

**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

(Н И У « Б е л Г У »)

**ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ
НАУК**

КАФЕДРА БИОТЕХНОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

Тема

Создание банка ДНК редких видов эндемичных растений

Выпускная квалификационная работа

Обучающегося по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология

Очной формы обучения группы 07001419

Паласьос Сальседо Хоффре Сантьяго

Научный Руководитель:

Зав. кафедрой биотехнологии и
микробиологии

Батлуцкая И.В.

Белгород 2018

Содержание

Введение.....	3
1. Состояние проблемы охраны генофондов редких видов растений	
1.1. Характеристика генофондов редких и исчезающих видов растений...5	
1.2. Проблемы молекулярно-генетической идентификации и паспортизации растений.....6	
1.3. Виды сохранения редких и исчезающих видов растений.....9	
2. Специфика выделения ДНК из растительных объектов	
2.1. Особенности выделения ДНК из растительных объектов.....15	
2.2. Выделение ДНК из обезвоженных (дегидрированных тканей) растений.....20	
3. Создание банка ДНК редких видов эндемичных растений	
3.1. Характеристика региона исследования.....23	
3.2. Материалы и методы.....25	
3.3. Анализ генетического разнообразия популяций.....32	
3.4. Анализ генетической изменчивости.....36	
4. Экспериментальная часть.....	38
5. Выводы.....	49
Список литературы.....	51

Введение

Сохранение и воспроизводство ресурсов – одна из наиболее актуальных проблем XXI века.

Многие виды растений, грибов и животных стали редкими: состоят из нескольких малочисленных популяций, распространённых на ограниченной территории. Некоторые виды находятся под угрозой исчезновения, их численность сократилась до критического уровня — это исчезающие виды. Если факторы, вызвавшие сокращение численности, будут продолжать действовать, то сохранение таких видов маловероятно.

Собирая букеты первоцветов, разных видов гвоздик и колокольчиков, мы лишаем эти растения возможности дать плоды и семена. Заготавливая лекарственные растения (зверобой, душицу, валериану), сборщики часто вырывают их с корнями, а не срезают часть побега. После таких хищнических заготовок популяции растений могут не возобновиться.

Редкие и исчезающие виды нуждаются в охране, и их заносят в Красные книги. Включение вида в Красную книгу — сигнал о необходимости принятия срочных мер по его спасению.

Каждая страна, на территории которой обитает вид, включённый в Красную книгу, несёт ответственность перед всем человечеством за его сохранение.

Несмотря на принимаемые меры в настоящее время не представляется возможным сохранить отдельные исчезающие виды, поэтому предпринимаются попытки сохранить их гены.

Банк геномов создаётся путём хранения наследственной информации животных и растений в целости методом замораживания их семян, спор, половых и соматических клеток, а также тканей животных. Для этой цели используются методы их консервации — временного приостановления некоторых процессов. Самым эффективным среди них является метод

замораживания — криоконсервации (замораживания при очень низкой температуре).

Банк генов (введение в бактериальную клетку). В результате развития генетической инженерии появилась возможность выделения отдельных ценных генов исчезающих животных и растений, введения их в бактериальную клетку и создания таким путём банка генов.

Наследственную информацию, сохраняемую в настоящее время в законсервированном виде или в виде банка генов, можно впоследствии размножить (клонировать) и использовать для восстановления этих видов.

Исследования на уровне ДНК, помимо собственно молекулярной биологии, стали уже рутинной практикой в селекции, таксономии, оценке и сохранении биоразнообразия, эволюции, изучении генетических основ регуляции физиологических процессов и устойчивости к биотическим и абиотическим факторам среды, биотехнологии, биоинженерии и др. Достигнутый современный уровень молекулярно-генетических подходов: генотипирование, секвенирование позволяет анализировать огромное количество растительных организмов с целью выявления полиморфизма, молекулярных основ фенотипической изменчивости и устойчивости к стрессовым факторам среды и др.

Это мотивирует международное сотрудничество в области оценки и систематизации мировых генетических ресурсов, в том числе важнейших сельскохозяйственных культур и их диких сородичей.

1. Состояние проблемы охраны генофондов редких видов растений

1.1. Характеристика генофондов редких и исчезающих видов растений

Распахивая новые земли, строя города, плотины на реках, люди в течение многих веков неосторожно и легкомысленно брали у природы все, что хотели. И во второй половине XX в. оказалось, что некоторые обычные когда-то растения и животные, особенно полезные или очень красивые, начали исчезать. Больше нет на озерах зарослей водяного ореха, или чилима, почти невозможно найти в тайге корень женьшеня, совсем исчез из подмосковных лесов ландыш, стали редкостью желтые розочки купальниц в прибрежных зарослях и прекрасные водяные лилии на лесных прудах. Теперь это редкие, или эндемичные, растения.

Эндемиками можно назвать и растения-долгожители. Изменился окружающий их ландшафт, на планете появились и исчезли новые виды растений, а они все встречают и провожают целые столетия. На планете осталась лишь небольшая роща ливанских кедров. Многовековым американским секвойям дают собственные имена. Только на Сейшельских островах и нигде больше растет сейшельская пальма. Среди эндемиков есть и растения-хищники. На планете еще остались растения, которые эндемичны из-за своего географического положения. Гранитные Сейшельские острова можно назвать одним из чудес света. Они очень долго существуют в изоляции. Предполагают, что это обломок древнего единого континента Гондвана, который потом “распался”, образовав все современные материки. На Сейшельских островах более 70 эндемичных видов и родов растений.

В настоящее время общий генофонд редких и исчезающих растений сосредоточен на базовых экспозициях: «Редкие растения Сибири», «Редкие лесные растения», «Каменистая горка», а также на экологической тропе Заповедного парка СибБС и составляет около 300 видов, в том числе 56 видов, включенных в Красную книгу Томской области, 33 – в Красную книгу Российской Федерации.

С 2003 г. Создается родовой комплекс горечавковых (горечавка, калатиана, циминалис, золототысячник, сверция), насчитывающий более 20 видов. Помимо этого, на экспозициях лаборатории представлены родовой комплекс толстянковых и коллекция медоносных растений.

Пополнение коллекций осуществляется путем привлечения семенного материала по делектусному обмену, а также в ходе экспедиционных исследований на территории Томской и Кемеровской областей, Республик Алтай, Хакасия, Бурятия, Забайкальского края и др.

Совместно с сотрудниками других лабораторий ботанического сада ведутся активные работы по экологическому просвещению населения. Заложены экспозиции редких и хозяйственно-ценных растений Сибири на экологической тропе «В Заповедном парке».

1.2. Проблемы молекулярно-генетической идентификации и паспортизации растений

Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных, растений и грибов — самая хрупкая, но очень важная часть биоразнообразия, которая нуждается в первоочередной охране [4].

Приоритеты охраны таких видов определены Конвенцией по биоразнообразию и российским природоохранным законодательством, в частности Стратегией сохранения редких и находящихся под угрозой исчезновения видов животных, растений и грибов, принятой Министерством природных ресурсов Российской Федерации в 2004 г. В категории «редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды» выделяются объекты животного и растительного мира с биологической и правовой точек зрения. С биологической точки зрения категория «редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды» включает две основные группы объектов животного и растительного мира:

- естественно редкие виды, потенциально уязвимые в силу своих биологических особенностей;

- виды, широко распространенные, но находящиеся под угрозой исчезновения или сокращающие свою численность и ареал в результате антропогенного воздействия. С правовой точки зрения категория «редкие и находящиеся под угрозой исчезновения» включает виды, занесенные в Красную книгу Российской Федерации или субъектов Российской Федерации, а также в Приложения к международным соглашениям [4].

Наиболее действенным и чаще всего используемым методом сохранения редких видов лесных экосистем считается их охрана на особо охраняемых природных территориях (ООПТ). На ООПТ хозяйственная деятельность обычно запрещена или ограничена. При этом возможно сохранение популяций редких видов животных, растений и грибов или наиболее важных для сохранения вида местообитаний, таких как репродуктивные зоны, места зимовки, ключевые участки миграционных путей и др. [4].

Важно также, что режим ООПТ позволяет сохранить не только отдельные виды, но и всю лесную экосистему с ее сложной структурой и взаимосвязями. Однако у данного способа охраны редких видов есть и существенные недостатки.

Во-первых, организация ООПТ требует длительного времени и часто затягивается на десятилетия.

Во-вторых, далеко не все редкие виды охраняются на ООПТ.

В-третьих, такой «черно-белый» подход, как здесь не рубим и сохраняем, а там рубим и не сохраняем, не способствует развитию экологической ответственности бизнеса, властей, населения.

В-четвертых, вне ООПТ также необходимо сохранять локальные популяции, внутривидовые формы и подвиды, которые являются носителями уникальных адаптаций вида к конкретным условиям среды [4].

Современные молекулярно-генетические технологии позволяют изучать тонкую структурно-функциональную организацию геномов различных организмов. Анализ генетической изменчивости пород животных, сортов растений и штаммов микроорганизмов, идентификация и паспортизация хозяйственно-ценных особей стали возможны благодаря получению специфических геномных маркеров ДНК. С помощью произвольных праймеров идентифицировали генотипы видов рода *Rapax* (Araliaceae) [5], а впоследствии и эндемичного вида *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae) [1].

Работы по молекулярно-генетической идентификации сортового материала растений проводятся в основном на важнейших продовольственных [2,4], а также ягодных культурах.

Идентификация генотипов растений проводится с помощью ПЦР анализа рассеянных повторяющихся последовательностей R173 [6], разработаны основы паспортизации зерновых и ягодных культур.

Значительно меньше внимания уделяется анализу генетической изменчивости природных популяций, особенно редких и ресурсных видов растений. Весьма актуальной является проблема идентификации растительного сырья у близкородственных лекарственных видов растений, таких как виды рода *Adonis*. В геномах растений и животных количество микросателлитных повторов очень велико, что делает ISSR-метод (Inter-Simple Sequence Repeat) очень эффективным и удобным в генетическом анализе. Основой ISSR-метода или анализа полиморфных участков ДНК между микросателлитами является ПЦР с одним или несколькими праймерами длиной в 15-24 нуклеотида, но праймеры состоят из tandemных коротких 2~4 нуклеотидных повторов и одного селективного нуклеотида на 3'-конце праймера [7]. ISSR не требует предварительного клонирования и секвенирования фрагментов для подбора праймеров и хорошо воспроизводим в строгих условиях.

