DOI 10.21178/2079–6080.2021.2.13
УДК 575.174.015.3:582.475

Экстракция суммарной ДНК из *Pinus sylvestris* L. при оценке полиморфизма – с использованием SSR- и RAPD-маркеров

© М.Ю. Петюренко, И.И. Камалова, А.П. Сердюкова

Extraction of total DNA from *Pinus sylvestris* L. for assessment of polymorphism – using SSR- and RAPD-markers

M.Yu. Peturenko, I.I. Kamalova, A.P. Serdyukova (All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology)

The article demonstrates the efficiency of genomic DNA extraction from the needles of *Pinus sylvestris* L. using the commercial *diaGene* kit as an alternative to the traditional method with CTAB buffer for polymorphism assessment using RAPD and SSR markers. The study included 8 samples of vegetative tissues of *Pinus sylvestris* L. from the southern border of the range in the Central Federal District (Kantemirovsky District, Voronezh Region). DNA obtained during isolation, both using the column method and using the CTAB buffer, was quantified and tested using a PCR reaction. A spectrophotometric study of the purity of the obtained samples showed that the absorption ratio at A260 /A280 for the column method was on average 1.68 versus 2.17, which indicates a higher DNA purity relative to the standard isolation method. It has been shown that the use of the CTAB-buffer protocol gives a higher yield of nucleic acid from the vegetative tissue of *Pinus sylvestris* L. compared to the commercial *diaGene* kit. Molecular genetic analysis of four EST-SSRs of nuclear microsatellite loci and two RAPD-markers in eight samples of *Pinus sylvestris* L. showed the presence of amplification products with EST-SSRs loci. All investigated DNA samples were characterized in accordance with the literature data and were reproducible for two methods of DNA extraction (the sizes of amplification fragments with EST-SSRs loci correspond to the data of the original source). It has been shown that this method of nucleic acid isolation can be used to assess the genetic variability of SSR-loci polymorphism in population and other molecular genetic studies of *Pinus sylvestris* L.

Keywords: *Pinus sylvestris* L., DNA extraction, CTAB, polymerase chain reaction (PCR), microsatellite loci, SSR-markers, RAPD-primer

Экстракция суммарной ДНК из *Pinus sylvestris* L. при оценке полиморфизма — с использованием SSR- и RAPD-маркеров

М.Ю. Петюренко, И.И. Камалова, А.П. Сердюкова

В статье показана эффективность экстракции геномной ДНК из хвои *Pinus sylvestris* L. с использованием коммерческого набора *diaGene* как альтернативы традиционного метода со СТАВ-буфером для оценки полиморфизма с использованием RAPD- и SSR-маркеров. В исследование были включены 8 образцов вегетативных тканей *Pinus sylvestris* L. с южной границы ареала в ЦФО (Кантемировский р-н Воронежской обл.). ДНК, полученная при выделении, как с помощью колоночного метода, так и с помощью СТАВ-буфера, была определена количественно и протестирована с помощью ПЦР-реакции. Спектрофотометрическое исследование чистоты полученных образцов показало, что соотношение поглощения при A260/A280 для колоночного метода было равно в среднем 1,68 против 2,17, что свидетельствует о более высокой чистоте ДНК относительно стандартного метода выделения. Показано, что использование протокола со СТАВ-буфером даёт более высокий выход нуклеиновой кислоты из вегетативной ткани *Pinus sylvestris* L. по сравнению с коммерческим набором *diaGene*. Молекулярно-генетический анализ четырёх EST-SSRs ядерных микросателлитных локусов и двух RAPD-маркеров у восьми образцов *Pinus sylvestris* L. показал наличие продуктов амплификации с EST-SSRs локусами. Все исследованные образцы ДНК характеризовались в соответствии с литературными данными и были воспроизводимы для двух методик выделения ДНК (размеры фрагментов амплификации с EST-SSRs локусами соответствуют данным оригинального источника). Показано, что колоночный способ выделения нуклеиновой кислоты может быть использован при оценке генетической изменчивости SSR-локусов в популяционных и других молекулярно-генетических исследованиях *Pinus sylvestris* L.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris* L., экстракция ДНК, СТАВ, полимеразная цепная реакция (ПЦР), микросателлитные локусы, SSR-маркер, RAPD-маркер

Петюренко Марта Юрьевна — канд. с.-х. наук, научный сотрудник лаборатории биохимии, молекулярной генетики и физиологии растений

E-mail: forestgenetic@mail.ru

Камалова Ирина Ивановна — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией биохимии, молекулярной генетики и физиологии растений

E-mail: kamairi@yandex.ru

Сердюкова Алина Петровна — младший научный сотрудник лаборатории экологической генетики

E-mail: ali.serdyukova@yandex.ru

ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии»

