

УДК 602.6 : 635.054

ЭФФЕКТИВНЫЙ И НЕТОКСИЧНЫЙ СПОСОБ ЭКСТРАКЦИИ СУММАРНОЙ ДНК ИЗ ХВОИ *PINUS SYLVESTRIS* L.**М.Ю. Петюренко, И.И. Камалова, А.П. Сердюкова***ВНИИЛГИСбиотех, Воронеж, Россия*

Геномные исследования хвойных древесных растений с использованием молекулярно-генетических маркёров с успехом используют для целей генетической идентификации и изучения популяционно-генетической структуры. Среди них особое место занимают высокополиморфные микросателлитные локусы. Однако для проведения таких исследований, на первом этапе необходимо получить чистый препарат ДНК без признаков деградации и примесей. Для депротеинизации ДНК часто используют различные токсичные органические растворители (фенол, хлороформ и др.).

Для исследования были отобраны 30 образцов вегетативных тканей сосны обыкновенной на юге ареала в ЦФО (Кантемировский р-н Воронежской обл.). Экстракция ДНК из хвои выполнялась с использованием ЦТАБ, включающего применение токсичного хлороформа для депротеинизации [1] и коммерческого набора *diaGene* (ДИАМ) для выделения ДНК из растительной ткани на спин-колонках с сорбирующей мембраной, в состав которой входит диоксид кремния (выделение проводили согласно инструкции Производителя). Чистоту выделенной ДНК оценивали, используя электрофоретическое разделение полученных препаратов в агарозном геле, спектрофотометрическое определение концентрации – на приборе Quibit 2.0., а также – ПЦР. В качестве примера для сравнения двух методов выделения ДНК использовали EST-SSR праймер, подобранный к локусу *lw_isotig00081* [2]. Тестирование микросателлитного локуса ядерной ДНК сосны осуществляли путем проведения ПЦР в амплификаторе Real-time CFX96 Touch BIO-RAD. В реакции использовали *Taq* полимеразу фирмы Евроген (Россия). Результаты амплификации визуализировали с помощью горизонтального электрофореза в 2,5 % агарозном геле.

Электрофореграмма ДНК выделенной двумя разными методами из хвои деревьев сосны представлена рис. 1. Сравнительный анализ разделения ПЦР-продуктов показал незначительные различия по концентрации полученных ампликонов. На рис. 2 даны результаты электрофореза ДНК из хвои 30 деревьев сосны обыкновенной, полученных с использованием двух методов экстракции. Как видно из рис. 2, величина продуктов амплификации данного праймера соответствует ожидаемой для двух методов выделения согласно литературному источнику [2].



Рисунок 1. Электрофореграмма образцов ДНК *Pinus sylvestris* L., выделенных с помощью набора *diaGene* (1-9) и с помощью ЦТАБ-метода (10-30)

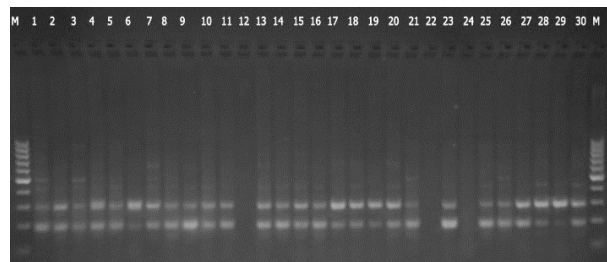


Рисунок 2. Электрофореграмма результатов амплификации в образцах ДНК 30 деревьев сосны с праймером *lw_isotig00081* в 2,5%-ном агарозном геле (обозначение как на рис.1)

Таким образом, отсутствие токсичных органических соединений, скорость выделения и оптимальное количество получаемой ДНК позволяют предложить технологию её выделения из хвои *Pinus sylvestris* L. с использованием набора *diaGene* для выделения ДНК из растительной ткани на базе спин-колонок как альтернативу традиционного метода с ЦТАБ. Этот способ выделения ДНК может быть использован при оценке полиморфизма SSR-локусов в популяционных исследованиях *Pinus sylvestris* L.

ЛИТЕРАТУРА

1. Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.
2. Fang, Pan et.al. Development and characterization of 25 EST-SSR markers in *Pinus sylvestris* var. *mongolica*(Pinaceae) // Applications in Plant Sciences. – 2014. – 91. Vol. 2 (1).