр	<i>Syringa vulgaris</i> L.
4	‘Минчанка’	Абель Шатане	<i>Syringa vulgaris</i> L.
		Реомюр	<i>Syringa vulgaris</i> L.
5	‘Вера Хоружая’	Абель Шатане	<i>Syringa vulgaris</i> L.
		Реомюр	<i>Syringa vulgaris</i> L.
6	‘Хорошее настроение’	Абель Шатане	<i>Syringa vulgaris</i> L.
		Реомюр	<i>Syringa vulgaris</i> L.
7	‘Лунный свет’	Абель Шатане	<i>Syringa vulgaris</i> L.
		Реомюр	<i>Syringa vulgaris</i> L.
8	‘Полесская легенда’	Людвиг Шпет	<i>Syringa vulgaris</i> L.
		Гиацинтовая	<i>Syringa</i> × <i>hyacinthiflora</i> Rehder (<i>Syringa vulgaris</i> L. × <i>Syringa oblata</i> Lindl.)
9	‘Памяти Смольской’	Людвиг Шпет	<i>Syringa vulgaris</i> L.
		Гиацинтовая	<i>Syringa</i> × <i>hyacinthiflora</i> Rehder (<i>Syringa vulgaris</i> L. × <i>Syringa oblata</i> Lindl.)
10	‘Партизанка’	Людвиг Шпет	<i>Syringa vulgaris</i> L.
		Гиацинтовая	<i>Syringa</i> × <i>hyacinthiflora</i> Rehder (<i>Syringa vulgaris</i> L. × <i>Syringa oblata</i> Lindl.)
11	‘Константин Заслонов’	Гиацинтовая	<i>Syringa</i> × <i>hyacinthiflora</i> Rehder (<i>Syringa vulgaris</i> L. × <i>Syringa oblata</i> Lindl.)
		Реомюр	<i>Syringa vulgaris</i> L.
12	‘Зорка Венера’	Гиацинтовая	<i>Syringa</i> × <i>hyacinthiflora</i> Rehder (<i>Syringa vulgaris</i> L. × <i>Syringa oblata</i> Lindl.)
		Реомюр	<i>Syringa vulgaris</i> L.
13	‘Свитязянка’	Гиацинтовая	<i>Syringa</i> × <i>hyacinthiflora</i> Rehder (<i>Syringa vulgaris</i> L. × <i>Syringa oblata</i> Lindl.)
		Реомюр	<i>Syringa vulgaris</i> L.

Препараты геномной ДНК получали из обезвоженной силикагелем листовой ткани с использованием СТАВ-метода с модификациями [5, 9]. Качество и концентрацию препаратов ДНК измеряли спектрофотометрическим методом. Мультилокусное ДНК-маркирование проводили с использованием техники RAPD- и ISSR-ПЦР. После предварительного скрининга для проведения полимеразной цепной реакции были отобраны пять наиболее информативных праймеров, т.е. эффективно выявляющих генетическую вариабельность на внутривидовом уровне между всеми генотипами: три RAPD (OPA–18, OPE–02, OPP–09) и два ISSR (UBC–808, UBC–862). ПЦР проводили в 25 µl реакционной смеси на приборе SureCycler 8800 (Agilent). Фрагментный анализ и визуализацию продуктов амплификации проводили посредством капиллярного электрофореза на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent) (рис. 1). Расчет генетических дистанций, UPGMA кластеризацию и построение дендрограмм проводили с использованием программного обеспечения Treecon©.

