



УДК 635.21:578.2:577.21

Слободян С.О., завідуючий сектором ДНК-технологій

Грицай Р.В., науковий співробітник

Олійник Т.М., кандидат с.-г. наук, доцент, с. н. с.

Тимошенко І.П., молодший науковий співробітник

Інститут картоплярства НААН

ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИДІЛЕННЯ ТА ЯКІСНИЙ АНАЛІЗ ДНК ПОЛЬОВИХ РОСЛИН КАРТОПЛІ

В результаті проведених досліджень вдосконалено методику виділення ДНК з польових рослин картоплі, що забезпечує швидке та якісне її виділення. На основі спектрофотометричного аналізу показано, що концентрація ДНК виділена із 100-150 мг зелених листків пробіркових та польових рослин картоплі при A_{260} , коливається від 158 мкг/мл до 489 мкг/мл. Чистота препаратів ДНК виділеної по модифікованій методиці є досить високою – 1,68-2,05 і її успішно можна застосовувати в роботах по вивченню молекулярно-генетичного поліморфізму рослин картоплі.

Ключові слова: картопля, чистота, ДНК, методика

Для виділення рослинної нуклеїнової кислоти (НК) користуються багатьма методами [1, 6, 8, 9]. Всі вони включають три основні етапи: гомогенізацію рослинної тканини; депротейнізацію; осадження. При детальному аналізі НК потрібні такі методи виділення, які б дозволяли отримати добре очищені препарати з достатньо довгими молекулами, що необхідно для клонування генів.

Суттєвий фактор при виділенні НК із рослинних клітин – ефективне руйнування клітинних стінок [3]. На жаль багато методів, що використовуються для цього, призводять до фрагментації і, відповідно, в кожній конкретній ситуації досягається певний компроміс між розміром нуклеїнової кислоти ДНК і її виходом. Ці труднощі можна частково подолати при використанні леофілізованого матеріалу. Однак звільнення високомолекулярної НК це тільки частина проблеми, оскільки екстракти рослинних клітин містять більшу кількість полісахаридів, танінів і пігментів, які в ряді випадків досить важко відділити. Крім того, деякі полісахаридоподібні домішки неможливо виявити звичайними аналітичними методами, які б не призвели до руйнування ДНК [4, 5]. Такі домішки перешкоджають правильному виявленню кількості нуклеїнових кислот спектрофотометричними методами, до того ж вони можуть пригнічувати активність більшості ферментів. Це може ускладнювати як аналіз НК, так і її клонування [2].

При виділенні ДНК з рослин *in vivo* ми зіткнулись з проблемою очищення ДНК від полісахаридів та пігментів, що містяться в більшій кількості у листках польових рослин порівняно з рослинами *in vitro*. В зв'язку з цим виникла необхідність вдосконалення методики виділення ДНК з рослин *in vivo* з метою

подальшого її використання для молекулярно-генетичного аналізу сортів картоплі.

Матеріали та методи досліджень. Матеріалом для оптимізації методик виділення ДНК слугували польові рослини та рослини *in vitro* сортів картоплі Базис, Билина, Щедрик та Луговська. Розчини та реактиви готували на MilliQ-воді, обробленій диетилпірокарбонатом (ДЕПК, “Millipore”). Весь посуд обробляли 0,1 М NaOH, промивали MilliQ-водою, обробленою ДЕПК та автоклавували, як і всі буферні розчини. Виділення ДНК з пробіркових та польових рослин картоплі проводили згідно методики Дж. Дрейпера, Р. Скотта “Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений” [2]. З метою якісного очищення нуклеїнової кислоти від полісахаридів та пігментів, що містяться в більшій мірі у листках польових рослин, в дані методики вносили модифікації.

Результати та обговорення. Методи виділення ДНК та її аналізу служать невід'ємною частиною багатьох молекулярно-генетичних досліджень рослин. Виділення ДНК з рослинного матеріалу це складніший процес, ніж з тканин тварин, оскільки рослинні екстракти містять більшу кількість полісахаридів та пігментів, від яких досить складно очистити НК. Деякі полісахариди пригнічують активність ферментів, що модифікують ДНК. Суттєвим негативним фактором під час виділення ДНК є руйнування клітинних стінок. Багато методів, які використовують для одержання ДНК, призводять до її фрагментації.