В качестве повторяющихся последовательностей ретротранспозоны рассеяны по всему геному; в связи с этим они удобны для ДНК-генотипирования растений [7]. При идентификации растительного сырья лекарственных растений, при мониторинге состояния природных популяций редких и исчезающих видов растений, для рекомендаций мер их охраны и при их восстановлении после антропогенных воздействий важна обобщенная генетическая характеристика по типичным для данного рода, вида, популяции ДНК-маркерам.

1.3. Виды сохранения редких и исчезающих видов растений

Наибольшую опасность для разных видов растений, животных и грибов представляет утрата их природных мест обитания. Поэтому сохранить и умножить видовое разнообразие можно только при условии сохранения естественных экосистем. Эту задачу можно решить путём создания охраняемых природных территорий, прежде всего заповедников. Территории заповедников — эталоны нетронутой дикой природы.

Особая роль отводится биосферным заповедникам. Они были созданы в 1974 г. по решению Организации Объединённых Наций. Их цель — проследить, как меняется дикая природа под влиянием хозяйственной деятельности человека, и прогнозировать вероятные изменения природы в будущем.

Всемирная сеть биосферных заповедников охватывает все основные природные зоны. В России организовано 39 биосферных заповедников, среди них лесной — Окский, лесостепной — Воронежский, степной — Центрально-Чернозёмный, горный — Кавказский и др.

Заповедники играют огромную роль в спасении редких видов.

Современным и эффективным подходом для ее решения является создание и длительное поддержание живых коллекций клонов *in vitro* (культуры изолированных протопластов, клеток, тканей, органов и их частей:

микрорастений, меристемы и ее производных, каллуса, клеточных и эмбрионных культур и др.) с привлечением разных методов биотехнологии, которые уже широко используются в мировой практике или находятся на стадии разработки.

Коллекции такого рода позволяют *in vitro* сохранять уникальные и/или хозяйственно ценные генотипы, редкие и исчезающие виды растений, преимущественно те, которые трудно размножаются вегетативно или теряют ценные свойства и/или признаки при семенном размножении. Долговременное хранение коллекций *in vitro* осуществляется, как правило, в стеклянных емкостях, размещенных на стеллажах небольшой площади с соблюдением правил асептики и постоянного контроля заданных параметров температуры и освещенности. Коллекции клонов *in vitro* (банк растительного материала) создаются для:

- пополнения и продолжительного хранения растительного материала генотипов, характеризующихся уникальными свойствами и/или признаками;
- проведения методических, прикладных (в т.ч. селекционных) и фундаментальных исследований;
- массового селективного тиражирования ценных трудноразмножаемых генотипов растений;
- сокращения сроков выращивания и снижения себестоимости посадочного материала для создания лесных культур целевого назначения или восстановления генофонда редких и/или исчезающих видов.

Способы сохранения *ex-situ*: – Содержание и разведение организмов в питомниках, зоопарках, ботанических садах, генофондных хозяйствах или фермах. – Хранение генетических материалов (гамет, зигот, соматических клеток, зародышей) в низкотемпературных генетических банках, в банках клеточных и тканевых культур, а также в банках семян. – Введение видов в культуру, численность которых сокращается из-за их неумеренной эксплуатации, может ослабить или снять этот пресс с их природных популяций.

Способы сохранения *in-situ* – Сохранение редких и находящихся под угрозой исчезновения видов, занесенных в Красную книгу Российской Федерации. 14 – Регламентация промысла эксплуатируемых видов. – Сохранение и восстановление среды обитания видов, реконструкция местообитаний. – Охрана видов на особо охраняемых природных территориях. Этот способ наиболее эффективен в отношении находящихся под угрозой исчезновения узкоареальных видов. – Реакклиматизация (реинтродукция) видов, воссоздание утраченных популяций. Мероприятия по реакклиматизации наиболее актуальны в отношении видов, занесенных в Красную книгу, ареал и численность которых сильно сократились в прежние годы, но сегодня имеют тенденцию к восстановлению.

Клон – вегетативно размноженное потомство одного растения (или клетки). Это, как правило, генетически однородная группа потомков, образованная путём бесполого размножения от одной особи и обладающая всеми биологическими признаками и свойствами материнского организма (имеют такой же набор генов, или генотип). Однако генетическая однородность клона может быть относительной в случае возникновения соматклональной изменчивости (например, спонтанных мутаций в культуре каллуса), эпигенетических изменений наследственного материала, влияния условий культивирования и случайных отклонений, возникающих в ходе онтогенеза. Поэтому клон может быть представлен несколькими линиями в случае его расщепления по морфологическим и другим признакам.

Линия – изолированная культура протопластов, клеток, тканей, органов или их частей *in vitro*, полученная от одного таксона (клона), но в разное время, разными исследователями и, возможно, от разных рамет.

Депонирование коллекции *in vitro* – это длительное сохранение коллекций без частых пересадок на свежую питательную среду. Включает приемы, позволяющие изменить скорость роста культуры в сторону его замедления и увеличения длительности интервалов между пересадками. Депонирование растительного образца (например, клона) может

использоваться и в другом значении - передача образца депозитором в биоресурсный центр (БРЦ), его регистрация, проверка, обеспечение сохранности и регулируемой доступности в соответствии с установленными правилами.

В зависимости от целей осуществления депонирования в БРЦ различают, в частности, следующие основные формы депонирования: «хранение», «гарантийное хранение», «патентное депонирование» (национальное и международное).

Криоконсервация – низкотемпературное хранение живых биологических объектов с возможностью восстановления их биологических функций после размораживания.

Депозитор – физическое или юридическое лицо, от имени которого клон (образцы живой ткани, клеточные или тканевые культуры) передается на хранение *in vitro* и (или) для проведения научных исследований в другую организацию.

Следует отметить, что коллекции клонов *in vitro*, созданные с привлечением биотехнологий, направлены на сохранение ценных генетических ресурсов и по своей сути не заменяют, а дополняют классические приемы *in situ* и *ex situ* консервации. Существуют многочисленные примеры создания и успешного функционирования биотехнологических коллекций растительных объектов, которые действуют:

- в виде живой активно растущей пересадочной коллекции (с переносом 1 раз в течение 1–2 месяцев на свежую среду);

- в состоянии замедленного роста и развития с использованием более длительного (один раз в 5-12 месяцев) интервала пересадки растительного материала;

- при полном отсутствии роста при криоконсервации (в жидком азоте) с использованием сверхнизких температур (-196оС). Коллекции подобного типа уже организованы в США, Германии, Франции, Италии, Японии, Индии, Республике Беларусь и других странах.

В коллекциях хранятся растительные образцы, принадлежащие к разным систематическим группам (таксонам). Большинство из них – экономически- ценные генотипы или редкие и исчезающие растения, которые считаются национальным достоянием конкретных стран.

К примеру, в США (штат Орегон, Корваллис) функционирует репозиторий (National Clonal Germplasm Repository USDA, <http://www.ars.usda.gov/pacific-west-area/corvallis/national-clonal-germplasm-repository/>), где содержится 500 000 образцов растений, охватывающих 10 000 видов плодовых, ягодных, декоративных, лекарственных и других культур. В Германии в коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, <https://www.dsmz.de/catalogues.html>) поддерживается более 700 образцов различных линий культуры клеток, принадлежащих к 80 семействам растений, причем большинство из них характеризуются активным синтезом фармакологически важных вторичных метаболитов. Коллекция Центрального ботанического сада НАН Республики Беларусь (получившая свидетельство в 2005 г.) включает 241 клон растений: 32 вида и более 200 культиваров из 11 семейств. При этом более 65 % таксонов в ее составе относится к фиторесурсным видам (Решетников, 2014). В России также имеется несколько коллекций, официально зарегистрированных в соответствующих министерствах.

В частности, с 1969 г. при финансовой поддержке Министерства образования и науки 3 Российской Федерации функционирует Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, созданная на базе ФГУП ГосНИИгенетика (г. Москва, <http://www.genetika.ru/vkpm/>). Всероссийская коллекция микроорганизмов (www.vkm.ru) имеет статус Коллекции национального значения (Постановление Правительства РФ от 24.06.96) и функционирует на базе Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина (г. Пущино, Московская обл.). Наиболее крупный банк растительного материала *in vitro* находится в Главном ботаническом саду

РАН им. Н.В. Цицина (ГБС РАН, г. Москва, <http://www.gbsad.ru/people/bioteh/>), который содержит более 800 растений: 214 видов, 622 культивара из 35 семейств. Всероссийская коллекция культур клеток высших растений (ВККК ВР) создана в 1985 г. на базе Института физиологии растений РАН им. К.А. Тимирязева (г. Москва, ИФР РАН, <http://www.ippras.ru/cfc/alccmp/>). Она представлена каллусными и суспензионными культурами клеток, полученными из растений редких и исчезающих видов, линий, штаммов- продуцентов вторичных метаболитов, в том числе фармакологического профиля (60 видов и 30 семейств растений).

Коллекции клонов растений *in vitro* также функционируют на базе ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (г. Санкт-Петербург, ВИР, http://www.vir.nw.ru/index_r.htm). Одна из первых в России коллекция клонов *in vitro* ценных генотипов лесных древесных растений была создана в 1991 году в Центральном научно- исследовательском институте лесной генетики и селекции ЦНИИЛГиС (ныне ВНИИЛГИСбиотех, г. Воронеж). Коллекция уникальна по своему составу (включает более 40 клонов ценных генотипов) и продолжительности (свыше 24 лет) хранения живых образцов *in vitro*. Она ежегодно пополняется новыми генотипами с расширением видового и породного состава (включая клоны, полученные из других НИИ РФ в рамках сотрудничества).

Определения Коллекция *in vitro* (банк растительного материала *in vitro*) – это искусственно созданная совокупность образцов живого растительного материала *in vitro* в виде культуры изолированных протопластов, клеток, тканей, органов или целых микрорастений (растений-регенерантов), соответствующая конкретным генотипам разных видов древесных растений, направленная на их сохранение и воспроизводство, и принадлежащая конкретному владельцу (организации). Она предназначена для использования в научно-исследовательских или прикладных целях в различных областях биотехнологии и лесного хозяйства.

В коллекциях *in vitro*, как правило, сохраняют (охарактеризованные, систематизированные и документированные) уникальные и/или хозяйственно ценные генотипы, редкие и исчезающие виды растений, преимущественно те, которые трудно размножаются вегетативно или теряют ценные отличительные свойства (признаки) при семенном размножении.