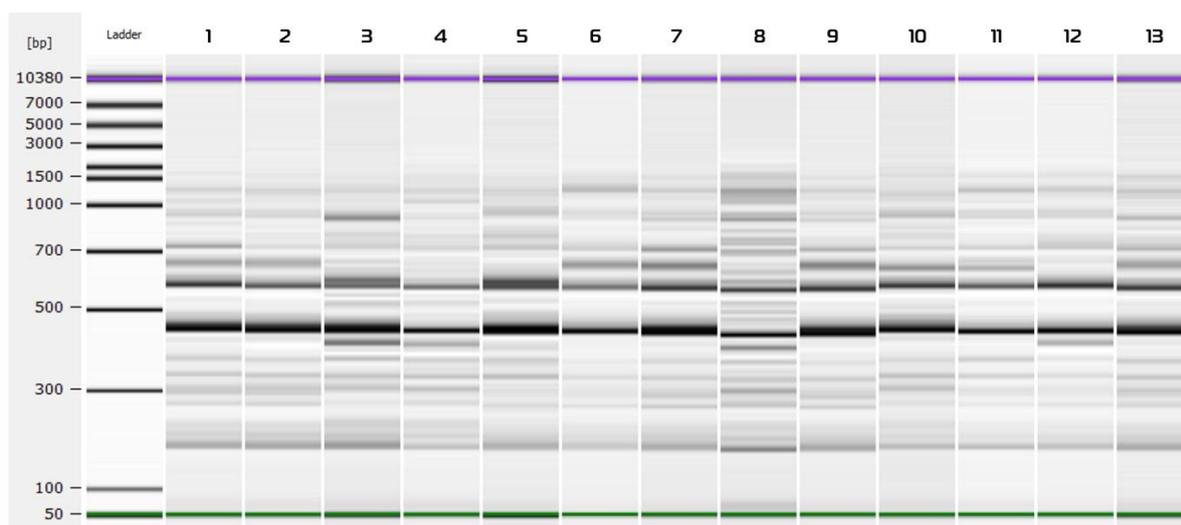


Рис. 1 Репрезентативное электрофоретическое разделение продуктов амплификации геномной ДНК 13 сортов сирени с праймером UBC-862

1 — 'Лебедушка', 2 — 'Защитникам Бреста', 3 — 'Павлинка', 4 — 'Минчанка', 5 — 'Зорка Венера', 6 — 'Партизанка', 7 — 'Памяти Смольской', 8 — 'Полесская Легенда', 9 — 'Вера Хоружая', 10 — 'Лунный Свет', 11 — 'Константин Заслонов', 12 — 'Свитязянка', 13 — 'Хорошее Настроение'; Ladder — маркер молекулярного веса.

Результаты и обсуждение

Для исследования генетической дифференциации сортов сирени белорусской селекции был применен комплексный метод мультилокусного ДНК-маркирования, основанный на двух ПЦР-техниках: RAPD и ISSR. Предварительно отобранные праймеры (RAPD: OPA-18, OPE-02, OPP-09; и ISSR: UBC-808, UBC-862) генерировали четкие воспроизводимые ампликоны, набор которых для каждого исследуемого сорта характеризовался уникальностью. В таблице 2 приведены данные о спектрах ампликонов, полученных с помощью использованных RAPD и ISSR праймеров. Информативность использованных праймеров варьировала. Так, максимальное количество локусов 23 (в том числе 15 полиморфных) было идентифицировано с помощью праймера UBC-808, минимальное – 11 (из них 4 полиморфных) сгенерировано праймером OPP-09 (см. таблицу 2). В общей сложности было идентифицировано 76 локусов маркеров) – 40 RAPD- и 36 ISSR-маркеров, соответственно. Из данного пула 44 маркера являлись полиморфными. Обе ПЦР техники позволили выявить высокий уровень полиморфизма у изучаемых сортов сирени – в среднем 57,89%. Максимальный полиморфизм выявлен при использовании праймера OPA-18 (66,67%), минимальный – 36,36% при амплификации с праймером OPP-09.

