ТРУДЫ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОГО
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО
ИНСТИТУТА ЛЕСНОГО ХОЗЯЙСТВА

www.journal.spb-niilh.ru
ISSN 2079-6080

DOI 10.21178/2079–6080.2024.4.18
УДК 577.2.08

Эффективность выделения ДНК из органов и тканей дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) и березы повислой (*Betula pendula* Roth) различными методами

© И.В. Ромашкина[1,2], Е.В. Селиванова[2,3], А.А. Попова[4], В.Г. Лебедев[2], К.А. Шестибратов[2]

The extraction of DNA efficiency of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) and silver birch (*Betula pendula* Roth.) organs and tissues using different methods

I.V. Romashkina, E.V. Selivanova, A.A. Popova, V.G. Lebedev, K.A. Shestibratov (All-Russian Research Institute for Silviculture and Mechanization of Forestry, The Branch of the M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino Branch of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Russian Biotechnological University (BIOTECH University)", Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Voronezh State University of Forestry and Technologies named after G.F. Morozov»)

Depending on the objectives of the study using molecular genetic methods of analysis, the first stage of the work is the selection of an effective protocol for DNA extraction. In the case of woody plants, the task is complicated by the presence of secondary substances in the organs and tissues, which not only complicate the production of pure DNA preparations, but also subsequently inhibit the polymerase chain reaction. The article presents the results of the efficiency of DNA extraction from organs and tissues of common oak and silver birch using different methods. The presence of DNA were checked using horizontal electrophoresis, measurements of the quantity and quality of DNA on a spectrophotometer, and a polymerase chain reaction was performed using three microsatellite primers. The amplification results were assessed using fragment analysis. It was found that if it's possible to use fresh leaves for DNA extraction it is possible to use the classic CTAB method, but with the addition of 7 % PVP. In the case of herbarium leaf and trunk phloem for DNA extraction, then it is advisable to use the two-stage CTAB method with modifications (adding 0.2 % -mercaptoetanol and 7 % PVP, long-term incubation, introducing additional stages of DNA re-precipitation and purification). So, despite the complexity of the implementation, multi-stage nature, the use of a large number of solutions during the extraction, the two-stage CTAB protocol with modifications is the most effective for obtaining DNA of the appropriate quality for further genetic studies.

Key words: pedunculate oak, silver birch, DNA extraction, CTAB methods

Эффективность выделения ДНК из органов и тканей дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) и березы повислой (*Betula pendula* Roth.) различными методами

И.В. Ромашкина, Е.В. Селиванова, А.А. Попова, В.Г. Лебедев, К.А. Шестибратов

В зависимости от целей исследования с применением молекулярно-генетических методов анализа первым этапом работы является подбор эффективного протокола выделения ДНК. В случае с древесными растениями задача осложняется в связи с содержанием в органах и тканях веществ вторичной природы, таких как дубильные вещества и флавоноиды, которые не только затрудняют получение чистых препаратов ДНК, но и в последствии ингибируют проведение полимеразной цепной реакции. В статье представлены результаты эффективности выделения ДНК из органов и тканей дуба черешчатого и березы повислой разными методами. Присутствие тотальной ДНК проверяли с помощью горизонтального электрофореза, измерений количества и качества ДНК на спектрофотометре, а также проводили полимеразную цепную реакцию по трем микросателлитным праймерам. Результаты амплификации оценивали с помощью фрагментного анализа. Установлено, что при выделении ДНК из свежих листьев можно использовать классический метод CTAB, но с добавлением 7 % ПВП. В случае использования гербарных листьев и флоэмы ствола для выделения ДНК целесообразно использовать двухэтапный метод CTAB с модификациями (добавление 0,2 % меркаптоэтанола и 7 % ПВП, длительная инкубация, введение дополнительных стадий переосаждения и очистки ДНК). Таким образом, несмотря на сложность реализации, многоэтапность, использование большого количества растворов при выделении, двухэтапный протокол CTAB с модификациями является наиболее эффективным для получения ДНК соответствующего качества из гербарного материала и тканей ствола древесных растений для дальнейших генетических исследований.

Ключевые слова: *д*уб черешчатый, береза повислая, выделение ДНК, CTAB-методы

Ромашкина Ирина Владимировна – вед. науч. сотр. ФБУ ВНИИЛМ, науч. сотр. группы лесной биотехнологии ФИБХ РАН, канд. биол. наук
E-mail: densiflora@mail.ru

Селиванова Екатерина Викторовна – инженер-исследователь группы лесной биотехнологии ФИБХ РАН, магистрант Пущинского филиала Российского биотехнологического университета
E-mail: ellesmera.alagesia@gmail.com

Попова Анна Александровна – и. о. зав. каф. Лесной генетики, биотехнологии и физиологии растений ВГЛТУ, д-р с-х. наук
E-mail: logachevaaa@rambler.ru