394087, Воронеж, ул. Ломоносова, 105

Тел.: 8 (473) 253-71-89

E-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

Введение

В настоящее время методы молекулярной генетики и биотехнологии все шире применяются в лесном хозяйстве для оценки состояния лесных генетических ресурсов, управления процессами лесовосстановления, фитосанитарного мониторинга лесных насаждений и питомников, получения селекционного посадочного материала. Сосна обыкновенная является одним из основных средо- и лесообразующих видов России с обширным ареалом. Имеет важное хозяйственное, экологическое, санитарное и культурное значение. Древесина сосны широко применяется в строительстве, обладает отличными физико-химическими свойствами, является источником разнообразных ценных сортиментов — таких, как пиловочник, строительные брёвна, шпальные кряжи и др. Насаждения сосны являются источником ценной недревесной продукции — живицы, продукты переработки которой используются в фармацевтической, целлюлозно-бумажной, лакокрасочной, химической, электротехнической и мыловаренной промышленности [5].

В последнее время благодаря расшифровке последовательностей ДНК и РНК с использованием «технологий нового поколения секвенирования» — «next generation sequencing technologies» в лесном хозяйстве геномные исследования получили стремительное развитие [4, 6]. У древесных видов геномный анализ на сегодняшний день позволяет обнаружить селекционно-ценные фенотипические признаки — такие, как скорость роста, качество древесины, устойчивость к заболеваниям, замерзанию, засухе и т. д. [7, 9, 11]. Кроме того, выявление генетических механизмов локальной адаптации популяций очень важно для разработки научно обоснованных лесовосстановительных программ, способствующих поддержке эволюционно сложившейся структуры и их генетического разнообразия [15].

На сегодняшний день одним из важных направлений является молекулярное маркирование с помощью изменчивых участ-

ков ДНК для целей генетической идентификации и изучения популяционно-генетической структуры с помощью высокополиморфных полиаллельных микросателлитных локусов, имеющих кодоминантное наследование — SSR (Simple Sequence Repeat). Однако для проведения таких исследований на первом этапе необходимо получить высококачественный и чистый препарат ДНК без признаков деградации и примесей.

В литературе накоплен большой материал о методах выделения нуклеиновых кислот из вегетативных тканей растений, в том числе — хвойных. Выделение ДНК из сосны — сложный процесс, так как хвоя и семена содержат много полисахаридов, которые осаждаются совместно с ДНК и таким образом могут влиять на очистку, количественное определение, амплификацию с помощью ПЦР и «переваривание» рестрикционными ферментами. Хвоя также богата фенольными соединениями, которые связываются с ДНК после лизиса клеток, препятствуя выделению ДНК высокого качества [10, 13, 16, 17]. В связи с этими особенностями различающийся состав метаболитов у представителей различных таксонов, к сожалению, не предполагает одного оптимального протокола изолирования ДНК.

Исследования российских и зарубежных ученых показали, что качество нуклеиновой кислоты зависит от того, какая часть растения используется, от возраста, доступности материала в любое время года, от условий и сроков хранения биологических образцов. Хвоя сосны обыкновенной может служить удобным источником ДНК, её достаточно легко заготовить и хранить в лабораторных условиях.

Большим минусом при выделении ДНК является использование для депротеинизации ДНК фенола, хлороформа и изоамилового спирта — это токсичные соединения, поэтому их применение становится все менее привлекательным. Коммерческие наборы для выделения ДНК не содержат фенол и хлороформ, но ограничивающим фактором выполнения анализов оказывается стоимость препаратов.

Отдельно следует обратить внимание на использование реагентов, являющихся ингибиторами ПЦР-реакции — этанола, ЭДТА, фенола, изопропанола, а также избыток KCl, NaCl и некоторых других солей, ионных детергентов, таких как, например, додецилсульфат натрия (SDS), которые должны удаляться перед амплификацией или их содержание должно быть снижено до приемлемых значений [8]. Устранение ингибирующего эффекта иногда достигается разбавлением проб, увеличением количества ДНК-полимеразы в ПЦР-реакции или использованием добавок, улучшающих амплификацию (например, бычий сывороточный альбумин), если это позволяет методика.

Таким образом, процесс выделения нуклеиновой кислоты включает три стадии: высвобождение ДНК из образца с помощью лизиса; отделение нуклеиновой кислоты от других клеточных веществ; очистку ДНК, т. е. удаление ингибиторов ПЦР-реакции.

Цель выполненной нами работы — подбор и оптимизация наиболее эффективного и нетоксичного способа получения препаратов нуклеиновых кислот из вегетативных тканей *Pinus sylvestris* L. пригодного для проведения большинства молекулярно-генетических исследований, в том числе популяционно-генетических.