Таблица 2

Характеристика спектров ампликонов *Syringa* spp., генерируемых RAPD- и ISSR-праймерами

Праймер	Последовательность нуклеотидов, 5'→3'	Число ампликонов		Уровень полиморфизма, %
		всего	Полиморфных	
<i>RAPD-праймеры</i>				
OPA-18	AGGTGACCGT	12	8	66,67
OPE-02	GGTGCGGGAA	17	10	58,82
OPP-09	GTGGTCCGCA	11	4	36,36
<i>ISSR-праймеры</i>				
UBC-808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	23	15	65,22
UBC-862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC	13	7	53,85
Общее число:		76	44	—
Среднее значение:		15,2	8,8	57,89

Проведенное мультилокусное ДНК-маркирование 13 сортов белорусской селекции рода *Syringa* с использованием 3 RAPD- и 2 ISSR-праймеров позволило дифференцировать все исследованные генотипы, разработать маркеры, в том числе сорт-специфические, составить уникальные профили для каждого из них и рассчитать генетические дистанции родства/отдаленности между генотипами. Таким образом, использованный RAPD+ISSR подход был адаптирован для генетической сертификации генотипов *Syringa* spp. На основании полученных RAPD и ISSR-маркеров для 13 сортов сирени были составлены мультилокусные генетические паспорта. В таблице 3 приведен пример генетического паспорта для сорта Полесская Легенда. Все данные по ДНК типированию образцов сирени белорусской селекции включены в отдельный раздел «Молекулярно-генетические паспорта» информационно-поисковой системы Hortus Botanicus Centralis — Info (№ ГР 20053449 от 14.11.2005). Данная система служит источником данных для сайтов «Ботанические коллекции Беларуси» (<http://hbc.bas-net.by/bcb/>) и разделов портала Совета ботанических садов России, Беларуси и Казахстана (<http://hortusbotanicus.ru>), что дает основу для расширения сотрудничества и информационного обмена в целях сохранения биоразнообразия.

Таблица 3

Репрезентативный мультилокусный генетический паспорт сорта сирени белорусской селекции Полесская Легенда

*Сорт Полесская Легенда***Маркеры**

OPA18₂₅₅, OPA18₃₅₅, OPA18₃₇₀, OPA18₃₉₅, OPA18₄₃₀, OPA18₅₉₀, OPA18₉₃₀, OPA18₁₀₃₀, OPA18₁₂₂₅

OPE02₂₆₀, OPE02₂₇₀, OPE02₃₅₅, OPE02₄₁₅, OPE02₄₄₀, OPE02₄₈₀, OPE02₄₉₅, OPE02₅₃₀, OPE02₅₇₀, OPE02₆₅₀, OPE02₇₇₅, OPE02₈₉₀, OPE02₉₄₅, OPE02₁₃₈₀

OPP09₂₆₀, OPP09₃₆₅, OPP09₄₈₅, OPP09₅₃₅, OPP09₆₁₀, OPP09₆₄₅, OPP09₆₆₅, OPP09₇₈₀, OPP09₈₇₅, OPP09₉₈₀

UBC808₂₁₀, UBC808₂₅₀, UBC808₂₆₅, UBC808₃₃₀, UBC808₃₅₅, UBC808₄₂₀, UBC808₄₄₀, UBC808₄₅₅, UBC808₄₈₀, UBC808₅₂₅, UBC808₅₅₀, UBC808₅₉₅, UBC808₆₆₅, UBC808₇₀₀, UBC808₈₁₀, UBC808₈₈₅, UBC808₉₅₀

UBC862₁₈₅, UBC862₂₇₀, UBC862₃₃₅, UBC862₃₇₅, UBC862₄₅₀, UBC862₅₈₀, UBC862₆₀₅, UBC862₇₂₅, UBC862₉₆₀

Разработанная методическая схема генотипирования сортов сирени на основе комплекса RAPD- и ISSR-маркеров была применена для молекулярно-генетического документирования живых коллекций сирени, в том числе и для верификации образцов коллекции *in vitro*. Известно, что соматическая изменчивость у растений, регенерированных *in vitro*, бывает очень высокой, поэтому немаловажным условием

поддержания полученных микрополюгов является контроль и сохранение стабильности генотипа. Такая работа была начата при сравнении микроклонов, поддерживаемых в коллекциях разных ботанических садов, в частности сортов Партизанка и Свитязянка из коллекций *in vitro* ЦБС НАН Беларуси и ГБС РАН [4].