Лебедев Вадим Георгиевич – старший науч. сотр. группы лесной биотехнологии ФИБХ РАН, канд. биол. наук
E-mail: vglebedev@mail.ru

Шестибратов Константин Александрович – руководитель группы лесной биотехнологии ФИБХ РАН, старший науч. сотр., канд. биол. наук
E-mail: schestibratov.k@yandex.ru

[1]Филиал ГНЦ ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук
142290, Московская обл., г. Пущино, проспект Науки, д. 6
Телефон: +7 (496) 773-17-19

[2]ФБУ Всероссийский научно-исследовательский институт лесоводства и механизации лесного хозяйства
141202, Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская, д. 15
Телефон: +7 (495) 993-30-54

[3]Пущинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»
142290, Московская обл., г. Пущино, проспект Науки, д. 3
Телефон: +7 (496) 773-18-57

[4]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный лесотехнический университет имени Г.Ф. Морозова»
394087, Воронежская область, г. Воронеж, ул. Тимирязева, д. 8
Телефон: +7 (473) 253-84-11

Введение

В настоящее время трудно представить осуществление задач лесной селекции без применения молекулярно-генетических методов. Организация таких исследований по выявлению и локализации наиболее важных генов, коррелирующих с хозяйственно ценными признаками древесных пород, является одним из приоритетных направлений развития лесной селекции [8]. Для ускорения селекционного процесса путем применения маркер-опосредованной селекции (MAS) с помощью генов, связанных с целевыми количественными признаками, требуется изучение генетического потенциала перспективных генотипов [7].

На первом этапе осуществления такой работы необходимо получение высококачественного и чистого препарата ДНК. Однако до сих пор отсутствует единый, унифицированный, четко работающий протокол выделения ДНК из различных органов и тканей древесных пород. Ряд публикаций последних лет в период с 2021 г. на эту тему [1, 3, 6] показывают актуальность поиска модификаций существующих методов, в том числе подбора отечественных коммерческих наборов, обладающих рядом преимуществ для исследователей (скорость выполнения протокола, отсутствие в составе токсичных органических растворителей, таких как фенол, хлороформ, изоамиловый спирт).

Сложности получения качественной ДНК из органов и тканей дуба и березы связаны с большим содержанием в них вторичных метаболитов, например, в дубе концентрация дубильных веществ пирогалловой группы достигает 20 %, эллаговой и галловой кислоты – 1,6 %, пектина – 6 %, также присутствуют флобафен, флавоноиды: кверцетин, лейкоцианидины, цианидины; тритерпеноиды, катехины и фенолы: резорцин, пирогаллол; пентозаны [4]. В различных органах и тканях березы содержатся пентациклические тритерпеноиды и флавоноиды различной природы [2, 5]. Присутствие данных веществ затрудняет не только получение чистых препаратов ДНК, но и в последствии ингибирует проведение полимеразной цепной реакции.

В связи с этим целью исследования являлось сравнение эффективности выделения ДНК из различных органов и тканей дуба и березы с помощью коммерческих наборов реагентов отечественного производства и CTAB-методами с модификациями.

Объекты и методы исследования

Образцы листьев, камбия и луба ствола были получены с деревьев дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) и березы повислой (*Betula pendula* Roth), произрастающих на территории опытно-производственных селекционно-семеноводческих объектов Воронежской области.

Выделение тотальной ДНК осуществляли при помощи двух коммерческих наборов отечественного производства компании «Синтол» – «ГМО-МагноСорб» и «ФитоСорб-П» с использованием магнитных частиц, а также тремя способами на основе классического CTAB-метода с модификациями.

Выделение ДНК при помощи магнитных частиц основано на сорбции ДНК на покрытых силикагелем магнитных частицах с последующим осаждением преципитирующим реагентом. Далее образец промывают от нежелательных примесей и ДНК элюируют в специальный буфер. Кроме того, в состав набора «ГМО-МагноСорб», помимо магнитных частиц, входит реактив протеиназа K, который позволяет очищать препараты нуклеиновых кислот от белковых примесей и инактивировать нуклеазы (РНКазы и ДНКазы), которые могут привести к деградации нуклеиновых кислот во время выделения. Набор реагентов «ФитоСорб-П» для выделения ДНК из растительного материала на магнитных частицах отличается также наличием специальных пробирок, подходящих для гомогенизаторов стандартного образца, что обеспечивает наиболее полную гомогенизацию образцов и препятствует контаминации.

Выделение ДНК из растительного материала на магнитных частицах с помощью наборов реагентов «ГМО-МагноСорб» и «ФитоСорб-П» (ООО «Синтол», Россия) проводилась в соответствии с инструкциями производителя.

Выделение ДНК с использованием CTAB-буфера осуществляли следующими способами:

Укороченный CTAB-метод: 3 % CTAB,

однодневный цикл выделения [9], который включает в себя следующие стадии:

1. Образцы хвои и луба гомогенизировали путем растирания в ступках с 1000 мкл 3 % СТАВ-буфера. Состав СТАВ-буфера: 3 % СТАВ, 1,4 М NaCl, 0,2 % 2-меркаптоэтанол, 20 мМ ЭДТА, 100 мМ Tris-HCl (pH 8,0).