Материалы и методы

Отбор вегетативного материала для исследований. Исследования были проведены на 35-летних лесных культурах сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) из степной зоны Кантемировского района Воронежской области. При отборе вегетативных частей сосны выбирали ветки без видимого повреждения грибковыми и другими заболеваниями, чтобы избежать контаминации образца. Отобранные образцы помещали в стерильный пластиковый пакет, который в тот же день доставляли в лабораторию для дальнейших исследований. Образцы хвои хранили до анализа в морозильнике при -80°C для предотвращения

возможности разрушения ДНК в процессе замораживания-оттаивания.

*Выделение суммарной ДНК из хвои *Pinus sylvestris* L.*

Метод 1. Выделение ДНК с использованием модифицированного СТАВ-буфера. Образец хвои (150 мг) подвергали гомогенизации в автоткавированной ступке с добавлением 600 мкл экстракционного буфера (2 % СТАВ, 1,4М NaCl, 0,2 % 2-меркаптоэтанол, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 1 % PVP, pH = 8,0). Полученный гомогенат переносили в пробирку типа Eppendorf объемом 2 мл и инкубировали в твердодежном термостате в течение 30 минут при $+65^{\circ}\text{C}$, затем добавляли рибонуклеазу А (Fermentas) до концентрации 0,2 мг/мл и дополнительно инкубировали при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин для разрушения геномной РНК. После этой стадии добавляли равный объем смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1) к лизату, перемешивали и центрифугировали пробу 10 минут при 8000 об/мин. Полученный супернатант переносили в новую пробирку. Промывку хлороформом проводили 2 раза для лучшей очистки ДНК. Осаждение ДНК проводили с использованием 2 объемов 96 % этанола. После инкубации в течение 1 часа при -20°C удаляли супернатант и сушили осадок ДНК в течение 10 минут. Полученный осадок нуклеиновой кислоты растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера. Хранили препарат в холодильнике при $+4^{\circ}\text{C}$, не замораживая.

Модификация заключалась в добавлении к лизирующему буферу раствора поливинилпирролидона (PVP). Добавление PVP было обосновано тем, что растительные ткани сосны и других растений характеризуются накоплением большого количества вторичных метаболитов. Содержащийся в буфере PVP, связываясь с фенолами, способствует снижению образования их комплексов с ДНК [13].

Метод 2. Выделение ДНК с использованием набора *diaGene* (Диаэм) для растительной ткани. ДНК экстрагировали из хвои в соответ-

ствии с инструкциями производителя набора. Образец ткани (150 мг) подвергали гомогенизации в автоклавированной ступке с добавлением 2 мл буфера PLB-1. Полученный гомогенат переносили в пробирку типа Eppendorf объемом 2 мл и инкубировали в термостате на 20 минут больше, чем рекомендуется в протоколе при +65 °С, исключая стадию центрифугирования супернатанта. На этой стадии добавляли рибонуклеазу А (Fermentas) до концентрации 0,2 мг/мл и проводили разрушение геномной РНК, как указано выше. Далее добавляли 700 мкл буфера PVB-1 и после перемешивания переносили 650 мкл образца в микролонку с последующим центрифугированием в течение 1 минуты при 13000 об/мин. Фильтрат удаляли. Переносили микролонку в новую пробирку для сбора фильтрата и наносили 500 мкл буфера PWB-1 с последующим центрифугированием в течение 1 минуты при 13000 об/мин. Фильтрат удаляли. Повторяли промывку осадка с 500 мкл этого же буфера. Далее наносили на колонку 650 мкл буфера PWW-1 с последующим центрифугированием в течение 1 минуты при 13000 об/мин. Фильтрат удаляли. Повторяли промывку осадка с 650 мкл этого же буфера. Центрифугировали пустую колонку 1 минуту при 13000 об/мин, чтобы удалить из нее остатки жидкости, и переносили колонку в чистую центрифужную пробирку с последующим добавлением 50 мкл деионизированной воды. Инкубацию проводили при комнатной температуре 1–3 минуты и элюировали ДНК центрифугированием в течение 1 минуты при 13000 об/мин. Полу-

ченный препарат нуклеиновой кислоты хранили в холодильнике при +4 °С, не замораживая.

Сравнительную оценку эффективности выделения ДНК из хвои по двум методикам проводили, используя электрофоретическое разделение полученных препаратов в 1,5 % агарозном геле (5 мкл аликвоты), спектрофотометрическое определение чистоты препарата ДНК по отношению поглощения при длинах волн A260/A280, количественное определение на флуориметре Qubit 2.0, а также постановку полимеразно цепной реакции.

Количественное определение нуклеиновых кислот. Количественное определение содержания ДНК в исследуемых образцах определяли на приборе Qubit 2.0 (Life Technologies) с использованием реагентов Qubit™ dsDNA BR AssayKit согласно инструкции производителя.