2. Специфика выделения ДНК из растительных объектов

2.1. Особенности выделения ДНК из растительных объектов

Выделение ДНК из растений вызывает ряд трудностей, связанных с разрушением клеток. Растительные ткани содержат полисахариды, полифенолы, танины, которые ингибируют лизис и ухудшают качество ДНК.

Выделять ДНК можно из свежих или замороженных (при -70 – -80 о С) растительных образцов, из частей растений, высушенных в силикагеле, или из гербарных образцов. Не любой гербарий подходит для выделения ДНК. Лучшие результаты достигаются в случае возраста гербария не более 30–40 лет и при условии его правильной и быстрой сушки. Для выделения ДНК обычно используют листья растений, но в связи с тем, что разные органы растений могут иметь отличия в химическом составе, в том числе в содержании вторичных метаболитов, необходимо подбирать орган растения, из которого выделяется более качественная ДНК. При выборе частей растения для выделения ДНК необходимо помнить о том, что нужно выбирать участки, не пораженные грибковыми и другими заболеваниями, чтобы избежать загрязнения проб чужеродной ДНК. Если ДНК из образцов ткани не может быть экстрагирована в ближайшие 48 ч, образец должен быть заморожен при температуре от -20 до -80 оС или подвергнут сушке. Повторение циклов замораживания-оттаивания проводить не рекомендуется из-за возможности разрушения ДНК.

В основе выделения ДНК лежат как физические, так и химические процессы. При выделении ДНК из растительных объектов необходимо

дезактивировать клеточные ферменты, «удалить» запасные вещества, например, полисахариды и вторичные метаболиты: 36 алкалоиды, фенольные соединения, терпены, которые не просто мешают выделению ДНК, но и отрицательно влияют на ее качество. Так, определенные группы полисахаридов при выделении ДНК образуют с ней вязкую желеподобную массу. Серьезное негативное воздействие оказывают окислители различной биохимической природы, а также фенольные соединения. В связи с многообразием метаболитов у представителей различных таксонов, а иногда и представителей одного рода растений, одного оптимального протокола изолирования ДНК не существует. В целом выделение ДНК включает обязательные процедуры:

- разрушение клеток или лизис;
- удаление мембранных липидов;
- удаление вторичных метаболитов и запасных веществ;
- удаление белков;
- удаление РНК;
- осаждение ДНК.

Первый этап – разрушение клеток, лизис. В отличие от клеток животных, растительные клетки окружены прочной целлюлозной оболочкой. Активная физическая гомогенизация тканей должна разрушить клеточные оболочки, нарушить целостность клеток и внутриклеточных компартментов с целью освобождения компонентов этих компартментов, выделения их в экстрагирующий буфер. Разрушение тканей осуществляется в процессе растирания в ступке или с использованием гомогенизатора. Вследствие того, что нуклеиновые кислоты легко разрушаются на стадии очистки, время между гомогенизацией пробы и добавлением буфера должно быть минимальным. Растительные ткани содержат большое количество полисахаридов, в том числе целлюлозу клеточных стенок, крахмал; полисахариды в комплексе с белками, а также белки в комплексе с липидами, комплексы белков с нуклеиновыми кислотами, полифенолы и другие

соединения. Это значительно затрудняет изолирование ДНК из многокомпонентной смеси, элементы которой могут как физически связывать, так и химически разрушать молекулы нуклеиновой кислоты. Погружение тканей в жидкий азот с последующей гомогенизацией облегчает разрушение клеток, тормозя при этом все биохимические и физические процессы, повреждающие ДНК. Если исходная ткань была заморожена, при гомогенизации ни в коем случае не следует допускать ее оттаивания. Для разрушения клеточных оболочек и мембран гомогенизированный образец обрабатывается экстрагирующим буфером, который обычно содержит EDTA, трис-HCl и СТАВ. Удаление липидов и мембранных белков. Гомогенизация тканей в присутствии детергентов (поверхностно активных веществ) и хаотропных агентов способствует высвобождению мембранных липидов, белков и лизису клеток. В буферных растворах детергенты разрушают фосфолипидный слой мембран, переводят в растворимое состояние мембранные белки, тем самым разрушая липидно-белковые комплексы, при этом ДНК экстрагируется в буфер, т. е. переходит в растворимое состояние.

Выбор детергентов зависит от целей исследования. Классический катионный детергент, используемый при экстракции ДНК, – цетилтриметил бромид аммония (СТАВ), содержащийся в экстрагирующем буфере. СТАВ лизирует клеточную мембрану, эффективно разрушает ДНК-белковые комплексы. При определенной концентрации соли (NaCl) СТАВ образует нерастворимый комплекс с нуклеиновыми кислотами. Анионные детергенты, например, додецилсульфат натрия (SDS), при значениях pH ниже изоэлектрической точки белка образуют с белками нерастворимые осадки. Додецилсульфат натрия и меркаптоэтанол осаждают белки и полисахариды как нерастворимый комплекс. 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. Поскольку наличие дисульфидных мостиков поддерживает

стабильность нуклеаз, меркаптоэтанол элиминирует активность освобождаемых при лизисе клеток ферментов. Реже используются неионные детергенты, такие как Тритон X-100, но так как они более «мягкие», белки могут оставаться интактными. Буфер экстракции может содержать дитиотреитол (ДТТ), который так же, как и меркаптоэтанол, является сильным восстанавливающим агентом. Присутствие ДТТ способствует разрушению дисульфидных связей, предотвращая образование димеров «тиолированной» ДНК в растворе. Нагревание и присутствующие в буфере для экстракции хаотропные агенты, такие как соли, денатурируют макромолекулы, нарушая водородные связи, гидрофобные взаимодействия и силы Ван-дер-Ваальса. Высокие концентрации солей осаждают полисахариды, которые в противном случае могут образовывать с ДНК желеобразный комплекс. В присутствии в буфере экстракции этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) – хелатирующего агента, связывающего ионы металлов (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} и др.), происходит дезактивация металл-зависимых ферментов, находящихся в растительных экстрактах. Наиболее важным является то, что EDTA связывает магний, являющийся кофактором фермента ДНКазы. При связывании магния снижается активность имеющихся ДНК. [14]

Удаление вторичных метаболитов. Растения характеризуются накоплением в определенных органах большого количества вторичных метаболитов (в первую очередь это относится к ароматическим и лекарственным растениям), которые оказывают существенное негативное влияние на процедуры изолирования, а в дальнейшем могут являться ингибиторами ПЦР-реакции. Полифенолы, присутствующие во многих растениях, при гомогенизации тканей вступают в реакции окисления, ковалентно связываются с белками и нуклеиновыми кислотами, осадок ДНК становится коричневым, такие образцы ДНК непригодны для дальнейших исследований. Связать фенолы и не допустить их взаимодействия с нуклеиновыми кислотами можно с помощью содержащихся в

экстрагирующем буфере полимеров: поливинилпирролидона (PVP) или поливинил- поливинилпирролидона (PVPP, модификация PVP с поперечными сшивками). Удаление белков. Степень связывания участков ядерной ДНК с белковыми комплексами зависит от транскрипционного статуса 39 этих участков, транскрипционно неактивная ДНК наиболее плотно «упакована» с соответствующими белками, представляя структуру гетерохроматина. Поэтому следующий важный этап – удаление белков с помощью протеаз. Щелочные протеазы гидролизуют белки, в том числе гистоны, связанные с ДНК, ферменты клеточного содержимого, в том числе нуклеазы. В качестве примера можно привести широко применяемую протеиназу К, которая эффективно инактивирует нуклеазы, будучи устойчивой при этом к денатурирующим (SDS, мочевины), хелатирующим (ЭДТА) и сульфгидрильным агентам, а также к ингибиторам трипсина и хемотрипсина.

Данная протеаза работает в широком диапазоне pH (от 4 до 12 единиц). Более того, денатурирующие агенты повышают доступность пептидных связей белков для протеиназы К. Белки также могут быть осаждены солями: ацетатом аммония, натрия, калия – или до осаждения ДНК экстрагированы смесью фенол/хлороформ.

Удаление РНК. Большие количества РНК в образцах ДНК могут связывать Mg^{+2} и тем самым снижать активность ДНК-полимеразы в ПЦР и, следовательно, количество продукта реакции. РНК может быть удалена на соответствующем этапе осаждением хлоридом лития или добавлением РНКазы к растворенному в воде осадку нуклеиновых кислот.

Инкубация при 37 °C способствует гидролизу РНК в образцах. Затем ДНК должна быть переосаждена спиртом, так как мелкие фрагменты РНК после обработки РНКазой могут послужить «затравками» в ПЦР-реакции.

Осаждение ДНК. Нуклеиновые кислоты из экстракционного буфера осаждают охлажденным этанолом или изопропанолом, поскольку полярные молекулы ДНК нерастворимы в неполярном спирте. Концентрация спирта

при пересаживании не должна быть меньше 70 % во избежание потерь ДНК. Если в осажденном концентрированном экстракте ДНК все еще присутствуют ингибиторы ПЦР, может быть использована смесь фенол/хлороформ/изоамиловый спирт; при этом смесь разделяется на фазы: водный раствор, в котором содержатся нуклеиновые кислоты; интерфаза вода/фенол – содержатся белки и углеводы; фаза хлороформ/изоамиловый спирт – растворяются липиды.

Водный экстракт переносится в чистую пробирку, и нуклеиновая кислота может быть осаждена 3 М ацетатом натрия, с последующим промыванием осадка в спирте (70 % и 100 % этанол). Фенол, хлороформ и изоамиловый спирт – токсичные соединения и требуют утилизации после использования, поэтому их применение становится все более редким. Коммерческие наборы для выделения ДНК не содержат токсичные фенол и хлороформ, но имеют высокую стоимость. ДНК после экстракции может храниться в буферах, совместимых с ПЦР.

Следует учитывать, что, например, ТЕ-буфер содержит ЭДТА, связывающий ионы магния, необходимого для работы ДНК-полимеразы (во время ПЦР-реакции). В стерильной дистиллированной воде ДНК представляет собой слабую кислоту, что в конечном итоге приводит к авторазрушению. Фосфатные буферы также могут влиять на структуру ДНК. Трис-буфер сам по себе не оказывает влияния на Таq-полимеразу, но при внесении ДНК в этот стабилизирующий буфер может сдвинуться рН реакционной смеси ПЦР. Экстрагированная ДНК может долгое время храниться при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для непродолжительного хранения ДНК достаточно $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Крайне не рекомендуется неоднократное замораживание–оттаивание препаратов ДНК, ведущее к разрывам молекулы.