2. Гомогенизированные образцы переносят в стерильные пробирки (объем – 1,5–2 мл). После тщательного встряхивания пробирки помещают для инкубации в термостат при 65 °С на 1 час.

3. После инкубации в термостате пробирки охлаждают при комнатной температуре в течение 15 минут, далее в каждую пробирку добавляют по 1000 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта (24:1) и перемешивают в течение 5 минут.

4. Затем проводят центрифугирование при 13 тыс. об/мин в течение 5 минут.

5. Образовавшийся супернатант переносят в новые стерильные пробирки (объем – 1,5 мл) и добавляют по 400–600 мкл изопропилового спирта для осаждения. Длительность осаждения – 30 минут.

6. Далее проводят центрифугирование при 13 тыс. об/мин в течение 7 минут. После центрифугирования супернатант сливают и образовавшийся осадок ДНК очищают от остатков хлороформа и изопропилового спирта добавлением по 1000 мкл 95 % этилового спирта и перемешиванием на вихревом смесителе с последующим центрифугированием при максимальных оборотах в течение 3 минут. Спирт осторожно отбирают, и такая процедура очистки этиловым спиртом проводится еще раз.

7. Полученный осадок ДНК высушивают от остатков спирта и растворяют в 40 мкл деонизированной воды.

Классический СТАВ-метод: 2 % СТАВ-буфер, двухдневный цикл выделения, добавление в лизирующий буфер 0,2 % *b*-меркаптоэтанола [11]. Меркаптоэтанол разрушает дисульфидные мостики, в том числе и в белках, с нарушением их третичной и четвертичной структуры, и действует как биологический антиоксидант, ингибируя окислительные процессы, которые напрямую или косвенно повреждают ДНК.

1. Образцы листьев и луба измельчают в присутствии жидкого азота и 40 мг ПВП (поливинилпирролидон).

2. Отбирают 70 мг гомогенизированной ткани и добавляют 800 мкл предварительно нагретого буфера для экстракции, энергично перемешивают и нагревают при температуре 65 °С в течение 60 минут в твердотельном термостате. Пробирки, содержащие экстракт, осторожно перемешивают каждые 10 минут, затем образцы выдерживают при комнатной температуре в течение 10 минут для охлаждения.

Буфер для экстракции содержит: 1M Tris-HCl, 0,5M EDTA, 5M NaCl, 2 % CTAB, 0,2 % ß-mercaptoetanol при pH 8,0.

3. После охлаждения добавляют 450 мкл смеси хлороформ: изоамиловый спирт (24:1) и осторожно перемешивают в течение 10 минут, а затем центрифугируют при 3000 об/мин (~ 1200 г) в течение 10 минут.

4. Супернатант собирают и переносят в новую пробирку, содержащую 1 мл хлороформ: изоамиловый спирт (24:1), осторожно гомогенизируют и затем центрифугируют при 13 000 об/мин (~ 22 700 g) в течение 15 минут.

5. Супернатант снова собирают и переносят в новую пробирку, а затем добавляют 150 мкл 10 мМ ацетата аммония и 750 мкл охлажденного изопропанола. Смесь осторожно гомогенизируют и инкубируют в течение ночи при –20 °С. После этого образцы центрифугируют при 13 000 об/мин при температуре 4 °С в течение 30 минут.

6. Супернатант удаляют, а осадок на дне пробирок емкостью 1,5 мл дважды промывают в 70 % этаноле и подсушивают на воздухе перед ресуспендированием в 200 мкл TE (10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА).

Двухстадийный СТАВ-метод [12] с модификациями: добавление 0,2 % ß-mercaptoetanol и 7 % PVP (поливинипирролидона, используемого как абсорбента ПЦР-ингибирующих веществ, таких как полифенолы), длительное инкубирование, введение дополнительных стадий переосаждения и очистки ДНК.

В процессе выделения ДНК используются следующие растворы: 2 % СТАВ-буфер, 5 % СТАВ-буфер, буфер для преципитации и HS-TE-буфер.

1. Образец растирают в ступке с жидким азотом до состояния пудры, которую переносят в предварительно прогретую до 65 °С пробирку с 2 % СТАВ (из расчёта 25 мл 2 % СТАВ на 2–5 г ткани); очень хорошо и быстро перемешивают содержимое.

2. Инкубирование проводят при 65 °С минимум 2–3 часа, можно и дольше.

3. После охлаждения пробирок до комнатной температуры добавляют равный объём хлороформа: изоамилового спирта (24:1), перемешивают на ротаторе 20 минут при комнатной темепературе.

4. Далее проводят центрифугирование 10 минут при комнатной темепературе (5 тыс. об/мин).

5. Супернатант собирают в чистые пробирки, добавляют 0,2 объема 5 % CTAB, перемешивают переворачиванием и инкубируют при 65 °С 10 минут.