Полимеразная цепная реакция. Для проведения реакции использовали готовую смесь для ПЦР ScreenMix-HS (Евроген, Россия). При постановке реакции ПЦР объемом 25 мкл в смесь добавляли прямой и обратный праймер по 0,2–0,4 мкМ каждого, матрицу ДНК до 25 нг на реакцию и стерильную воду – до 25 мкл. Все ПЦР были проведены трижды для верификации воспроизводимости результатов.

В качестве сравнения двух методов выделения ДНК использовали 4 EST-SSRs локуса, представляющих транскрибируемую часть ядерной ДНК – lw_isotig00081, lw_isotig02842, lw_isotig04195, lw_isotig17679 (табл. 1) [3].

Таблица 1
Характеристика SSR-локусов сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* var. *mongolica* [3]

Локус	Мотив ¹	Размер фрагмента, п. н. ²	Ta ³ , °С
lw_isotig00081	(CCG) ₆	290	58
lw_isotig02842	(AGA) ₅	229	55
lw_isotig04195	(GAG) ₅	189	55
lw_isotig17679	(TTAA) ₅	277	55

Примечания. 1) мотив – повторяющаяся последовательность нуклеотидов; 2) п. н. – пары нуклеотидов; 3) Ta – температура отжига праймера

Процедуры амплификации проводили в соответствии с условиями, предложенными авторами, ранее работавшими с праймерами [2, 12]. В дополнение для изучения воспроизводимости амплификации продуктов, полученных при выделении ДНК разными методами, использовали в качестве одного из

традиционных способов проведение полимеразной цепной реакции со случайными праймерами длиной от 6 до 9 нуклеотидов – RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA). В работе использовали одноцепочечные RAPD-маркеры UBC-457 и UBC-157 [14] (табл. 2).

Таблица 2

Последовательность RAPD-праймеров

RAPD-маркер	Последовательность (5'–3')	Температура отжига, °С
UBC-457	5'-CGACGCCCTG-3'	34.5
UBC-157	5'-CCTCCGCAGG-3'	34.5

Условия реакции были следующие: предварительная денатурация – 5 мин при 94 °С; затем 40 циклов: 45 сек при 95 °С, 45 сек при 34,5 °С, удлинение цепи – 80 сек при 72 °С; элонгация – 15 мин при 72 °С. Охлаждение пробы – при 4 °С.

Гели в обоих случаях визуализировали в 2,5 % агарозном геле в проходящем УФ свете при $\lambda = 254$ нм. Размеры фрагментов амплифицированной ДНК определяли с использованием маркеров длин ДНК: 100 + bp DNA Ladder (Евроген, Россия).

При сравнении результатов использования разных методик выделения ДНК прово-

дили оценку на воспроизводимость результатов протестированных локусов (четкие профили амплификации, их количество, наличие димеров, наличие/отсутствие фоновой амплификации, приводящей к появлению шмеров на электрофореграмме).

Результаты и их обсуждение

Использование стандартной методики для выделения ДНК из хвои сосны с использованием СТАВ и коммерческого набора *diaGene* позволило нам получить образцы ДНК в количестве, достаточном для постановки ПЦР-анализа (рис. 1).

Рис. 1. Электрофореграмма образцов общей ДНК *Pinus sylvestris* L., выделенных с помощью набора *diaGene* (1–8) и СТАВ-метода (9–16). М – ДНК-маркер Диаэм (фрагменты 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 п. н.)

На электрофореграмме отчетливо прослеживается наличие небольшого количества примесей в образцах, выделенных с использованием СТАВ-метода. Загрязнение препарата, как правило, связано с тем, что при проведении депротеинизации с использованием хлороформ-изоамиловой смеси получается раствор с двумя фазами: водной и органической, причем все липиды и жиры находятся в органической (нижней) фазе, белки – на границе фаз, а нуклеиновые кислоты – в водной (верхней). На этом этапе часто происходит затягивание нижнего слоя, вследствие чего белковая часть попадает в препарат ДНК. Повторение дополнительной очистки с хлороформом не всегда приводит к улучшению ситуации.

Следует отметить, что в образцах сосны, обработанных с помощью коммерческого набора, примеси в виде белковой фракции практически отсутствуют. Это можно объяснить тем, что при выделении набором *diaGene* ДНК избирательно связывается с фильтром микроколоники в присутствии хаотропной соли и впоследствии отмывается от примесей и элюируется в виде чистого препарата.

На следующем этапе проводили оценку концентрации препарата ДНК, поскольку это

важный фактор, влияющий на протокол выполнения амплификации. В среднем, концентрация препарата ДНК, выделенного с помощью СТАВ-метода, колебалась в пределах от 280 до 524 нг/мкл, что в среднем в 2,4 раза превышало концентрацию ДНК, полученную с использованием набора *diaGene* (табл. 3).