Таким образом, метод экстракции ДНК должен быть достаточно простым, удобным, недорогим и при этом воспроизводимым. Полученная чистая ДНК должна быть «доступна» для ферментов рестрикции и реакций

амплификации, отвечать требованиям последующего клонирования, секвенирования, гибридизации и др.

2.2. Выделение ДНК из обезвоженных (дегидрированных тканей) растений

Использование свежего растительного материала в биогеографии, изучении биоразнообразия, в крупномасштабных исследованиях размера генома весьма ограничено. Дегидрированный растительный материал имеет определенное преимущество, поскольку нет необходимости хранить образцы в морозильнике. Такой материал может транспортироваться на далекие расстояния. Гербарные образцы, семена, образцы, лиофильно высушенные или фиксируемые в силикагеле, зачастую используются в целом ряде исследований для выделения из них ДНК. Однако, очевидно, что в подобных экспериментах важно полностью регидрировать ткани для последующей нормальной работы соответствующих ферментов.

В исследовании [18] высушенные с помощью силикагеля образцы были использованы для оценки размера генома, предполагая взятие образцов географически широко распространенных растений, когда сбор коллекций свежего материала неосуществим.

Данный способ, по расчетам исследователей, имеет ошибку (<10%), сравнимую с таковой других используемых методологий, например, определением размера генома с помощью флуоцитометрии; в зависимости от стадии развития растений при взятии образцов; влиянии вторичных метаболитов и даже различий между индивидами отдельных видов, различными используемыми буферами. Очевидно при этом, что существуют лучшие и худшие комбинации упомянутых факторов для оптимального определения размера генома.

Высушивание с силикагелем имеет определенный недостаток, заключающийся в том, что количество выделяемой ДНК незначительно, а на качество влияют фенолы в образцах.

Дело в том, что высушивание в силикагеле имеет сходство с процессами, происходящими в растениях при старении (senescence), обусловленном стрессовыми факторами и/или завершением вегетации, когда происходит накопление фенольных соединений и активация гидролитических ферментов (ДНКаз в том числе) и т.д. Исследователи попытались улучшить показатели выделения ДНК, предварительно на 24, 36 или 48 часов замачивая свежие собранные листья в спирте различных концентраций (70, 80, 90, 95, 100%).

После чего их помещали на силикагель в целлофане на 8 суток. ДНК изолировали в СТАВ буфере. Идея была основана на том, что этанол нарушает целостность клеточных стенок, необратимо дезактивирует ДНКазы и гидролизует углеводы при комнатной температуре.

В эксперименте сравнивались листья, предварительно замачиваемые в этаноле, сразу высушенные в силикагеле и свежие листья. Предобработка этанолом до помещения в силикагель достоверно увеличила количество выделенной ДНК по сравнению с образцами, сразу высушиваемыми в силикагеле.

Исследователи [4] предложили два протокола микроэкстракции, применимые для высушенных на силикагеле образцов эндемичного растения *Entelea arborescens* (Malvaceae).

Принципиальная особенность метода заключалась в первой стадии двухкратного отмывания гомогенизированных в жидком азоте образцов в буферах (10-30 мг) в STE- (0,25 M sucrose, 0,03 M Tris, 0,05 M EDTA) или HEPES- (2% b-mercaptoethanol, 0,2% PVP, 0,1 M HEPES, pH 8,0). Осаждение ДНК изопропанолом проводилось при комнатной температуре, что снижало возможность осаждения полисахаридов с ДНК. STE/СТАВ метод оказался гораздо более экономичным и без использования меркаптоэтанола.

Поскольку лиофилизаторы достаточно дороги и продолжительность процесса может достигать нескольких дней, обезвоживание растительных тканей возможно в потоке сухого теплого воздуха (food dehydrator) при 45-55оС от 12 до 24 часов с последующим измельчением, например, в центрифужных пробирках в миксере со стеклянными шариками [1].

Преимущество данного метода в простоте, низкой стоимости и эффективности выделения стабильной ДНК без использования фенола или хлороформа, а также возможности экстрагирования ДНК из множества растительных образцов.

3. Создание банка ДНК редких видов эндемичных растений

3.1. Характеристика региона исследования

В работе мы рассмотрим эндемичные растения России и США. В России рассмотрим Сихотэ-Алинский заповедник. Он является резерватом большого числа редких и исчезающих растений. Общее количество сосудистых растений, произрастающих на территории заповедника – 1094 видов из 135 семейств, что составляет 40% от флоры Приморья, насчитывающей 2748 видов. На его территории охраняется 23 видов сосудистых растений, занесённых в Красную книгу РФ (2008), 40 – в Красную книгу Приморского края (2008), 51 вид относится к эндемам Восточноазиатской флористической области, Маньчжурской флористической провинции. За семью видами растений Сихотэ-Алинского заповедника в рамках Летописи природы ведутся постоянные наблюдения.

Целью мониторинговых исследований в рамках темы Летописи природы является наблюдение, оценка и прогноз состояния популяций редких, реликтовых и эндемичных видов сосудистых растений Сихотэ-Алинского заповедника.

В задачи входит изучение возрастной структуры, динамики популяций и распространение наблюдаемых видов по заповедной и сопредельной территории.

На постоянных пробных площадках и трансектах ведутся наблюдения за динамикой численности и возрастной структурой популяций четырёх редких травянистых растений: бородатки японской (*Pogonia japonica* Reichenb. fil.), первоцвета иезского (*Primula jesoana* Miq.), эдельвейса Палибина (*Leontopodium palibinianum* Beauverd), венерина башмачка пятнистого (*Cypripedium guttatum* Sw.). Размеры площадок и трансект определяли в зависимости от размера самих растений и плотности их распространения. Возрастные стадии определяются по общепринятой методике (Работнов, 1938). Также ведутся наблюдения за динамикой цветения и плодоношения двух редких видов кустарников: рододендрона Фори (*Rhododendron fauriei* Franch.) и рододендрона сихотинского (*Rhododendron sichotense* Pojark). В двух изучаемых ценопопуляциях промаркировано по 10 модельных экземпляров рододендрона Фори и в одной ценопопуляции - 20 модельных кустов рододендрона сихотинского, на которых ежегодно во время массового цветения производится подсчет цветков и соцветий, а в период созревания семян подсчитывается число завязавшихся коробочек. Наблюдения за редким древесным видом – тисом остроконечным (*Taxus cuspidata* Siebold et Zucc. ex Endl.) в фитоценозах с его участием, проводятся на четырёх постоянных пробных площадях по единой методике (Флягина, 1993).

Флора Мексики отличается разнообразием, что обусловлено большой протяженностью страны и наличием различных климатических зон. Север страны в большинстве занят пустынями и степями и покрыт кактусами, которых тут насчитывается около 500 видов, юккой, агавой и меските.

Флора континентальной части США (без Гавайских островов) включает 20 тыс. видов, в их числе исчезнувшие или, по-видимому, исчезнувшие растения (90 наименований); растения, находящиеся под

угрозой исчезновения или исчезающие (818 таксонов); растения, которые могут оказаться под угрозой исчезновения на всем ареале или на большей его части в будущем, или растения уязвимые (1342 вида и подвида). Для защиты и охраны растительного мира построены природоохранные зоны и заповедники. Так, на полуострове Юкатан раскинулся огромный заповедник Сиан Каан, который находится под охраной ЮНЕСКО и представляет собой уникальный биосферный комплекс.

3.2. Материалы и методы

Материалы. **Рододендрон Фори (*Rhododendron fauriei* Franch)**. Сем. Верескоцветные – Ericaceae. Статус 3 R: редкий вид. Редкое реликтовое растение, занесенное в Красную книгу РФ и Красную книгу Приморского края. На материковой части России кроме территории Сихотэ-Алинского заповедника данный вид больше нигде не встречается. В урочищах Кабаний и Спорный на участках Фори-I и Фори-III ежегодно проводятся учеты цветения и плодоношения рододендрона на 20 модельных кустах. Анализ многолетних данных показывает, что коэффициент плодоношения в наблюдаемых ценопопуляциях достаточно высок, и составляет в среднем около 55%, что говорит о хорошей адаптации вида к существующим природным условиям. Динамика цветения и плодоношения носит флуктуирующий характер и зависит в первую очередь от погодных условий. В последние пять лет на участке Фори-III наблюдается достаточно сильное (около 80%) поражение растений рододендрона грибом из класса Аскомицетов - *Seifertia azaleae*. Этот опасный паразит рододендронов, в первую очередь поражает терминальные, а позже латеральные цветочные почки и ветви. Активности паразита способствуют поздние заморозки и более сильный перепад суточных температур в месте нахождения данной ценопопуляции (около 850 м над ур. моря). Размножение рододендрона Фори происходит семенным способом. Количество молодых растений составляет в среднем 34 тыс. шт./га. Хорошее семенное возобновление способствует

самоподдержанию популяций рододендрона Фори на достаточно высоком уровне и расселению данного вида на новые участки. Наблюдаемые ценопопуляции рододендрона Фори стабильны и достаточно устойчивы (рис.1.)



Рис.1. Рододендрон Фори
(*Rhododendron fauriei* Franch)

С 1988 года в заповеднике ведутся наблюдения за ценопопуляциями эндемичного вида - эдельвейса Палибина (*Leontopodium palibinianum* Beauverd), семейство: Asteraceae на мысе Северном и остепнённой морской террасе в урочище Благодатное. Данные по составу ценопопуляций свидетельствуют о преобладании в них вегетативных особей, что является характерной чертой растений с преимущественно вегетативным способом размножения. Возрастные спектры популяции полночленные, правосторонние. В 2013 году наблюдалось интенсивное цветение эдельвейса. В ценопопуляции на остепнённом лугу морской террасы впервые отмечено преобладание генеративных побегов над вегетативными. Их количество составило 62,9% от общей массы. Возможно, такому активному цветению эдельвейса способствовало большое количество летних осадков, когда их норма была превышена почти в шесть раз. Популяция эдельвейса Палибина находится в довольно устойчивом состоянии и имеет тенденции к увеличению численности в более благоприятных условиях. [11]. (рис.2)



Рис.2. Эдельвейс Палибина
(*Leontopodium palibinianum* Beauverd)

Аризона агава. (*Agáve*) — род однодольных растений подсемейства Агавовые (*Agavoideae*) семейства Спаржевые (*Asparagaceae*). Это название растение получило в честь дочери одного из древних мифических царей. Агава в переводе с греческого — благородная, замечательная, превосходная. Аризона агава – это многолетнее бесстебельное или с очень коротким стеблем суккулентное растение. Цветущая агава – это великолепное и редкое зрелище. На огромном, до 10 м, цветоносе образуется соцветие в виде колоса или метелки с тысячами желтоватых воронковидных цветков. Особенностью этого растения является то, что оно цветет 1 раз в жизни. А после цветения растение сразу погибает, при этом оставляя множество корневых отпрысков. В 1984 году было приблизительно сто экземпляров этого растения. Но Аризона агава смогла преодолеть снижение своей популяции. Однако только 2 вида сохранилось, оба расположены в национальном лесу Тонто, штат Аризона. Это редкое растение произрастает в горах Нью-Ривер и Сьерра-Анкас (рис.3)



Рис.3. Аризона агава
(Agáve)

Методы. Различные виды растений, растения и органы на различных стадиях развития, даже различные органы одного вида на одной стадии развития растения содержат различные количества и классы вторичных метаболитов и запасных веществ.