6. Добавляют равный объём смеси хлороформ: изоамиловый спирт (24:1), перемешивают на ротаторе 10 минут при комнатной температуре;

7. Проводят центрифугирование 10 минут при комнатной темепературе (5 тыс. об/мин).

8. Если раствор мутный или большая интерфаза – экстракцию хлороформом и изоамиловым спиртом повторяют (пункты 6 и 7).

9. Супернатант отбирают, добавляют равный объём буфера для преципитации (можно и 2–3 объёма), перемешивают и оставляют на ночь при комнатной температуре.

10. Осаждение ДНК проводят центрифугированием в течение 20–30 минут при комнатной температуре (10 тыс. об/мин).

11. Супернатант убирают, осадок растворяют в 1 мл буфера HS-TE, предварительно нагревают при 65 °С.

12. Добавляют 2 объема EtOH (абс.), оставляют на 1–2 часа при –20 °С или 30 минут при –70 °С.

13. Проводят центрифугирование 10 минут при 4 °С (10 тыс. об/мин).

14. Супернатант убирают, к осадку добавляют 200 μl дистиллированной H_2O, перемешивают до растворения осадка. Далее добавляют 100 μl 7,5 М NH4Ac (pH 7,5).

15. Помещают в ледяную баню (0 °С) на 20 минут.

16. Далее центрифугируют 10 минут при 4 °С (13 тыс. об/мин).

17. К супернатанту добавляют 2V EtOH (абс.) и помещают на 20 минут при –70 °С или на 1–2 часа при –20 °С (можно оставить на ночь).

18. Центрифугируют 10 минут при 4 °С (13 тыс. об/мин);

19. Осадок сполоснуть 80% EtOH;

20. ДНК растворить в ТЕ-буфере или mqH_2O.

Для проверки качества ДНК аликвоту 5 мкл образца ДНК смешивали с 1 мкл загрузочного буфера (30 % глицерин, 0,2 % бромфеноловый синий, 10 мТрис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА), после чего загружали в 0,7 % агарозный гель (0,2 мкг/мл бромистого этидия), а затем проводили электрофорез при 100 мВ в течение 30 минут в буфере TBE 1X.

Количественный анализ осуществляли на спектрофотометре Nanophotometr P330 (Implen). Помимо концентрации ДНК измеряли чистоту препаратов ДНК по показателям отношения между оптической плотностью A260/A280 (для чистых препаратов оптимальный диапазон составляет 1,8–2,2), а также 260/230 (1,9–2,2 соответственно).

ПЦР-реакцию проводили по трем микросателлитным праймерам, видоспецифичным для видов р. *Querqus*, характеристики которых приведены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика микросателлитных локусов для постановки ПЦР с полученными образцами ДНК

Локус	Последовательность	Размер аллелей, п. н.	t плавления, °С
ssrQrZAG 7 [10]	F: CAACTTGGTGTTCGGATCAA R: GTGCATTTCTTTTATAGCATTCAC	115–153	50
ssrQpZAG 9 [13]	F: GCAATTACAGGCTAGGCTGG R: GTCTGGACCTAGCCCTCATG	180–210	50
ssrQpZAG 36 [13]	F: GATCAAAATTTGGAATATTAAGAGAG R: ACTGTGGTGGTGAGTCTAACATGTAG	210–240	50

Состав реакционной смеси для проведения ПЦР включал в себя 17 мкл mqH_2O, 5 мкл готовой реакционной смеси для ПЦР 5X ScreenMix (производство ООО «Евроген»), по 1 мкл прямого и обратного праймеров (10 мМ), 1 мкл ДНК (20 нг/мкл). Фрагментный анализ осуществляли при помощи генетического анализатора ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems). Статистическую обработку данных осуществляли при помощи программ Microsoft Excel и STATISTICA 6.0

Результаты и их обсуждение

Классические CTAB-методы для выделения ДНК, как правило, хорошо применимы для листьев древесных растений, особенно если используется свежий материал (рис. 1, табл. 2). Однако, если требуется провести генетические исследования 50–60-летних культур, то в связи с невозможностью собрать листья, приходится использовать ткани ствола (луб, камбий) для выделения ДНК.