В данной работе проведена оценка сортового соответствия для генотипов белорусской селекции 'Лунный Свет', 'Павлинка', 'Лебедушка', 'Защитникам Бреста' при размножении *in vitro*. С помощью разработанных RAPD- и ISSR-маркеров было подтверждено соответствие материала, размножаемого в культуре *in vitro*, коллекционному материалу открытого грунта. В ряде случаев была обнаружена вариабельность параметров генетической однородности (профили ампликонов, генетические дистанции; данные не приведены), что может объясняться возникновением допустимых изменений в связи с различной реакцией генотипов на культивирование в условиях *in vitro*, а также длительностью пассажей.

Для изучения степени генетической дивергенции сортов сирени белорусской селекции и выяснения их филогенетических взаимоотношений в исследование были включены родительские сорта белорусской сирени: 'Абель Шатане', 'Людвиг Шпет' и 'Реомюр'. На основании выявленных ДНК-маркеров были рассчитаны генетические дистанции Nei между исследованными сортами сирени, произведена их кластеризация по методу UPGMA. Эти данные были использованы при конструировании дендрограмм для каждого праймера (RAPD и ISSR) (данные не представлены), а также консенсусной (RAPD+ISSR) дендрограммы, представленной на рисунке 2. Данные RAPD и ISSR генотипирования сортов выявили сходную степень родства изучаемых сортов. Стержневая кластеризация в сгенерированных консенсусной (RAPD+ISSR), а также RAPD- и ISSR-дендрограммах в целом сохраняется; дендрограммы обнаруживают небольшие отличия в субкластеризации некоторых сортов.

Полученная топология сортов сирени белорусской селекции на консенсусной дендрограмме позволила выяснить их генетические взаимосвязи, сопоставив с имеющейся информацией о сортах, использованных в качестве родительских форм при их создании [1]. Так, на консенсусной дендрограмме четко выделяется кластер «SHF», в который объединены 6 сортов сирени белорусской селекции, в процессе селекции которых был использован сорт Гиацинтовая (*S. × hyacinthiflora*) — гибрид видов *S. vulgaris* × *S. oblata*. Данный кластер подразделяется на два субкластера, каждый из которых включает по три сорта сирени белорусской селекции, полученные при скрещивании сортов Гиацинтовая и Реомюр (*S. vulgaris*) (субкластер «REO»), а также 'Гиацинтовая' и 'Людвиг Шпет' (*S. vulgaris*) (субкластер «LSP»). При этом в каждом из этих субкластеров располагался соответствующий родительский сорт: 'Реомюр' — в «REO», а 'Людвиг Шпет' — в «LSP». Остальные 7 сортов сирени белорусской селекции были получены путем скрещивания сортов Абель Шатане (*S. vulgaris*) и Реомюр. Данные сорта распределены в группе «ASH», характеризующейся сложной внутренней кластеризацией. Следует отметить, что родительский сорт Абель Шатане также кластеризуется в этой группе. По топологии ветвей в данной группе видно, что сорта их формирующие, несмотря на общие родительские формы, характеризуются довольно высоким генетическим разнообразием. Такая топология позволяет, например, предположить, что в геноме сортов Защитникам Бреста и Минчанка, преобладает генетический материал родительского сорта Реомюр, в отличие от других сортов белорусской селекции из этой группы, и наоборот, в генотипе сорта 'Хорошее Настроение' большой вклад имеет родительский 'Абель Шатане'. В целом, полученные данные согласуются с информацией о происхождении сортов. Для более строгих выводов и создания «масштабной сетки» для расчета вклада родительских форм, необходимо вовлечение большего числа сортов и исходных генотипов, например 'Гиацинтовая' (*S. × hyacinthiflora*), видов *S. vulgaris* и *S. oblata*.