Для виділення ДНК відбирали близько 0,1-0,15 г зелених листків польових рослин та рослин *in vitro*, додавали по 1 мл лізуючого буферу (20 мМ Т-НСІ, 25 мМ ЕДТА, 20 мМ NaCl, 0,5 % Sarcosil) [2]. З метою



усунення впливу поліфенолів при виділенні ДНК з рослин *in vivo* у буфер для лізису ми додатково вводили 1-процентний меркаптоетанол, 2-процентний PVP-40, 2-процентний бромід цетилтриметиламоній (СТАВ).

Оскільки і у методиці Дж. Дрейпера, Р. Скотта (1991) [2] усунення РНК РНКазою А відбувається після стадії осадження нуклеїнових кислот, витрати часу на екстракцію ДНК досягають до 2-3 годин. Тому в буфер для лізису ми вводили РНКазу А у концентрації 100 мкг/мл, яка досить ефективно усуває РНК і при 65 °С, що зменшує затрати часу на екстракцію ДНК.

Гомогенну суміш інкубували у термостаті при 65 °С, центрифугували протягом 30 хв при 4000 об/хв. Депротейнізацію здійснювали, додаючи ацетат калію, який ефективно осаджує комплекси з білками та полісахаридами, і тим самим виключає застосування фенолу (оскільки фенол є дуже токсичним реагентом). Нуклеїнові кислоти осаджували 0,7-1 об'ємами ізопропанолу (попередньо охолодженого до -20 °С) протягом 30 хв при -20 °С. Осад нуклеїнових кислот тричі промивали 75-процентним етанолом та розчиняли у ТВЕ-буфері.

На рис. 1 представлений електрофорез сумарної ДНК, виділеної з польових та пробіркових рослин картоплі. Як видно, вихід ДНК є досить високим у всіх випадках.

Якість препаратів ДНК визначали за показниками оптичної густини (А) та концентрацією на спектрофотометрі BioSpectrometer basic "Eppendorf". На основі спектрофотометричного аналізу показано, що концентрація ДНК, виділена із 0,1-0,15 г зелених листків пробіркових та польових рослин картоплі при A_{260} , стано-

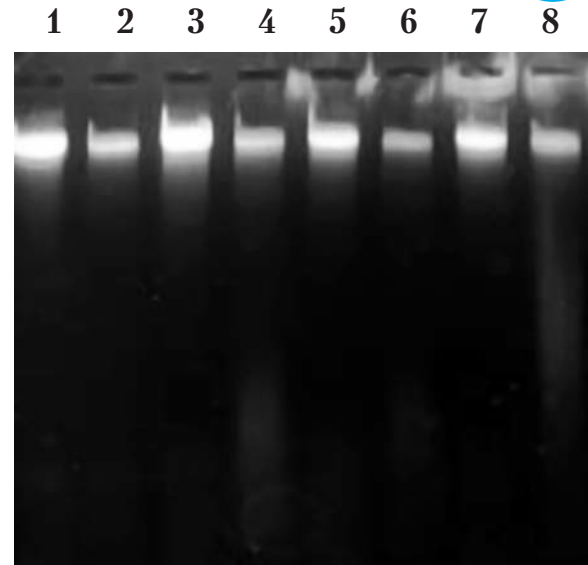


Рис. 1. Електрофорез сумарної ДНК з польових та пробіркових рослин картоплі
 1 – Базис (ДНК рослини *in vitro*)
 2 – Базис (ДНК рослини *in vivo*)
 3 – Биліна (ДНК рослини *in vitro*)
 4 – Биліна (ДНК рослини *in vivo*)
 5 – Щедрик (ДНК рослини *in vitro*)
 6 – Щедрик (ДНК рослини *in vivo*)
 7 – Луговська (ДНК рослини *in vitro*)
 8 – Луговська (ДНК рослини *in vivo*)

вить від 158 мкг/мл до 489 мкг/мл (рис. 2). Чистота препаратів ДНК виділеної за вдосконаленою нами методикою є досить високою – 1,68-2,05 (рис. 3) і знаходиться майже на однаковому рівні.