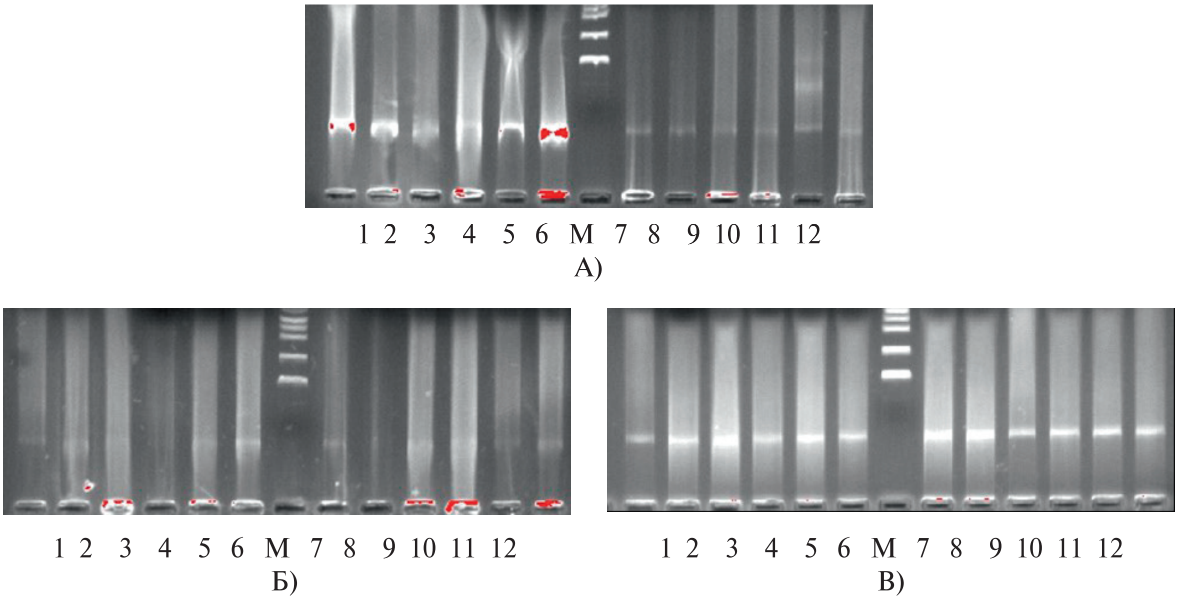


Рис. 1. Электрофореграммы общей ДНК образцов листьев дуба: А) выделение с использованием укороченного CTAB-метода; Б) выделение с использованием классического CTAB-метода; В) выделение двухстадийным CTAB-методом с модификациями

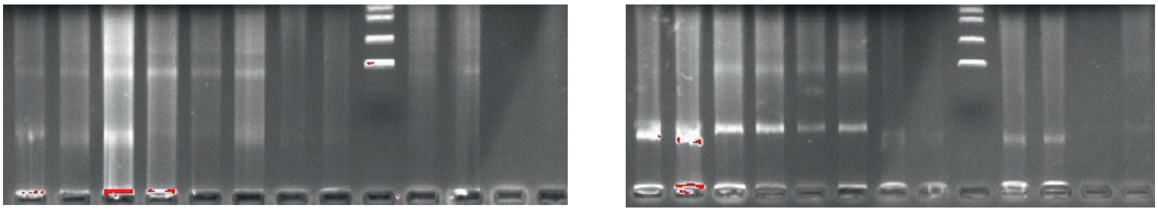
Таблица 2

Количественные характеристики полученных препаратов ДНК, выделенных из листьев дуба CTAB-методами

Метод выделения ДНК с использованием CTAB-буфера	Концентрация ДНК, нг/мкл	A260/A280 (1,8–2,2)
Укороченный	887,6 ± 151,21	*1,76* ± 0,004
Классический	590,2 ± 54,34	1,96 ± 0,003
Двухстадийный с модификациями	835,4 ± 38,33	1,94 ± 0,003

Примечание. Курсивом обозначены значения соотношений оптической плотности препаратов, ниже минимального значения, пригодного для дальнейших генетических исследований

На рисунке 2 приведены электрофореграммы общей ДНК, выделенной из листьев и ткани луба ствола дуба и березы СТАВ-методами, на котором видно, что ДНК из луба ствола выделяется хуже, чем из листьев. Количественные характеристики полученных препаратов ДНК приведены в таблице 3.



1 2 3 4 5 6 7 8 M 9 10 11 12
А)

1 2 3 4 5 6 7 8 M 9 10 11 12
Б)

Рис. 2. Электрофореграммы общей ДНК образцов листьев и луба дуба черешчатого и березы повислой: А) выделение с использованием классического СТАВ-метода; Б) выделение двухстадийным СТАВ-методом с модификациями: 1—2 — гербарные листья дуба, 3—4 свежие листья дуба, 5—6 — луб ствола дуба; 7—8 — гербарные листья березы, 9—10 — свежие листья березы, 11—12 — луб ствола березы, М — маркер молекулярного веса

Таблица 3

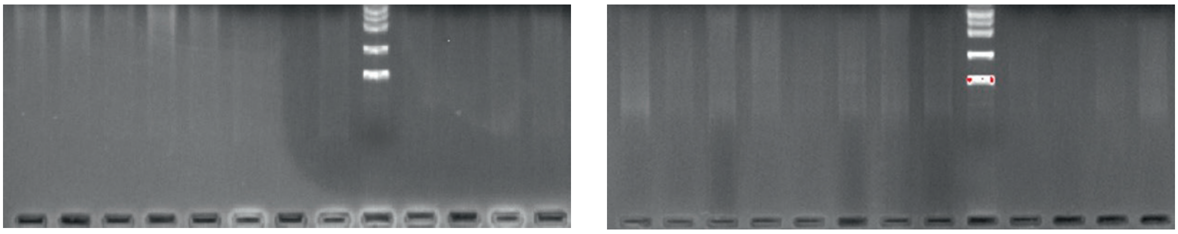
Количественные характеристики полученных препаратов ДНК, выделенных из листьев и луба ствола дуба и березы СТАВ-методами