Компонентный состав оказывает значимое влияние на качество и количество экстрагируемой ДНК. В связи с этим существует достаточно много модификаций выделения ДНК из растительных объектов. Одним из наиболее широко применяемых является метод, разработанный [11] и основанный на использовании буфера СТАВ. Так, исследователи [10] цитируют одиннадцать модификаций данного метода, которые включают не только различные концентрации собственно буфера, но и добавление протеиназы К, меркаптоэтанола, использование смеси фенол /хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1), и затем хлороформ/изоамиловый спирт (24:1) и др. для лучшей очистки ДНК. Известно, что исследователи предпочитают использовать для изолирования ДНК молодые органы растений, зачастую молодые листья, поскольку они содержат меньшие количества запасных веществ и вторичных метаболитов. Однако подобные образцы по ряду причин далеко не всегда доступны, и приходится

модифицировать методы для получения удовлетворительных результатов из взрослых органов растений, гербарного материала и др.

Поскольку использование СТАВ и высоких концентраций солей не гарантирует полного избавления от полисахаридов, был предложен способ выделения ДНК из взрослых листьев с использованием для очистки колонки с Sephacryl S-1000 и последующим осаждением ДНК с (PEG 8000) [17]. Использование очищенной таким способом ДНК дало положительные результаты в ПЦР, рестрикции и (Southern-blot) анализе. (табл. 1)

Таблица 1. Некоторые ингибиторы процесса ПЦР

Ингибитор	Концентрация ингибитора
SDS	>0,005%
фенол	>0,2%
этанол	>1%
изопропанол	>1%
ацетат натрия	>5 мМ
хлористый натрий	>25 мМ
EDTA	>0,05 мМ
гемоглобин	>1 мг/мл
Мочевина	>20мМ

Разработан протокол, основанный на принципе осаждения одного компонента, тогда как другой остается в растворе. Это достигается ступенчатым повышением концентрации СТАВ, избирательно осаждающего ДНК (полисахариды остаются в растворе), позволяя получить осадок, свободный от полисахаридов [16]. К гомогенату замороженных в жидком азоте листьев первоначально добавляли 5 объемов буфера экстракции (100 мМ Трис-НСl, рН 8,0; 20 мМ Na₂ EDTA; 2% w/v СТАВ; 1,4 М NaCl; 1% w/v PVP). Процедура осаждения повторялась трижды с изменяющейся концентрацией буфера. Осадок растворялся в ТЭ-буфере с 1,0 М NaCl,

осаждался в двух объемах этанола при низкой температуре и отмывался дважды 70%-ным спиртом. Осадок растворялся 0,2 объемами 12 М LiCl. Освобождение от РНК осуществлялось РНКазой. Однако, одним из недостатков данного метода является сравнительно низкий выход ДНК.

Одним из способов избавления от высоких концентраций полисахаридов может служить использование корней в качестве образцов для выделения ДНК, имеющих более низкую вязкость по сравнению с листьями, например, у кактусов [14].

Выделение ДНК из Аризона агава (Agáve) включало следующие основные стадии:

- трехкратное отмывание растертой ткани в буфере экстракции; экстракция в СТАВ буфере с высокой концентрацией соли (4М NaCl) для удаления остатков полисахаридов;
- удаление РНК с помощью РНКазы; экстракция фенолом/хлороформом для удаления белков; экстракция хлороформом для удаления остатков фенолов.
- Выход ДНК составлял от 0 до 20 мг/г свежих корней.

Для выделения ДНК из листьев Рододендрон Фори (*Rhododendron fauriei* Franch) был предложен метод, включающий три стадии. На начальном этапе листовая материал (несколько листовых дисков, что избавило от процедуры взвешивания и от возможной контаминации при взвешивании) растирали в пробирке в капле 1% (v/v) 2-меркаптоэтанола после чего добавляли 300 мкл буфера (250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, 200 mM Tris-HCl, pH 8,0). Гомогенат инкубировали при комнатной температуре 1 час. На следующей стадии к гомогенату добавляли 5 мкл свежеприготовленного растворимого PVP в конечной концентрации 6% (soluble PVP, Sigma, MW 10 000), затем половину объема 7,5 М ацетата, инкубировали на льду 30 минут и центрифугировали 10 мин. при 10000 g, 4°C. Супернатант переносили в чистую пробирку, добавляли 1 объем изопропанола и осаждали ДНК 30 мин. при -20°C. После 10 мин.

центрифугирования при 10000 g осадок ДНК высушивали в вакууме. После соответствующей очистки от РНК и пигментов показатель A260/A280 растворенных образцов ДНК был в пределах 1,8 [15].

Добавление 40 mM аскорбиновой кислоты при понижении pH экстрагирующего раствора в сочетании с меркаптоэтанолом предотвращало окисление полифенолов и связывание с ДНК и тем самым повышало качество последней, показатель A260/A280 был около 1,8 [16].

В работе использовали эдельвейс Палибина (*Leontopodium palibinianum* Beauverd).

Взрослые листья сразу после сбора фиксировали жидким азотом и хранили при -70°C . Замороженные образцы растирали в центрифужных полипропиленовых пробирках и добавляли буфер экстракции (100 mM Tris, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, pH 8,0, 2% СТАВ, 0,3% меркаптоэтанол, 50 мг PVP/ 0,5 г ткани), инкубировали при 60°C 25-60 мин. ПВП образовывал комплекс с полифенолами, отделяя их от ДНК. Высокая концентрация соли способствовала удалению полисахаридов.

Час обработки РНКазой был достаточен для деградации РНК. Выделенная ДНК показала положительные результаты в (RAPD) реакции. Исследователи предполагают, что протокол можно использовать для других представителей семейства Rosaceae, содержащих высокие концентрации полисахаридов и полифенолов.

Одним из первых требований при картировании генов, селекции с использованием маркеров количественных признаков, изучении популяций, разработки стратегии сохранения видов является необходимость разработки и использования высокоэффективных с точки зрения качества, количества и себестоимости способах изолирования ДНК из очень большого количества образцов. Были отработаны «автоматизированные» версии протокола на основе the Qiagen MagAttract Plant Kit в сравнении со СТАВ методом, способствующие изолированию ДНК и генотипированию тысяч образцов хвойных: представителей ряда видов сосны и ели. ДНК изолировали из

высушенных на силикагеле и хранившихся при -20°C игл, причем отказавшись от взвешивания каждого образца, что отнимает значительное время. В каждую пробирку (96-racked) помещали 1-2 иголки, добавляли буфер и 5 мм стальной шарик, растирали с помощью (Mixer Mill), перемешивали и инкубировали при 65°C 15 мин. После соответствующих процедур, в том числе переосаждения этанолом, сравнивали полученные образцы ДНК с выделенной из свежих растительных образцов. Хотя СТАВ метод продемонстрировал лучший выход ДНК и воспроизводимость, при больших объемах образцов MagAttract протокол оказался более «гибким» и позволил обрабатывать одновременно большое количество образцов с хорошим выходом ДНК при стоимости одного образца 1\$. Высокоэффективная версия позволила обрабатывать до 200 образцов в день.

3.3. Анализ генетического разнообразия популяций

Все виды растения пользуется широкой популярностью в хозяйственной, промышленной, культурной сферах. Агава — многолетнее суккулентное растение, характеризующееся незаметным стеблем. Заметная многолиственная система образована прикорневой розеткой. Данный представитель флоры исторически произрастал, охватывая территории центральной Америки, облюбовав многокилометровые, суховатые, возвышенные местности. Европейское население узнало агаву после географических открытий. Спустя несколько веков гостья приобрела масштабную популяризацию всепланетного масштаба. Садоводы, селекционеры, ландшафтные дизайнеры, любители населили видами агавы оранжереи, зимние сады, садовые участки, альпинарии, подоконники.

Фактически агавовые представлены 300 видами, около 50 разновидностей агавовых широко внедрены любителями суккулентной зелени. Естественный ареал произрастания вида затрагивает южные окрестности США, областей Центральной Америки, частично Южной Америки. Встретить представителей вида возможно вдоль побережий,

высокогорных, труднодоступных мест. Теплый климат — обязательное условие роста рода.

Освоение европейского материка помогло культивировать агаву многими странами.

Сегодня модификации вида заполнили побережья Средиземного моря, Крыма, Кавказа.

Домашние вариации обладают возможностью вырасти при любой местности, условия выращивания рода — суховатая почва внутри горшка, изобилие прямых солнечных лучей.

Весь род классифицируется 3 подвидами:

Собственно, Агавы;

Литтеи;

Манфреды.

Литтеи самые малогабаритные агавовые, привлекающие внимание цветоводов. Вариации подвида идеально дополняют домашние коллекции, служат примечательным украшением экспозиций. Внешность литтеи разительно отличается аккуратной, прикорневой розеткой, включающей короткие, прямые листья. Соцветия напоминают колоски.

Собственно, агавовые представители крупногабаритные, меньшая доля культивируется любителями флоры из-за громоздких размеров, однообразия, колкости. Соцветия громадные, пирамидального силуэта.

Манфреды крупные, часто пятнистые, однообразные, практически отсутствуют колющие составляющие.

Виды агавы: Голубая, Американская агавы, Аризона Агавы, Мексиканская агавы, Авелланиденс, Беловатая агавы, Буро-желтая агавы, Вильморена, Королевы Виктории, Короля Фердинанда, Маргината, Нитеносная, Агавы Оттянутая, Парраская агавы, Парри, Полосатая агавы, Потаторум, Разноцветно-украшенная, Агавы Сжатая, Агавы Страшная, Туми, Функа, Ютская агавы.