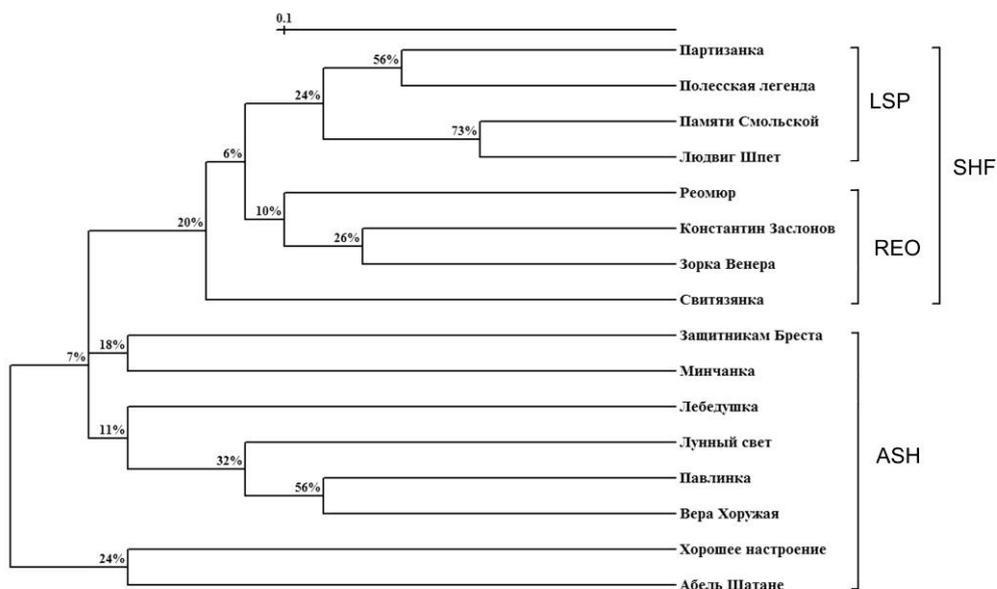


Рис. 2 Консенсусная RAPD+ISSR дендрограмма, отражающая степень генетического сходства между сортами сирени белорусской селекции на основе 40 RAPD и 36 ISSR маркеров, сгенерированных праймерами OPA-18, OPE-02 и OPP-09, UBC-808 и UBC-862. Величины bootstrap (100 реплик) указаны около соответствующего узла (%)
Обозначения кластеров: SHF — Гиацинтовая; REO — Гиацинтовая × Реомюр; LSP — Гиацинтовая × Людвиг Шпет; ASH — Абель Шатане × Реомюр

Выводы

Применение разработанной методики комплексного RAPD+ISSR-генотипирования *Syringa vulgaris* L. на внутривидовом уровне позволило дифференцировать и сертифицировать все исследованные генотипы сирени белорусской селекции коллекции ЦБС НАН Беларуси, разработать генотипические сертификаты, подтвердить данные о родословной сортов, уточнить филогенетические связи между ними. Разработанный метод является эффективным для отбора образцов, контроля сортовой чистоты при размножении сортов, формирования и проведения генетической верификации образцов коллекции *in vitro*. Разработанные маркеры являются основой проведения дальнейшей селекции культуры на ценные признаки.

Список литературы

1. Бибилова В.Ф. и др. Деревья и кустарники, розы и сирень. Краткие итоги интродукции: монография / ред.: Н. В. Смольский; Академия наук БССР, Центральный ботанический сад. – Минск: Наука и техника, 1968. – 384 с.
2. Мельникова Н.В., Борхерт Е.В., Мартынов С.П., Окунева И.Б., Молканова О.И., Упелник В.П., Кудрявцев А.М. Использование молекулярно-генетических маркеров для верификации коллекций *in vitro* сирени обыкновенной (*Syringa vulgaris* L.) // Генетика. – Т. 45, № 1. – 2009. – С. 97–103.
3. Молканова О.И., Зинина Ю.М., Македонская Н.В., Брель Н.Г., Фоменко Т.И., Спиридович Е.В. Разработка биотехнологических приемов размножения сирени обыкновенной // Физиол. и биохим. культур. растений. – 2010. – Т. 42., №2. – С. 117–124.
4. Молканова, О.И., Спиридович Е.В., Коновалова Л.Н., Брель Н.Г., Зинина Ю.М., Решетников В.Н. Комплексное изучение видов и сортов рода *Syringa* L. в ГБС РАН и ЦБС НАН Беларуси // Вестник Удмуртского университета. – Выпуск 2. – С. 66–75.
5. Решетников В.Н., Спиридович Е.В., Македонская Н.В., Чижики О.В., Антипова Т.В., Брель Н.Г., Баранов О.Ю. Сохранение и изучение генофонда сирени в ЦБС НАН Беларуси // Проблемы лесоведения и лесоводства: сборник научных трудов. – Гомель, 2007. – Вып. 67. – С. 238–245.