Образец, порода	Концентрация ДНК, нг/мкл	A260/A280 (1,8–2,2)	A260/A230 (1,9–2,2)
Классический СТАВ-метод			
Дуб			
Гербарные листья	483,5 ± 39,32	2,00 ± 0,004	2,01 ± 0,003
Свежие листья	слишком высокие значения	-	-
Луб ствола	216,2 ± 15,44	1,91 ± 0,006	*1,15* ± 0,003
Береза			
Гербарные листья	106,1 ± 18,02	1,82 ± 0,008	*0,90* ± 0,002
Свежие листья	376,5 ± 89,01	2,10 ± 0,005	1,91 ± 0,003
Луб ствола	61,8 ± 14,77	2,20 ± 0,002	*1,74* ± 0,005
Двухстадийный СТАВ-метод с модификациями			
Дуб			
Гербарные листья	136,0 ± 1,22	1,85 ± 0,006	2,96 ± 0,012
Свежие листья	256,7 ± 29,68	2,10 ± 0,002	2,29 ± 0,003
Луб ствола	109,1 ± 28,56	1,81 ± 0,002	2,66* ± 0,008
Береза			
Гербарные листья	53,8 ± 2,24	1,89 ± 0,002	3,15 *± 0,005
Свежие листья	149,0 ± 12,61	1,83 ± 0,007	2,16 ± 0,016
Луб ствола	34,0 ± 1,18	1,85 ± 0,004	3,33* ± 0,015

Примечания. Курсивом обозначены значения соотношений оптической плотности препаратов, ниже минимального значения, пригодного для дальнейших генетических исследований; * – различия статистически достоверны ($P \leq 0,05$)

Отношение оптических плотностей, измеренных на длинах волн 260 и 230 нм (A260/A230), показывает уровень загрязнения препарата ДНК полисахаридами и полифенолами, а их отношение при 260 и 280 нм (A260/A280) – загрязнение образца белками. Препараты ДНК, полученные с использованием классического CTAB-метода по соотношению A260/A280 удовлетворяют требованиям по качеству для всех исследуемых образцов дуба и березы, тогда как соотношение A260/A230 меньше 1,9 указывает на значительное присутствие полифенолов, способных ингибировать ПЦР-реакцию. Применение двухстадийного CTAB-метода с модификациями позволяет получить препараты ДНК лучшего качества, в особенности в случае применения в качестве исходной растительной ткани для выделения ДНК луба ствола.

Выделение ДНК из луба ствола коммерческими наборами отечественного производства не дало удовлетворительных результатов (рис. 3, табл. 4). Укороченным CTAB-методом ДНК получается в большом количестве, но качество при этом оказывается не подходящим для проведения ПЦР.



1 2 3 4 5 6 7 8 M 9 10 11 12
А)

1 2 3 4 5 6 7 8 M 9 10 11 12
Б)

Рис. 3. Электрофореграммы образцов ДНК, выделенных: А) коммерческим набором «ГМО-МагноСорб», Б) коммерческим набором «ФитоСорб»: 1–12 – образцы ДНК луба ствола дуба черешчатого, М – маркер молекулярного веса

Таблица 4

Количественные характеристики полученных препаратов ДНК, выделенных из луба ствола дуба черешчатого

Способ выделения ДНК	Концентрация ДНК, нг/мкл	A260/A280
Коммерческие наборы		
«ГМО-МагноСорб»	123 ± 9,2	1,38 ± 0, 066
«ФитоСорб-П»	207 ± 28,4	1,43 ± 0,028
CTAB-метод		
Укороченный	897 ± 162,9	1,76 ± 0,081
Классический	199 ± 13,2	1,87 ± 0,033
Двухстадийный с модификациями	195 ± 19,4	2,35 ± 0,038

Результаты фрагментного анализа проведенных ПЦР-анализов подтвердили предварительные выводы о применимости различных методов выделения ДНК для генетических исследований (табл. 5).