Рододендроны встречаются в различных местообитаниях, от густых лесов до горной тундры, а также на разных высотах. Из 1000 и более видов рододендрона, как минимум 30 видов, в настоящее время нуждаются в защите в глобальном масштабе. Многие виды находящиеся под угрозой, произрастают в Японии; 25 таксонов включены в Красный список сосудистых растений Японии 1997 года. Разнообразие видов и сортов, тысячи гибридов, множество садовых форм рододендрона пользуются заслуженной популярностью.

Это красивоцветущие кустарники различной высоты, листопадные и вечнозеленые, относящиеся к семейству Вересковые - Ericaceae. Высаживают рододендроны группами на газонах или одиночно, а также в миксбордерах, низкорослые растения - различных каменистых садах, альпинариях, оранжереях. Хорошо сочетаются с луковичными, почвопокровными растениями, папоротниками.

Побеги у разных видов рододендронов голые или опушенные. Листья простые различной формы и окраски (сидячие или с черешками, очередные, цельные, яйцевидые, опушенные, часто кожистые). Цветки крупные, душистые, со слегка неправильным крупным венчиком, собранные в щитко- или зонтиковидные соцветия по 20-30 штук; реже одиночные. Плод - коробочка; семена многочисленные, мелкие. Окраска цветков белая, желтая, розовая, красная, лиловая, пурпурно-фиолетовая. Многие виды хорошие медоносы, но мёд часто с токсическим действием.

В средней полосе в культуре выращивают:

- Рододендрон катевбинский
- Рододендрон кавказский
- Рододендрон понтийский

Полувечнозеленые виды рододендрона:

- Сихотэ-алинский (розово-фиолетовые цветки)
- Рододендрон ледебура
- Ледебура (розовато-сиреневые цветки)

Листопадные виды рододендрона:

- Рододендрон даурский
- Рододендрон желтый
- Рододендрон японский
- Рододендрон канадский
- Рододендрон камчатский
- Рододендрон плотный

Известно 30 видов рода эдельвейс, распространенных в горах Европы, Азии и Северной Америки. На Дальнем Востоке произрастает 5 видов. Один из них – эдельвейс Палибина [*Leontopodium palibinianum* Beauverd] – в России встречается только в Приморском крае вдоль побережья Японского моря – от пос. Терней на севере до г. Находки на юге. Внесен в список редких и нуждающихся в охране видов растений российского Дальнего Востока и Приморского края. Охраняется в Сихотэ-Алинском и Лазовском заповедниках, но в последнем из них довольно редок. Необходим дополнительный контроль за состоянием популяций как на заповедных территориях, так и за их пределами.

В большей степени распространены они на юго-востоке Азии. Цветок не растет в Южной Америке, Передней Азии и на Кавказе. В странах бывшего СССР произрастает 12 видов эдельвейса, которые встречаются на Дальнем Востоке, Сахалине и на Курилах.

Среди них следующие виды:

- Альпийский.
- Двухцветный.
- Карликовый.
- Курильский.
- Сибирский.
- Гималайский.
- Скученный.
- Степной.

- Эдельвейсовидный. [11].

3.4. Анализ генетической изменчивости

Анализ генетической изменчивости состоял в проведении дополнительного анализа ITS1-ITS2 последовательностей, выявлении филогенетических связей и обобщении данных по филогении видов рода *Rhododendron*. В таблице 2 приведены некоторые виды рода *Rhododendron*.

Таблица 2. ITS1-ITS2 последовательности видов рода *Rhododendron*

Вид	Номер последовательностей в генбанке NCBI	ITS1-ITS2	Авторы	
<i>Rh. Aberconwayi</i>	EF035046	JF978181	Zha H. G., Sun H. (2006); Li et al. (2011)	
<i>Rh. Adamsii</i>	HM854162	HM854164	Kutsev M. G., Karakulov A. V., Uvarova O. V. (2010)	
<i>Rh. Aequabile</i>	AY877268	AY877284	Brown G. K., Craven L. A., Udovicic F., Ladiges P. Y. (2006)	
<i>Rh. Aganniphum</i>	JF978183	JF978184	Zhang et al. (2007)	
<i>Rh. agastum</i>	DQ677624 DQ677626 EF028355 EF028361	DQ677625 DQ677627 EF028356 EF028362	JF978185 JF978186 JF978187	Zhang et al. (2007); Li et al. (2011)
<i>Rh. Breviperulatum</i>	AF285853 AF432458	AF432425	Tsai C. C., Chen C. H., Huang S. C.; Tsai C. C., Chen C. H., Chou C. H. (2000)	
<i>Rh. cinnabarinum</i>	JF978225	JF978227	Li et al. (2011)	

Rh. Fauriei	HM854166	Kutsev M. G., Karakulov A. V. (2010)
Rh. Ferrugineum	X97419 AF393415 HE585254	Aert R., Hyam R., Chamberlain D., Karp A., Volckaert G.

4. Экспериментальная часть

Для целей последующего секвенирования генома был предложен протокол выделения ядерной ДНК, позволяющий минимизировать содержание хлоропластной и митохондриальной ДНК [5].

Поскольку наиболее используемый для выделения ДНК (СТАВ) метод не позволяет избавиться от ДНК клеточных органелл, мы оптимизировали метод выделения ДНК из изолированных клеточных ядер, используя девять представителей различных семейств растений. Для выделения ядерной ДНК были использованы три протокола: для образцов с небольшим количеством исходного материала, образцов с высоким содержанием ДНКазы и образцов с высоким содержанием вторичных метаболитов.

СТАВ-метод выделения ДНК из растений (Doyle and Doyle, 1987)

В основе метода лежит лизис клеток буфером на основе СТАВ (ЦТАБ –цетилтриметиламмонийбромид, входит в состав многих бытовых моющих средств), депротинизация хлороформом и осаждение ДНК изопропанолом.

Необходимые реагенты:

СТАВ-буфер: 2% СТАВ(10,0 г), 1,4 М NaCl (40,91 г), 20 мМ ЭДТА (20 мл 0,5 М ЭДТА), 100 мМ Tris-HCl pH 8 (50 мл 1М Tris-HCl) добавить дистиллированную воду до конечного объёма 500 мл.

TE-буфер: 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0; 1 мМ ЭДТА. Хранить при 2-8°C.

Ядра изолировали в градиенте сахарозы из фиксированной в жидком азоте ткани растений. Ткань для выделения общей ДНК также фиксировали и растирали в жидком азоте, изолировали в СТАВ буфере, полученный экстракт НК инкубировали 30 мин. с РНКазой при 65°C и 1 час с протеиназой при 45°C. Образцы один раз экстрагировали смесью хлороформ /изоамиловый спирт (24/1) и осаждали изопропанолом. Количество хлоропластных и митохондриальных ДНК копий в полученных образцах оценивали, используя количественную ПЦР в реальном времени. По сравнению с методом выделения тотальной ДНК, образцы, изолированные из

ядер, были существенно обогащены ядерной ДНК с незначительным присутствием копий хлоропластной (13 и 5%) и митохондриальной ДНК (17 и 6%, соответственно). Используя ткани различного типа или различного возраста, например, листьев, или изменяя условия роста растений, можно также снизить долю органелльных копий в геномной ДНК.

Был предложен протокол, позволяющий, по утверждению исследователей, выделять ДНК, пригодную для целей рестрикции и амплификации, из бактерий, растений без использования потенциально опасных растворителей фенола и хлороформа [16].

Для выделения ДНК использовали листья двухнедельных проростков Аризона агава. Два листовых диска помещали в микроцентрифужные пробирки во льду, добавляли TES буфер экстракции (0,2 М Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8, 0,5 М NaCl, 1% SDS) и промытый кислотой морской песок или 0,5 мм стеклянные шарики и растирали ткань прямо в пробирках во льду и далее добавляли буфер с протеиназой K, инкубировали при 65°C, добавляли ацетат аммония, осаждали изопропанолом, отмывали 70% этанолом, подсушивали осадок и растворяли в ТЭ буфере. Показания 260/280 нм выделенных образцов ДНК были в пределах 1,63-1,99. ДНК была доступна для действия пяти рестриктаз: EcoR I, Rsa I, Taq I, EcoR V, Hind III. Преимуществами метода являются небольшое количество исходной ткани листьев, простота метода, минимизация загрязнений, неиспользование токсичных фенола и хлороформа, возможность обрабатывать до 100 образцов в день.

Для других видов был отработан простой протокол, позволяющий за короткое время выделить из множества образцов 1-2 мкг ДНК из 1 г ткани (260/280 нм от 1,6 до 2,0) [2].

Все листья растений хранили при -80°C , лиофилизировали, растирали и 30-40 мг ткани:

а) помещали в 2 мл центрифужные пробирки, добавляли 1 мл буфера экстракции (100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 700 mM NaCl, 50 mM EDTA (pH 8,0),

1% (СТАВ) (w/v), 140 mM β-меркаптоэтанол. Затем вносили 16 мкл РНКазы А и перемешивали;

б) инкубировали при 65°C, охлаждали, инкубировали 10 мин., добавив 600 мкл хлороформа (осторожно перемешивая);

в) центрифугировали 10 мин. при 15,682 g, верхнюю водную фазу переносили в новую пробирку, добавляли 700 мкл охлажденного изопропанола, осторожно перемешивали и инкубировали 10 мин. при –80°C;

г) центрифугировали 5 мин. при 15,682 g, супернатант отбрасывали, осадок промывали 500 мкл 70% этанола, подсушивали при комнатной температуре, ресуспендировали в 50 мкл ТЭ буфере. Продукты амплификации, полученной ДНК (два SSR праймера хлоропластов) были высоко воспроизводимы.

Модифицированный метод (СТАВ), предложенный ранее [21], был использован для выделения ДНК из растений эдельвейс для идентификации локусов, ответственных за реализацию процесса регенерации *in vitro* [20]. Листья из культивированных *in vitro* растений сразу после взятия проб замораживали в жидком азоте и хранили при –80°C. Анализ на основе ДНК картирующих популяций томатов с высокой и низкой способностью к регенерации *in vitro* позволил локализовать новые локусы двух кандидатов-генов: аллель гена, способствующего высокой регенерации Rg-2 (вероятная аллель Rg-1 на хромосоме 3) и LESK1, кодирующего серин/треонинкиназу, предположительного маркера компетенции регенерации.