Высокий выход ДНК, полученный классическим методом, отмечался ранее и в работах Е. Telfer с соавторами [18]. Учеными было показано, что модификация метода с использованием цетилтриметилбромид аммония позволяет получить на выходе концентрацию ДНК от 413 и 454 нг/мкл. Правда, такой высокий выход нуклеиновой кислоты достигался за счет применения автоматических гомогенизаторов (Geno/Grinder) и смеси этанол/ацетата натрия для преципитации белков. При этом использование коммерческих наборов давало выход нуклеиновой кислоты в разы меньше по сравнению со СТАВ-методом. При применении набора DNeasyW-96 (Qiagen) концентрация ДНК в среднем составила 35 нг/мкл (масса навески растительного материала была равна, соответственно, 50 мг).

Таблица 3

Усредненная оценка выхода ДНК и оптическая плотность образцов при разных методах экстракции ДНК

Параметры	Метод экстракции ДНК	
	Набор <i>diaGene</i>	СТАВ-метод
Концентрация нуклеиновой кислоты, нг/мкл	164,1	393,3
Оптическая плотность (OD):		
– при длине волны A260	0,045	0,087
– при длине волны A280	0,027	0,040
Соотношение поглощения при A260/A280	1,68	2,17

Таким образом, протокол СТАВ дает наибольшую концентрацию геномной ДНК, и наоборот, *diaGene* по сравнению с ним – более низкую.

Конечно, как наличие загрязняющих веществ, так и невысокий выход ДНК могут по-

влиять на производительность последующих молекулярно-генетических процедур. Поэтому характеристика только концентрации препарата нуклеиновой кислоты не должна быть единственным показателем при сравнении методов.

Спектрофотометрический количественный анализ — самый простой способ оценки концентрации ДНК, и соотношение оптической плотности при длине волны A260/A280 обычно используется для оценки чистоты образцов нуклеиновой кислоты. Процедура, вначале описанная как способ определения чистоты белка в присутствии нуклеиновых кислотных загрязнителей, теперь чаще используется как раз наоборот, как мера чистоты нуклеиновой кислоты. Коэффициент поглощения A260/A280 определяется путем расчета отношения УФ-поглощения при длине волны 260 нм (для ДНК) к поглощению при длине волны 280 нм (для белков) и обычно считается «чистым», когда значение находит-

ся в диапазоне от 1,6 до 1,8. Более высокие значения, чем 1,9–2,0, обычно указывают на загрязнение белками или другими веществами (такими, как полисахариды, вторичные метаболиты), которые не удаляются во время выделения препарата [1].

Спектрофотометрическое исследование чистоты полученных образцов, выделенных СТАВ-методом, показало, что соотношение поглощения при A260/A280 было равно в среднем 2,17 (табл. 3). Это свидетельствует о том, что полученные образцы ДНК содержат примеси. При этом отсутствие на электрофореграмме сильного «шмера» (размазанная туманная полоса ДНК), на наш взгляд, не позволяет говорить о деградации препарата.

Рис. 2. Электрофореграмма результатов амплификации в 2,5 % агарозном геле локусов lw_isotig00081 (a) и lw_isotig02842 (б). На фореграммах в верхнем ряду представлены продукты, амплифицированные с ДНК-матрицей, полученной колоночным методом, в нижнем ряду — СТАВ-методом. М — ДНК-маркер ЕВРОГЕН (фрагменты 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 п. н.). В верхнем и нижнем индексах — номера образцов *Pinus sylvestris* L.

На данном этапе исследователь может применять дополнительную очистку фрагментов двухцепочечной ДНК от одноцепочечной ДНК, РНК, солей и ферментов разными методами, включая колоночный метод. В то же время показано, что соотношение поглощения при A260/A280 для ДНК, выделенной на колонке, было равно в среднем 1,67, что свидетельствует о более высокой чистоте полученных препаратов ДНК (табл. 3), по сравнению с классическим методом.

Тестирование микросателлитных локусов ядерной ДНК сосны путем проведения полимеразной цепной реакции показало, что размеры продуктов амплификации во всех исследованных локусах близки к приведенным в литературных источниках. При этом нами не было выявлено несоответствия в количестве аллелей во всех 4-х локусах с использованием разных методов выделения ДНК.

Электрофореграмма с результатами амплификации EST-SSRs локуса lw_isotig00081 и lw_isotig02842 приведена на рисунке 2.

Ожидаемый размер фрагментов ДНК для локусов lw_isotig00081 и lw_isotig02842 – 290 и 229 п. н., соответственно. Экспериментальные данные совпадают с размером фрагментов у P. Fang и соавторов [12]. При этом для локуса lw_isotig00081 выявлен дополнительный аллель размером ориентировочно 190 п. н., который специфично отжигается на ДНК-матрице, полученной двумя разными методиками. Для этого локуса отмечено наличие несколько более ярких полос в районе 350 п. н., что можно отнести к неспецифической амплификации, которая, по-видимому, может возникать за счет наличия ингибиторов.