6. Решетников В.Н., Спиридович Е.В., Чижик О.В., Антипова Т.В., Зубарев А.В., Гаранович И.М., Македонская Н.В. Обогащение, сохранение и изучение генофонда сирени в ЦБС НАН Беларуси // 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 г.). – Минск, 2005. – С. 250–254.

7. Спиридович Е.В., Власова А.Б., Шабуня П.С. Коллекция сирени Центрального ботанического сада НАН Беларуси и селекция некоторых сортов на основе белковых маркеров // Генетика и селекция в XXI веке: матер. VIII съезда БОГИС (Минск, 23–25 июля 2002 г.). – Минск, 2002. – С. 151–152.

8. Спиридович Е.В., Гончарова Л.В., Чижик О.В., Власова А.Б., Зубарев А.В. Разработка молекулярно-биологических и Биохимических подходов паспортизации уникальных коллекций растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси // Материалы II Респ. науч.-практ. конф. (Минск, 20–22 ноября, 2003 г.). – Минск, 2003. – С. 120–126.

9. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from plant tissue / Focus. – V. 12. – 1990. – P. 13–15.

10. Juntheikki-Palovaara I., Antonius K., Lindén L., Korpelainen H. Microsatellite markers for common lilac (*Syringa vulgaris* L.) // Plant Genetic Resources. – 2013, 11(03). – P. 279–282.

11. 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.

12. 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.

13. Lilacs: a gardener's encyclopedia. By John L. Fiala, Freek Vrugtman // Timber Press, Jul 18, 2008. – Gardening. 416 p.

14. Moose S.P., Mumm R.H.. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement // Plant physiology. – 2008, 147(3). – P. 969–977.

15. Popowich E.A., Filipenya V.L. Features of micropropagation of *Syringa vulgaris* L. // Scientific works of the Lithuanian Institute of horticulture and Lithuanian university of agriculture. Horticulture and vegetable growing. Horticulture. – 2000. – V. 19(3). – P. 434–440.

16. Rao V.R., Hodgkin T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources // Plant cell, tissue and organ culture. – 2002, 68(1). – P. 1–19.

17. Rao N.K. Plant conservation biotechnology // Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of biotechnology. – 2004, 3(2). – P. 136–145.

Spiridovich E.V., Vlasova A.B., Yukhimuk A.N., Reshetnikov V.N. Assessment of genetic divergence of lilac (*Syringa* L.) cultivars of Belarusian selection based on integrated application of RAPD- and ISSR-markers // Works of the State Nikit. Botan. Gard. – 2014. – V. 139 – P. 200 – 207.

An integrated approach of RAPD+ISSR molecular certification of lilacs cultivars of Belarusian selection (CBG NASB) was developed and applied aimed at verification of genotypes identity at propagation, collections maintenance and unique genotypes conservation. Generated in total 93 RAPD and 67 ISSR markers (including cultivar-specific) allowed to differentiate 13 studied genotypes, create genetic certificates for each of them, calculate the degree of genetic relationship and clarify the phylogenetic relationships between cultivars. Proposed method of DNA-passportization of *Syringa vulgaris* cultivars is an effective tool to study the genetic diversity and molecular certification of cultivated lilacs forms, verification of collection banks when depositing in vitro.

Key words: *Syringa vulgaris* L., lilac cultivars, certification molecular markers, RAPD-, ISSR-loci, genetic distance, in vitro collection, genetic diversity, conservation