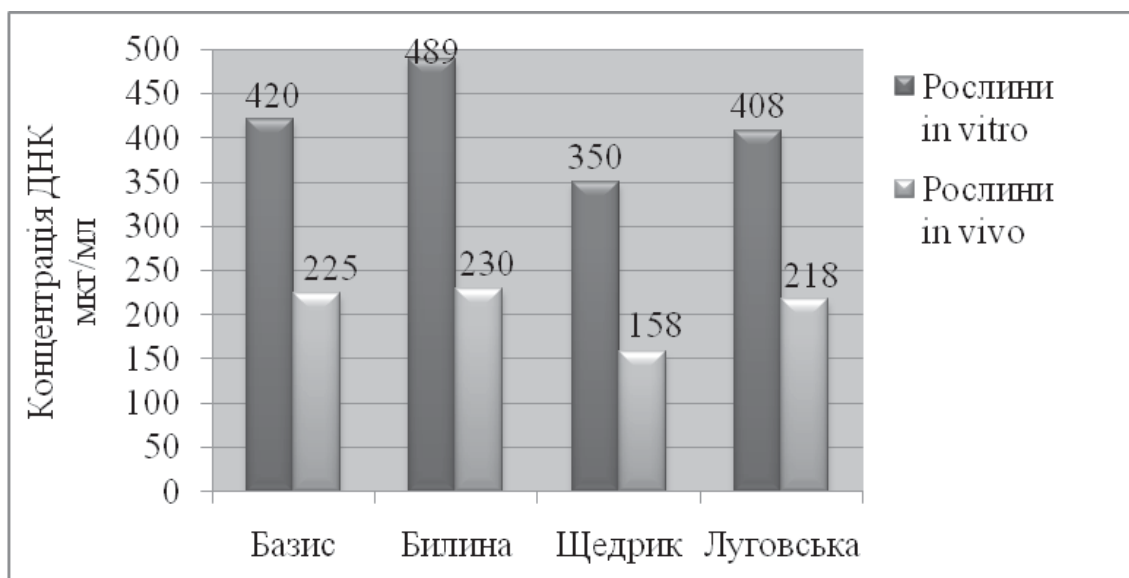


Рис. 2. Концентрація ДНК, виділена з пробіркових та польових рослин картоплі

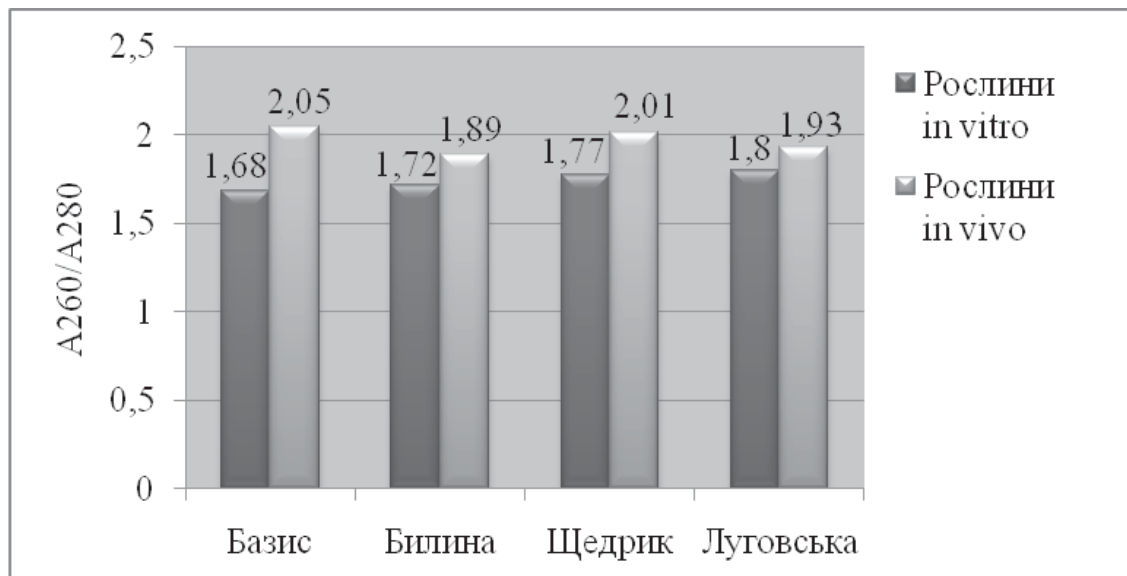


Рис. 3. Чистота ДНК (A_{260}/A_{280}), виділена з пробіркових та польових рослин картоплі

Таким чином дана методика забезпечує швидке та якісне виділення ДНК з мінімальними затратами коштів. На основі спектрофотометричного аналізу встановлено, що дану методику успішно можна застосовувати в роботах з вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму рослин картоплі.

Висновки

В результаті проведених досліджень нами оптимізовано методику, що забезпечує швидке, легке та якісне виділення ДНК з польових та рослин *in vitro*

картоплі. На основі спектрофотометричного аналізу встановлено, що ДНК, виділену згідно даної методики, успішно можна застосовувати в роботах по вивченню молекулярно-генетичного поліморфізму рослин картоплі.