Электрофореграмма локуса lw_isotig02842 выявила наличие одного аллеля. Полученный нами продукт амплификации имеет длину около 229 п. н. При этом дополнительных димеров праймеров или полос в обоих случаях нами не обнаружено.

Электрофореграмма с результатами амплификации EST-SSRs локусов lw_isotig17679 и lw_isotig04195 приведена на рисунке 3.

Ожидаемый размер фрагментов ДНК для локуса lw_isotig17679 – 277 п. н. На электрофореграмме обнаружено по два аллеля размером ориентировочно 277 и 305 п. н., позволяющих выявить гетерозиготность локуса для обеих ДНК-матриц. Спектр микросателлитных фрагментов, амплифицируемых с локусом lw_isotig04195, позволил выявить аллели размером ориентировочно 189 и 210 п. н. Дополнительной неспецифической амплификации или шмера также отмечено не было.

Проведенный ПЦР-анализ геномной ДНК сосны обыкновенной с RAPD-маркерами выявил различие в уровне изменчивости амплифицированных локусов (рис. 4).

Наибольшим полиморфизмом характеризовался RAPD-маркер UBC-157. Амплификация геномной ДНК с этим маркером показала, что он обнаруживает большое число мест отжига на ДНК-матрице вне зависимости от метода выделения ДНК. Так, для RAPD-маркера UBC-457 было получено суммарно по 16 амликонов: 8 – в районе 700 п. н. (яркие полосы на электрофореze) и 8 – в районе 1400 п. н. (менее яркие полосы). Для RAPD-маркера UBC-157 было выявлено суммарно 40 амликонов: 8 – в районе 600 п. н., 8 – в районе 700 п. н., 4 – в районе 750 п. н., 2 – в районе 950 п. н., 3 – в районе 1100 п. н., 8 – в районе 1250 п. н., 2 – в районе 1500 п. н., 5 – в районе 1600 п. н. Менее интенсивные полосы не учитывали.

Таким образом, в результате амплификации геномной ДНК сосны обыкновенной под номерами 1–8 с 2 парами RAPD-маркеров был получен специфический набор ДНК-фрагментов, отличающих их друг от друга. Следует отметить, что RAPD-маркер UBC-457 не выявил полиморфизма между образцами сосны, однако он может быть полезен при увеличении выборки. Тем не менее, нами показано, что ДНК-матрица, выделенная на наборе *diaGene*, дает несколько более четкие продукты амплификации, которые удобнее визуализировать после гель-электрофореze.

Рис. 3. Электрофореграмма результатов амплификации в 2,5 % агарозном геле локусов lw_isotig17679 (а) и lw_isotig04195 (б). В верхнем ряду представлены продукты, амплифицированные с ДНК-матрицей, полученной колоночным методом, в нижнем ряду – СТАВ-методом. М – ДНК-маркер ЕВРОГЕН (фрагменты 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 п. н.). В верхнем и нижнем индексах – номера образцов *Pinus sylvestris* L.

Молекулярно-генетический анализ образцов сосны обыкновенной с использованием SSR- и RAPD-маркеров показал, что экстракция суммарной ДНК сосны, как колоночным методом, так и с модифицированным СТАВ-методом, позволяет судить о достаточно высокой воспроизводимости результатов. Это, в свою очередь, свидетельствует о высоком качестве образцов геномной ДНК и об эффективности двух методик ее выделения.

Заключение

Помимо экспериментальных результатов по выходу, чистоте и воспроизводимости анализа, в своей работе мы учитывали относительную

легкость использования, невысокую стоимость и отсутствие токсичных органических растворителей. Стандартная методика выделения ДНК со СТАВ обладает несколькими существенными недостатками: требует сложных манипуляций, использования токсичных органических соединений, которые могут привести к контаминации и потере образца, а сам процесс трудно автоматизировать; также весь протокол занимает достаточно много времени. К преимуществам колоночного метода можно отнести, в первую очередь, более высокую чистоту и лучшее качество выделенных нуклеиновых кислот, высокую воспроизводимость и простоту, по сравнению с выделением фенол-хлороформом.

Рис. 4. Электрофореграмма результатов амплификации в 2,5 % агарозном геле 8 образцов *Pinus sylvestris* L. с RAPD-маркерами UBC-457 и UBC-157. В верхнем ряду представлены продукты, амплифицированные с ДНК-матрицей, полученной колоночным методом, в нижнем ряду – СТАВ-методом. М – ДНК-маркер ЕВРОГЕН (фрагменты 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 п. н.). В верхнем и нижнем индексах – номера образцов *Pinus sylvestris* L.