Таблица 5

Результаты фрагментного анализа проведенных ПЦР-анализов

Исходная ДНК	Qr-7	Qp-9	Qp-36
Гербарные листья			
«ГМО-МагноСорб»	-	-	-
«ФитоСорб-П»	-	-	-
Укороченный CTAB-метод	-	-	-
Классический CTAB-метод	+ (6)	+ (9)	-
Двухстадийный с модификациями	+ (10)	+ (10)	+ (5)
Свежие листья			
«ГМО-МагноСорб»	-	-	-
«ФитоСорб-П»	-	-	-
Укороченный CTAB-метод	+ (6)	- (9)	-
Классический CTAB-метод	+ (9)	+ (13)	+ (6)
Двухстадийный с модификациями	+ (9)	+ (13)	+ (6)
Луб ствола			
«ГМО-МагноСорб»	-	-	-
«ФитоСорб-П»	-	-	-
Укороченный CTAB-метод	-	-	-
Классический CTAB-метод	+ (9)	+ (9)	-
Двухстадийный с модификациями	+ (9)	+ (10)	+ (5)

Примечание. Присутствие результатов фрагментного анализа образцов ДНК дуба, полученной разными способами, по трем микросателлитным локусам: «+» – устойчивый положительный результат, «-» – отсутствие результатов ПЦР-реакции, в скобках указано количество амплифицированных аллелей.

Все анализируемые локусы являются полиморфными [10, 13], максимальное количество амплифицируемых аллелей для гербарных листьев и луба ствола было обнаружено для препаратов ДНК, полученных с помощью двухстадийного CTAB-метода, тогда как для свежих листьев оказалось достаточно классического CTAB-метода.

Заключение

Таким образом, если для выделения ДНК есть возможность отобрать листья, то для свежего материала достаточно применить классический CTAB-метод, но с добавлением 7 % PVP. Если выделение ДНК будет проводиться из гербарного материала листьев, то желательно использовать уже двухстадийный CTAB-метод с модификациями (добавление 0,2 % ß-меркаптоэтанола и 7 % PVP, длительное инкубирование, введение дополнительных стадий переосаждения и очистки ДНК). Если требуется выделить ДНК из луба ствола, то, несмотря на сложность выполнения, многостадийность, использование большого количества растворов в ходе выполнения работы, двухстадийный протокол CTAB-метода с модификациями является наиболее эффективным для получения ДНК соответствующего качества для выполнения дальнейших генетических исследований. Данные выводы были подтверждены результатами спектрофотометрического анализа полученных препаратов ДНК, а также фрагментным анализом результатов ПЦР по трем микросателлитным праймерам.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22–64–00036 (https://rscf.ru/project/22–64–00036/).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Гусева, О.Ю. Оптимизация методики выделения ДНК из листьев дуба / О.Ю. Гусева, С.Г. Ржевский // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2021.– Т. 39, № 1–2. – С. 24.
2. Косяков, Д.С. Определение тритерпеноидов коры березы методом жидкостной тандемной хромато-масс-спектрометрии / Д.С. Косяков, Н.В. Ульяновский, Д.И. Фалев // Масс-спектрометрия. – 2013. – Т. 10, № 4. – С. 237–242.
3. Петюренко, М.Ю. Выход нуклеиновой кислоты из *Quercus robur* L. в зависимости от метода экстракции / М.Ю. Петюренко // Научные известия. – 2022. – № 29. – С. 235–237.
4. Платонов, В.В. Хромато-масс-спектрометрия коры дуба обыкновенного-черешчатого (*Quercus robur* L.; семейство буковые – *Fagaceae*) / В.В. Платонов, А.А. Хадарцев, Г.Т. Сухих, В.А. Дунаев, Д.А. Мелякова // Вестник новых медицинских технологий. [Электронное издание]. – 2019. – № 1. – С. 117–133. – URL: https://cyberleninka.ru/article/n/hromato-mass-spektrometriya-kory-duba-obyknovennogo-chereshchatogo-quercus-robur-l-semeystvo-bukovye-fagaceae (дата обращения: 01.10.2024).
5. Платонов, В.В. Хромато-масс-спектрометрия спиртового экстракта почек березы повислой (*Betula pendula* Roth) / В.В. Платонов, А.А. Хадарцев, Г.Т. Сухих, В.А. Дунаев // Вестник новых медицинских технологий. [Электронное издание]. – 2018. – № 6. – С. 198–238. – URL: https://cyberleninka.ru/article/n/hromato-mass-spektrometriya-spirtovogo-ekstrakta-pochek-berezy-povisloy-betula-pendula-roth (дата обращения: 01.10.2024).
6. Попова, А.А. Подбор и оптимизация методов экстракции ДНК из различного растительного материала / А.А. Попова, Т.А. Гродецкая, В.В. Молчанов, П.М. Евлаков // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Серия: Лес. Экология. Природопользование. – 2022. – № 1 (53). – С. 69–77.
7. Ромашкина, И.В. Анализ молекулярно-генетических механизмов устойчивости березы и дуба к дефициту воды и азота / И.В. Ромашкина, Т.С. Тихомирова, К.А. Шестибратов // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. – 2024. – Вып. 241. – С. 120–141.
8. Тараканов, В.В. Лесная селекция в России: достижения, проблемы, приоритеты (обзор) / В.В. Тараканов, М.М. Паленова, О.В. Паркина, Р.В. Роговцев, Р.А. Третьякова //Лесохозяйственная информация. – 2021. – № 1. – С. 100–143.
9. Doyle, J.J. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue / J.J. Doyle // Phytochemistry Bull. – 1987. – № 19. – P. 11–15.
10. Kampfer, S. Brief report characterization of (GA)n microsatellite loci from *Quercus robur* / S. Kampfer [et al.] // Hereditas. – 1998. – V. 129, № 2. – P. 183–186.
11. Nunes, C.F. An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves / C.F. Nunes, J.L. Ferreira, M.C.N. Fernandes [et al.] // Ciência Rural. – 2011. – № 41 (8). – P. 1383–1389.
12. Rogers, S.O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / S.O. Rogers, A.J. Bendich // Plant molecular biology. – 1985. – T. 5. – C. 69–76.
13. Steinkellner, H. Conservation of (GA) an microsatellite loci between *Quercus* species / H. Steinkellner [et al.] // *Molecular Ecology*. – 1997. – V. 6, № 12. – P. 1189–1194.