Метод выделения ДНК без гомогенизации растительного материала и центрифугирования. Основным способом избавления от клеточной стенки являлась правильно подобранная энзиматическая смесь выделенных из рододендрон различных карбогидраз, гидролизующих клеточные стенки. Оптимизация времени инкубации для каждого из испытанных видов растений способствовала выходу ДНК без ее фрагментации. Для эксперимента были взяты 156 видов растений и 126 из них дали положительный результат. Для мацерации тканей использовали 96-луночные

микротитрационные планшеты фирмы Promega (Wizard® Magnetic 96 Plant System kit), для процедуры экстракции ДНК из жидкости, содержащей остатки клеточных стенок и другого «мусора», использовали магнитные частицы Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal kit (Dyna), Wizard® Magnetic 96 Plant System (Promega Corporation, Madison, WI, USA), MagnaBot® 96 Magnetic Separation Device. Таким методом можно выделять ДНК не только из свежих, но и из высушенных листьев и размельченных семян.

Подходы к изучению филогенетических взаимоотношений и уровню биоразнообразия предполагают использование быстрых, эффективных и недорогих методов экстракции из множества гербарных образцов чистой ДНК, амплифицируемой в ПЦР и доступной для действия рестриктаз. При этом может иметь значение как способ подготовки гербарного материала, способ и время его хранения, так и вид, и орган используемого растения для выделения ДНК, т.е. присутствия полисахаридов, фенолов и других органических соединений. Определенным требованием в данных исследованиях является возможность выделения ДНК из очень небольшого количества гербарного образца. С целью филогенетических исследований было использовано 3 гербарных образца от 2 до 10 года хранения [12].

Для избавления от контаминаций ДНК экстракцию и подготовку к ПЦР проводили в изолированном помещении. Выделение ДНК осуществляли с использованием 4 протоколов:

два модифицированных (СТАВ) метода, модифицированный (DTAB) и метод с использованием гуанидинтиоционата и силика-частиц. Ингибирующие компоненты удаляли с помощью нерастворимого (PVP), а также в реакции ПЦР увеличением концентрации MgCl₂, добавлением бычьего сывороточного альбумина (BSA) или разбавлением экстракта (template) ДНК. Поскольку положительный эффект этих добавок был неравноценен в различных образцах, исследователи сделали предположение о наличии трех классов ингибирующих веществ. При низкой концентрации

повторную амплификацию осуществляли с внутренними праймерами для увеличения количества ДНК для секвенирования.

В результате этих модификаций в 3-ми образцах была осуществлена успешная амплификация. Использование 3-х протоколов для выделения ДНК [18] из свежих и гербарных листьев, содержащих большое количество фенолов, представителей рода рододендрон, показало, что наилучшие результаты для большинства испытанных видов – это присутствие ПВП для связывания фенолов, высокая молярная концентрация NaCl, препятствующая соосаждению полисахаридов и ДНК и LiCl для удаления РНК селективным осаждением. Свежие листья были собраны в различных регионах Бразилии, заморожены при -20°C .

Для экстракции использовали:

протокол А (СТАВ, Трис-НСl, NaCl, ПВП, ЭДТА, меркаптоэтанол);

протокол В (ацетат натрия, ЭДТА, NaCl, ДТТ, ПВП и протеиназа К);

протокол С (СДС, Трис-НСl, NaCl, ЭДТА, меркаптоэтанол и ПВП);

протокол Д (Трис-НСl, EDTA, сорбит, бычий сывороточный альбумин и ПВП);

протокол Е – (Qiagen DNeasy Plant Kit). Качество ДНК оценивали после электрофореза в агарозе, а также по отношению поглощения при 260/280 нм. ДНК гербарных образцов было удовлетворительным только для 8-ми из 54 образцов, из чего авторы заключили, что способы приготовления гербарных образцов имели критическое значение.

Вследствие нестабильности ДНК сухих гербарных образцов постарались минимизировать при выделении действие на опытные образцы химических реагентов. Так, [4] предлагают довольно простой метод экстракции ДНК из гербарных образцов различного возраста (от 7 до 118 лет). Перед использованием поверхность листьев с помощью абсорбирующей бумаги очищали от грибковых загрязнений. Семена и стебли промывали бидистиллятом, погружали в жидкий азот и растирали в СТАВ буфере с ЭДТА и меркаптоэтанолом. ДНК осаждали в смеси хлороформ/изоамиловый

спирт (24/1), после центрифугирования добавляли изопропанол и оставляли на час при -20°C , осадок отмывали 80% этанолом и оставляли на ночь при -20°C , после переосаждения осадок высушивали и хранили в ТЭ буфере. Растительный материал, хранившийся между листами бумаги, не подвергавшийся действию химических соединений, высоким температурам или микроволновому действию, с наибольшей вероятностью обеспечивал хороший результат. Деграция ДНК, по определению исследователей, является скорее результатом неудовлетворительного хранения, а не его продолжительности.

Итак, способ хранения фиксированных первичных образцов, например, листьев, имеет существенное значение для эффективности выделения ДНК. В работе [15] использовали листья эдельвейса, являющегося лекарственным растением и накапливающего эфирные масла. Половину образцов листьев промывали стерильной дистиллированной водой, другую нет.

Из каждой половины листьев:

а) замораживали при -76°C ;

б) 48 часов сушили при 50°C и затем хранили в темноте при комнатной температуре;

в) сушили на воздухе и затем хранили в темноте при комнатной температуре;

г) сушили в силикагеле и затем хранили в темноте при комнатной температуре. Все образцы хранились в течение месяца до выделения ДНК. Для изолирования ДНК использовали 4 протокола: модифицированный СТАВ с меркаптоэтанолом или ДТТ, модифицированный СДС с меркаптоэтанолом или ДТТ. Очищенная ДНК обрабатывалась ДНКазой свободной РНКазой. Хорошего качества и в достаточных количествах ДНК выделялась при использовании СДС с ДТТ. Способ фиксации и хранения листьев оказал влияние на качество и количество выделяемой ДНК. В общем, образцы подвергались серьезному окислению, если пребывали во влажных условиях после сбора.

Следовательно, требуется как можно более быстрое высушивание или замораживание образцов.

Наибольший выход ДНК был из быстро высушенных, или из быстро замороженных образцов.

Другим определяющим фактором явилось промывание образцов сразу после сбора дистиллированной водой. Большинство образцов начинали гнить в процессе хранения. Поэтому для предотвращения гниения и удаления загрязнений с поверхности листьев, просто протирание хлопковой тканью, смоченной спиртом, явилось лучшим вариантом. Был предложен простой, недорогой протокол, который, по результатам амплификации и секвенирования, позволил выделить качественную ДНК, как из свежих, гербарных, так и высушенных в силикагеле образцов; из листьев, стеблей, лепестков высших растений – представителей семейств Рододендрон Фори (*Rhododendron fauriei* Franch), эдельвейс Палибина *Leontopodium palibinianum* Beauverd, арizona агава (*Agáve*).

Согласно полученным результатам, амплификация областей хлоропластного генома была успешна во всех протестированных образцах, эффективность подтвердилась также амплификацией и секвенированием продуктов до 1 кб из ДНК, выделенной из 60-летнего гербарного образца. Концентрация ДНК из гербарных образцов была в пределах от 20 до >1050 нг/мкл, из свежих тканей – от 100 до 2500 нг/мкл.

Ниже приведен данный протокол:

1. В пробирки Эппендорф внести по 750 мкл (2×СТАВ) буфер и 3 мкл 2-меркаптоэтанола.
2. Растереть 0,5-1,0 г ткани с жидким азотом и стерильным песком.
3. На кончике шпателя внести растертую ткань в каждую пробирку и хорошо перемешать.
4. Инкубировать в водяной бане при 55-60°C в течение 1–5 часов, перемешивая каждые 15 мин.

5. Добавить 700 мкл (SEVAG = хлороформ/изоамиловый спирт 24/1) в каждую пробирку и тщательно перемешать, отцентрифугировать при 9240 g 10-15 мин. Перенести водную фазу в новую пробирку Эппендорф.

6. Добавить 0,33 объема ледяного изопропанола и оставить не меньше, чем на час при -30°C.

7. Отцентрифугировать при 9,240–13,305 g 10 мин. при комнатной температуре. Су-пернатант отбросить, не нарушая осадка. Высушить в вакууме. Если водная фаза вязкая, повторить 6-й и 7-й этапы от 2-х до 4-х раз

8. Ресуспендировать осадок в 100–200 мкл (TE). Добавить 1-2 мкл 10 мг/мл РНКазы. Хорошо перемешать и инкубировать 30 мин. при 37°C.

9. Добавить 20 мкл (0,1 объема) 2,5 М (NaOAc) и 500 мкл (2-2,5 объема) ледяного 95% этанола и оставить при -20°C не меньше, чем на 30 мин. Отцентрифугировать при 2012249,240–13,305 g 5 мин. Отбросить супернатант.

10. Промыть осадок 1 мл 70%-ного этанола, не нарушая осадка. Отцентрифугировать при 9,204 g 4 мин. и слить этанол. Высушить осадок в вакууме. Не пересушить.

11. Ресуспендировать осадок в ~100-200 мкл (TE). Хранить при -20°C. 12. Проверить ДНК в 1%-ном агарозном геле.

Сравнительный анализ выбранных методов экстракции растительной ДНК из проб продуктов питания, показал, что для проведения ПЦР с целью видовой идентификации тканей растительного происхождения наиболее пригодны метод с использованием готовых наборов реагентов «Набор реактивов для выделения ДНК из растительного сырья и пищевых продуктов», (ЗАО Синтол, Москва) и «ПРОБА–ЦТАБ» (ООО «НПО ДНК–Технология», Москва) (табл. 3).