Таким образом, отсутствие токсичных органических соединений, скорость выделения и высокое качество получаемой ДНК позволяют предложить технологию выделения ДНК из хвои *Pinus sylvestris* L. с использованием набора *diaGene* как альтерна-

тиву традиционного метода со СТАВ-буфером.

В результате дальнейших исследований будут выявлены наиболее эффективные локусы, которые могут быть использованы для характеристики насаждений сосны обыкновенной.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Великов, В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство: Учеб. пособие / В.А. Великов. – Саратов: «Саратовский источник». – 2013. – 84 с. – ISBN 978-5-91879-250-6.
2. Калько, Г.В. Тестирование ядерных микросателлитных маркеров сосны обыкновенной / Г.В. Калько // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. – 2017. – № 1. – С. 23–34.
3. Камалова, И.И. Изменчивость микросателлитных локусов у *Pinus sylvestris* L. из степной зоны центральной России / И.И. Камалова, М.Ю. Петюренко, А.П. Сердюкова // «ЛЕСНЫЕ ЭКОСИСТЕМЫ: современные вызовы, состояние, продуктивность и устойчивость»: Материалы международной научно-практической конференции посвященной 90-летию Института леса НАН Беларуси, 11–13 ноября

- 2020 г., Беларусь / Институт леса НАН Беларуси; редколлегия: А.И. Ковалевич [и др.]. – Гомель: Институт леса НАН Беларуси, 2020. – С. 42–47. – ISBN 978- 985-6768-32-6.
4. Крутовский, К.В. Перспективы использования геномных исследований в лесном хозяйстве / К.В. Крутовский // Сибирский лесной журнал. – 2014. – № 4. – С. 11–15.
  5. Народнохозяйственное значение сосны обыкновенной: [сайт]. – URL: <http://biofile.ru/bio/37153.html> (дата обращения 23.03.2021).
  6. Милютин, Л.И. Развитие лесной генетики в России / Л.И. Милютин, Е.Н. Муратова, А.Я. Ларионова // Сибирский лесной журнал. – 2018. – № 1. – С. 3–15.
  7. Политов, Д.В. Микросателлитный анализ клональности и индивидуальной гетерозиготности в природных популяциях осины, *Populus tremula* L.: обнаружение высокогетерозиготного клона / Д.В. Политов [и др.] // Генетика. – 2016. – Т. 52. – № 6. – С. 728–732.
  8. Рябушкина, Н.А. Специфика выделения ДНК из растительных объектов / Н.А. Рябушкина, М.Е. Омашева, Н.Н. Галиакпаров // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. – 2012. – № 2. – С. 9–26.
  9. Chhatre, V. Genetic structure and association mapping of adaptive and selective traits in the East Texas loblolly pine (*Pinus taeda* L.) breeding populations / V. Chhatre [et al.] // Tree Genetics and Genomes. – 2013. – vol. 9. – № 5. – p. 1161–1178.
  10. Doyle, J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // Phytochem Bull. – 1987. – № 19. – p. 11–15.
  11. Eckert, A.J. Association genetics of coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*, Pinaceae). Cold-hardiness related traits / A.J. Eckert [et al.] // Genetics. – 2009. – vol. 182. – p. 1289–1302.
  12. Fang, P. Development and characterization of 25 EST-SSR markers in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* (Pinaceae) / P. Fang [et al.] // Applications in Plant Sciences. – 2014. – № 2. – p. 1–6.
  13. Kim, C.S. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP / C.S. Kim [et al.] // Nucleic Acids Research. – 1997. – vol. 25. – no. 5. – p. 1085–1086.
  14. Krutovsky, K.V. RAPD Genome Maps of Douglas-Fir / K.V. Krutovsky [et al.] // The Journal of Heredity. – 1998. – № 89. – p. 197–205.
  15. Mengmeng, L. Predicting adaptive genetic variation of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) populations under projected future climates based on multivariate models / L. Mengmeng, K.V. Krutovsky, C.A. Loopstra // The Journal of Heredity. – 2019. – vol. 110 (7). – p. 857–865.
  16. Ostrowska, E. Technical review optimizing conditions for DNA isolation from *Pinus radiata* / E. Ostrowska [et al.] // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. – 1998. – p. 108–111.
  17. Palomera-Avalos, V. High yield and high quality DNA from vegetative and sexual tissues of Mexican white pine (*Pinus ayacahuite*) / V. Palomera-Avalos, P. Castro-Félix, A.R. Villalobos-Arámbula // African Journal of Biotechnology. – 2008. – vol. 7 (1). – p. 51–54.
  18. Telfer, E. Extraction of high purity genomic DNA from pine for use in a high-throughput Genotyping Platform / E. Telfer [et al.] // New Zealand Journal of Forestry Science. – 2013. – vol. 43:3. – p. 2–8.