REFERENCES

1. Guseva O.Yu., Rzhevsky S.G. Optimization of the method for extracting DNA from oak leaves. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology [Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya],* 2021, vol. 39, no. 1–2, p. 24. (In Russian).
2. Kosyakov D.S., Ulyanovskii N.V., Falev D.I. Determination of birch bark triterpenoids by liquid chromatograph tandem mass spectrometry. *Mass spectrometry [Mass-spektrometriya]*, 2013, vol. 10, no. 4, pp. 237–242. (In Russian).
3. Peturenko M.Yu. Yield of nucleic acid from *Quercus robur* L. depending on the extraction method. *Scientific news [Nauchnye Izvestiya]*, 2022, no. 29, pp. 235–237. (In Russian).

4. Platonov V.V., Khadartsev A.A., Sukhikh G.T., Dunaev V.A., Melyakova D.A. Chromatograph-mass spectrometry of common oak bark (*Quercus robur* L.; beech family – Fagaceae). *Bulletin of new medical technologies. Electronic publication [Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii. Ehlektronnoe izdanie]*, 2019, no. 1, pp. 117–133. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/hromato-mass-spektrometriya-kory-duba-obyknovennogo-chereshchatogo-quercus-robur-l-semeystvo-bukovye-fagaceae (date of access 01.10.2024). (In Russian).
5. Platonov V.V., Khadartsev A.A., Sukhikh G.T., Dunaev V.A. Chromatography-mass spectrometry of alcohol extract of birch buds (*Betula pendula* Roth). *Bulletin of new medical technologies. Electronic publication [Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii. Ehlektronnoe izdanie]*, 2018, no. 6. pp. 198–238. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/hromato-mass-spektrometriya-spirtovogo-ekstrakta-pochek-berezy-povisloy-betula-pendula-roth (date of access 01.10.2024). (In Russian).
6. Popova A.A., Grodetskaya T.A., Molchanov V.V., Evlakov P.M. Selection and optimization of DNA extraction methods from various plant materials. *Bulletin of the Volga State Technological University. Series: Forest. Ecology. Nature management [Vestnik Povolzhskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta. Seriya: Les. Ehkologiya. Prirodopol'zovanie*], 2022, no. 1 (53), pp. 69–77. (In Russian).
7. Romashkina I.V., Tikhomirova T.S., Shestibratov K.A. Analysis of molecular genetic mechanisms of birch and oak resistance to water and nitrogen deficiency. *Bulletin of the St. Petersburg Forest Technical Academy [Izvestiya Sankt-Peterburgskoi lesotekhnicheskoi akademii]*, 2024, iss. 241, pp. 120–141. (In Russian).
8. Tarakanov V.V. Palenova M.M., Parkina O.V., Rogovtsev R.V., Tretyakova R.A. Forest selection in Russia: achievements, problems, priorities (review). *Forestry information [Lesokhozyaistvennaya informatsiya]*, 2021, no. 1, pp. 100–143. (In Russian).
9. Doyle J.J. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemistry Bull*. – 1987, no. 19, pp. 11–15.
10. Kampfer S., Lexer C., Glössl J., Steinkellner H. Brief report characterization of (GA)n microsatellite loci from *Quercus robur*. Hereditas, 1998, vol. 129, no. 2, pp. 183–186.
11. Nunes C.F., Ferreira J.L., Fernandes M.C.N., Breves S.deS., Generoso A.L., Soares B.D.F., Dias M.S.C., Pasqual M., Borem A., Cançado G.M.deA. An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves. *Ciência Rural*, 2011, no. 41 (8), pp. 1383–1389.
12. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant molecular biology*, 1985, vol. 5, pp. 69–76.
13. Steinkellner H., Lexer C., Turetschek E., Glössl J. Conservation of (GA) an microsatellite loci between *Quercus* species. Molecular Ecology, 1997, vol. 6, no. 12, pp. 1189–1194.

Статья поступила в редакцию 11.10.2024