Таблица 3. Влияние методик выделения ДНК на эффективность ПЦР

Методика экстракции ДНК	Чувствительность ПЦР, %	Воспроизводимость результатов ПЦР	Наличие фоновой амплификации
с дополнительно й экстракцией фенолом	0,5	83	+
в качестве детергента ЦТАБ	0,1	96	-
«Набор реактивов для выделения ДНК из растительного сырья и пищевых продуктов» ПРОБА–ЦТАБ»	0,1	100	-

Маркерные системы ДНК (Молекулярные маркеры) Молекулярные маркеры представляют собой генетические маркеры, позволяющие анализировать организм на уровне ДНК. К ним применимы термины классической генетики, такие как локус, аллель, доминантный и кодоминантный тип наследования. Аллели маркерных локусов представляют собой различные формы (нуклеотидные последовательности, отличающиеся по длине и/или по нуклеотидным заменам) одного и того же маркера,

расположенные в одинаковых участках (локусах) гомологичных хромосом. ДНК маркеры условно можно разделить на три группы: маркеры, основанные на блот-гибридизации, маркеры, основанные на ПЦР и маркеры, основанные на ДНК-чипах. В последующих лекциях мы рассмотрим подробнее маркеры, основанный на ПЦР. ПЦР очень мощный метод размножения фрагментов ДНК вне организмов (*in vitro*). С момента его открытия в 1985 году, этот метод используется сейчас практически во всех молекулярнобиологических лабораториях. В 1985, технология полимерной цепной реакции (PCR) была введена Миллисом (Mullis) с сотрудниками. PCR - polimerase chain reaction Полимеразная цепная реакция - ПЦР „Baby Blue“ Thermocycler, 1986. Через 8 лет после этого за изобретение метода ПЦР Кэри Муллис получил Нобелевскую премию. В 1980 году Каледин с сотрудниками впервые выделили и описали свойства днк-полимеразы из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (Википедия). Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка нуклеиновой кислоты ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). С помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований. С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определённых условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20—40 тысяч пар нуклеотидов. (рис.4, 5)



Рис.4.Значения концентраций ДНК, полученные с помощью спектрофотометра

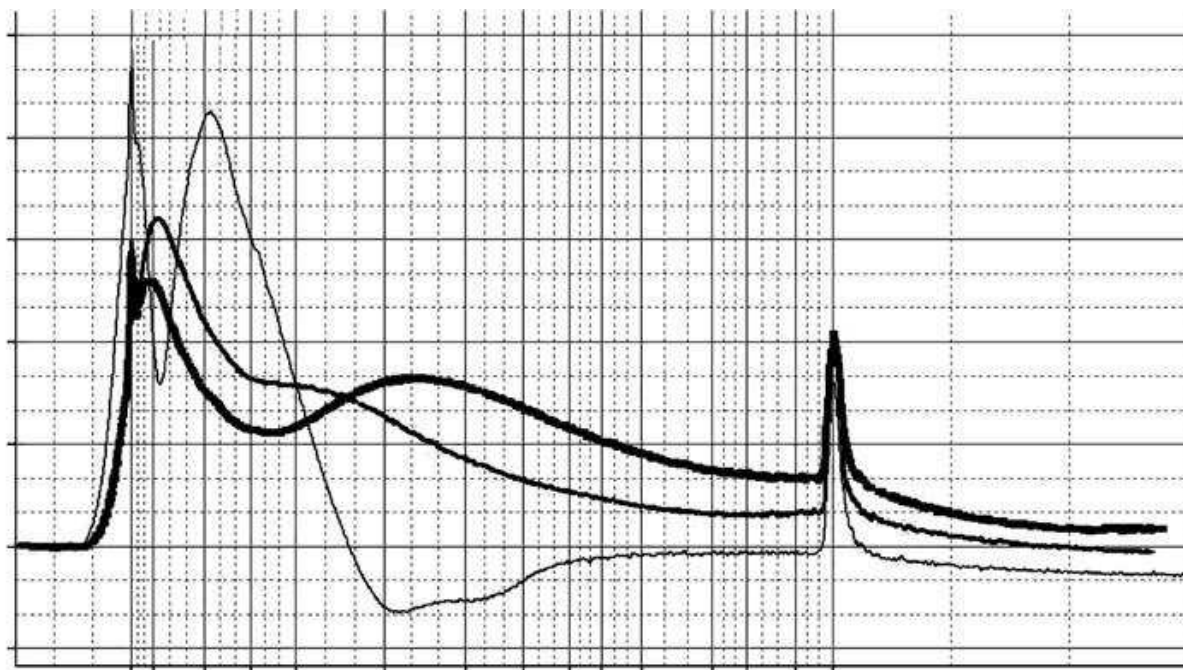


Рис. 5. Выделение ДНК из гербарных образцов

5. Выводы

Мировое ботаническое сообщество одной из важнейших задач настоящего времени определяет создание глобальной карты мирового биоразнообразия. Это стало возможным, в том числе, на основе современных биохимических и молекулярно-генетических подходов с использованием различных классов молекулярных маркеров. Одним из перспективных средств для описания биоразнообразия является ДНК-баркодирование с использованием определенных последовательностей как ядерной, так и в особенности митохондриальной и хлоропластной ДНК.

В последнее десятилетие молекулярные данные, полученные на основе ДНК, позволяют более точно охарактеризовать систематические взаимоотношения между высшими растениями. Зачастую молекулярные данные подтверждают гипотезы, основанные на морфологии и др., в ряде случаев эти данные предлагают новый взгляд на систематику и биогеографию. Филогенетические исследования играют важную роль в понимании истории развития популяций, одомашнивания и создания культурных видов растений. В сочетании с археоботаническими и археологическими исследованиями они проясняют картину эволюции диких и культурных видов растений.

По сути, современная систематика и биогеография объединяются в изучении вопросов распространения растений под влиянием исторических и экологических факторов.

Во многих случаях молекулярные исследования растений требуют экстракции геномной ДНК высокого качества и в больших количествах. Однако исследуемые растения могут обладать различными видовыми физическими и биохимическими особенностями, препятствующими этому.

Совершенно очевидно, что для разных групп растений оказываются эффективными разные методики выделения ДНК. При необходимости получить большое количество высококачественной ДНК необходимо учитывать вид растений. Взяли на вооружение метод выделения ДНК, основанный на использовании частичек парамагнитной целлюлозы MagnaCel от компании Promega (PMS). Технология изначально была разработана и используется в судебной экспертизе, где чаще всего имеют дело с мизерным количеством генетического материала. Авторы исследования оценили применимость данной технологии к выделению растительной ДНК и сделали сравнение с двумя наиболее популярными методами - с использованием колонок DNeasy Plant Mini Kit и цетилтриметиламмонийбромидом (СТАВ). Был проанализирован широкий спектр видов цветущих растений - 3 видов растений. По количеству выделенной ДНК новый метод PMS показал результат, в два раза превосходящий другие методы, более того, в отличие от СТАВ метода, в нем не используются опасные химические вещества.

Статистический анализ также показал достоверность существенных различий по качеству и количеству полученной ДНК как между тремя методами, так и между различными таксономическими группами растений. Таким образом, авторы публикации заявили об очевидном преимуществе нового метода в случаях, когда, в силу особенностей исследуемого растения, затруднительно получение достаточных количеств чистой высокомолекулярной ДНК.

Список литературы

1. Антонова О. С. [и др.] Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии (обзор) [Журнал] // Научное приборостроение. - Санкт-Петербург : Институт аналитического приборостроения РАН, 2010 г.. - 1 : Т. 20. - стр. 3-9.
2. Горбатовский В.В. Красные книги субъектов Российской Федерации: Справочное издание. М.: НИИ-Природа, 2003. - 496 с.
3. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. – М.: Мир, 1991. 124 с.
4. Губанов И.А., Калиниченко И.М., Щербаков А.В. Флора Средней России: Аннотированная библиография. Первое дополнение. — М.: Изд-во Центра охраны дикой природы, 2002. - 60 с.
5. Известия Самарского научного центра Российской академии наук, т. 12, №4(3), 2010
6. Красная книга Республики Северная Осетия Алания. Владикавказ, 1999. - 248 с.
7. Лавриненко Ю.В. Эколого-биологическая характеристика и современное состояние восточноазиатских древесных интродуцентов в условиях Северо-Осетинской наклонной равнины. Дисс. .канд. биол. наук. Ставрополь, 2006. - 187 с.
8. Николаев И.А. Эколого-ценотическая и биологическая характеристика видов рода *Clematis* L. Республики Северная Осетия-Алания. // Автореф. канд. дисс. Астрахань, 2009. - 23 с.

9. Рябушкина Н. А., Омашева М. Е. and Галиакпаров Н. Н. Специфика выделения ДНК из растительных объектов [Journal] // Биотехнология. Теория и практика.. - 2012. - 2.
10. Журнал. Гринология. Растения Северной америки <http://greenologia.ru/eko-problemy/biosfera/rastenij-severnoj-ameriki.html>
11. Журнал. Сезоны года. Мексика. 2011-2018 <https://сезоны-года.рф/>
12. Специфика выделения ДНК из растительных объектов https://www.researchgate.net/publication/269837938_Specifika_vydelenia_DNK_z_rastitelnyh_obektov
13. ФГБУ «Сихотэ-Алинский заповедник» <http://сиалинь.рф/>
14. **Finkeldey Reiner, Leinemann Ludger and Gailing Oliver** Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants [Journal] // Appl Microbiol Biotechnol. - [s.l.] : Springerlink.com, 2010. - 85:1251–1258.
15. **Nuroniah H. S., Gailing O. and Finkeldey R.** Development of SCAR Markers for Species Identification in The Genus Shorea (Dipterocarpaceae) [Journal] // Silvae Genetica. - 2010. - 59 : Vol. 6
16. **Tang Xiaoshu, Zhao Guangjie and Ping Liyan** Wood identification with PCR targeting noncoding chloroplast DNA [Journal] // Plant Mol Biol. - [s.l.] : Springer Science+Business Media B.V., 2011. - 77:609–617.
17. **Valledor L. [et al.]** RNA-free DNA Extraction Protocol from Pinus Tissues for Molecular Biology or HPCE/HPLC Analyses [Journal] // J. Plant Biochemistry & Biotechnology. - July 2009. - 18(2). - pp. 229-232.
18. **Rachmayanti Yanti [et al.]** DNA from processed and unprocessed wood: Factors influencing the isolation success [Journal] // Forensic Science International: Genetics. - [s.l.] : Elsevier, 2009. - 3. - pp. 185–192.
19. **Shepherd Lara D. and McLay Todd G.B.** Two micro-scale protocols for the isolation of DNA from polysaccharide-rich plant tissue [Journal] // J Plant Res. - 2011. - pp. 311-314.

20. **Salzer K. [et al.]** Isolation and characterization of polymorphic nuclear microsatellite loci in *Pinus cembra* L. [Journal] // PERMANENT GENETIC RESOURCES NOTE. - [s.l.] : Blackwell Publishing Ltd, 2009.
21. **Ahmed I. [и др.]** High-quality plant DNA extraction for PCR: an easy approach [Журнал] // J Appl Genet. - 2009 г.. - 50(2). - стр. 105-107.