REFERENCES

1. Velikov V.A. Molekulyarnaya biologiya. Prakticheskoe rukovodstvo: Ucheb. posobie. Saratov, 2013, p. 84. (In Russian)
2. Kal'ko G.V. Testirovanie yadernykh mikrosatelitnykh markerov sosny obyknovЕННОj. *Trudy Sankt-Peterburgskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta lesnogo khozyajstva*, 2017, no. 1, pp. 23–34. (In Russian)

3. Kamalova I.I., Petyurenko M.Yu., Serdyukova A.P. Izmenchivost' mikrosatellitnykh lokusov u *Pinus sylvestris* L. iz stepnoj zony tsentral'noj Rossii. «*LESNYE EHKOSISTEMY: sovremennye vyzovy, sostoyanie, produktivnost' i ustojchivost'*». *Materialy mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferentsii posvyashhennoj 90-letiyu Instituta lesa NAN Belarusi, 11–13 noyabrya 2020, Institut lesa NAN Belarusi; redkollegiya: A.I. Kovalevich [i dr.]*. Gomel', 2020, pp. 42–47. (In Russian)
4. Krutovskij K.V. Perspektivy ispol'zovaniya genomnykh issledovanij v lesnom khozyajstve. *Sibirskij lesnoj zhurnal*, 2014, no. 4, pp. 11–15. (In Russian)
5. Narodnokhozyajstvennoe znachenie sosny obyknovennoj: [sajt]. – URL: <http://biofile.ru/bio/37153.html> (data obrashheniya 23.03.2021).
6. Milyutin L.I., Muratova E.N., Larionova A.YA. Razvitie lesnoj genetiki v Rossii. *Sibirskij lesnoj zhurnal*, 2018, no. 1, pp. 3–15. (In Russian)
7. Politov D.V., Belokon' M.M., Belokon' Yu.S., Polyakova T.A., Shatokhina A.V., Mudrik E.A., Khanov N.A., Shestibratov K.A. Mikrosatellitnyj analiz klonal'nosti i individual'noj geterozigotnosti v prirodnykh populyatsiyakh osiny, *Populus tremula* L.: obnaruzhenie vysokogeterozigotnogo klona. *Genetika*, 2016, vol. 52, no. 6, pp. 728–732. (In Russian)
8. Ryabushkina N.A., Omasheva N.A., Galiakparov N.N. Spetsifika vydeleniya DNK iz rastitel'nykh ob'ektov. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, 2012, no. 2, pp. 9–26. (In Russian)
9. Chhatre V.E., Byram T.D., Neale D.B., Wegrzyn J.L., Krutovsky K.V. Genetic structure and association mapping of adaptive and selective traits in the East Texas loblolly pine (*Pinus taeda* L.) breeding populations. *Tree Genetics and Genomes*, 2013, vol. 9, no. 5, pp. 1161–1178.
10. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 1987, no. 19, pp. 11–15.
11. Eckert A.J., Bower A.D., Wegrzyn J.L., Pande B., Jermstad K.D., Krutovsky K.V., St. Clair J.B., Neale D.B. Association genetics of coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*, Pinaceae). Cold-hardiness related traits. *Genetics*, 2009, vol. 182, pp. 1289–1302.
12. Fang P., Niu S., Yuan H., Li Z., Zhang Y., Yuan L., Li W. Development and characterization of 25 EST-SSR markers in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* (Pinaceae). *Applications in Plant Sciences*, 2014, vol. 2 (1), pp. 1–6.
13. Kim C.S., Lee C.H., Shin J.S., Chung Y.S., Hyung N.I. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Research*, 1997, vol. 25, no. 5, pp. 1085–1086.
14. Krutovsky K.V., Vollmer S.S., Sorensen F.C., Adams W.T., Knapp S.J., Strauss S.H. RAPD Genome Maps of Douglas-Fir. *The Journal of Heredity*, 1998, no. 89, pp. 197–205.
15. Mengmeng L., Krutovsky K.V., Loopstra C.A. Predicting adaptive genetic variation of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) populations under projected future climates based on multivariate models. *The Journal of Heredity*, 2019, vol. 110 (7), pp. 857–865.
16. Ostrowska E., Muralitharan M., Chandler S., Volker P., Hetherington S., Dunshea F. Technical review optimizing conditions for DNA isolation from *Pinus radiata*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*, 1998, pp. 108–111.
17. Palomera-Avalos V., Castro-Félix P., Villalobos-Arámbula A.R. High yield and high quality DNA from vegetative and sexual tissues of Mexican white pine (*Pinus ayacahuite*). *African Journal of Biotechnology*, 2008, vol. 7 (1), pp. 51–54.
18. Telfer E., Grahama N., Manley T., Wilcox P. Extraction of high purity genomic DNA from pine for use in a high-throughput Genotyping Platform. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 2013, vol. 43:3. pp. 2–8.

Статья поступила в редакцию 22.04.2021