Перспективи подальших досліджень. Оптимізована методика виділення ДНК з польових рослин в подальшому буде використовуватись для вивчення філогенетичних зв'язків різних видів і сортів картоплі та проведення паспортизації.

Література:

1. Источник для открытия : путеводитель по методикам и способам применения. – [3 изд.]. – Promega, 1996. – 404 с.
2. Дрейпер Дж. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений / Дж. Дрейпер, Р. Скотт // Генная инженерия растений: лаборатор. рук. / под ред. Дж. Дрейпера; [пер. с англ.]. – М.: Мир, 1991. – С. 236-276.
3. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic Escherichia coli strains isolated from humans / [A.B. Pacheco, B.E. Guth, K.C. Soares et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1997. – V. 35. – P. 1521-1525.
4. Hai-Rong Cheng. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts / Hai-Rong Cheng, Ning Jiang // Biotechnology Letters. – 2006. – V. 28. – P. 55-59.
5. Rapley R. The nucleic acid protocols handbook / R. Rapley. – Totowa: Humana Press Inc, 2000. – 1002 p.
6. Doyle J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // Phytochem. Bull. – 1987. – V. 19. – P. 11-15.
7. Doyle J.J. Isolation of plant DNA from fresh tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // Focus. – 1990. – № 12. – P. 13-15.
8. Маниатис Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сембрук; [пер. с англ.: А.А. Баева, К.Г. Скрыбина]. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
9. Douglas G.A. Simple and Rapid Method for Isolating Large Plasmid DNA from Lactic Streptococci / G.A. Douglas, L.L. McKay // Environ. Microbiol. – 1983. – V. 46, № 3. – P. 549-552.



В результате проведенных исследований усовершенствовано методика выделения ДНК из полевых растений картофеля, что обеспечивает быстрое и качественное ее выделение. На основе спектрофотометрического анализа показано, что концентрация ДНК, выделенной из 100-150 мг зеленых листьев пробирочных и полевых растений картофеля при A_{260} , колеблется от 158 мкг/мл до 489 мкг/мл. Чистота препаратов ДНК, выделенной по модифицированной методике, достаточно высока – 1,68-2,05 и ее успешно можно применять в работах по изучению молекулярно-генетического полиморфизма растений картофеля.

The research resulted in a improved of the DNA extraction from the field of potato plants, which provides fast and efficient DNA extraction. On the basis of spectrophotometric analysis showed that the concentration of DNA extracted from 100-150 mg of green leaves and field test-tube plants potato A_{260} ranges from 158 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 489 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Purity of DNA isolated by a modified method is high 1,68-2,05 and can be successfully applied in studies of the molecular and genetic polymorphism of potato plants.

УДК 635.21:631.527:632.4

Чередниченко Л.М., кандидат с.-г. наук
Інститут картоплярства НААН

ОЦІНКА НАДЗЕМНОЇ ЧАСТИНИ РОСЛИН СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ КАРТОПЛІ ЗА СТІЙКІСТЮ ПРОТИ АЛЬТЕРНАРІОЗУ НА ПРИРОДНОМУ ІНФЕКЦІЙНОМУ ФОНІ

Висвітлено результати проведеної оцінки новоствореного селекційного матеріалу картоплі в лабораторії селекції Інституту картоплярства протягом 2009-2012 рр. за стійкістю проти збудника альтернатозу на природному інфекційному фоні. Доведена можливість створення методом міжвидової гібридизації генотипів картоплі, які характеризуються підвищеною стійкістю проти захворювання. Виявлено гібридні комбінації з підвищеною стійкістю надземної частини рослин картоплі до збудника захворювання. Виділено перспективні гібриди для подальшого селекційного використання.

Ключові слова: картопля, сорти, гібриди, гриб, збудник захворювання, альтернатоз, оцінка, природний інфекційний фон, бал, ступінь стійкості

За даними досліджень республіканського гідрометеорологічного центру Республіки Білорусь в останні десятиліття встановлені істотні зміни кліматичних умов на території нашої країни. В Україні за останні десять років відмічена чітко виражена тенденція до потепління, обумовлена загальними планетарними змінами клімату [1].

Основною особливістю потепління, що відмічається, є зменшення річної суми опадів, а також нерівномірність їх випадання протягом року і в цілому за окремі роки, що в свою чергу привело до збільшення кількості посух, частіше в липні-серпні [1, 2].

В результаті глобальних кліматичних змін сталося розділення північної агрокліматичної зони, з'явилася Нова, тепліша агрокліматична зона на півдні Полісся, що характеризується коротшою і теплішою зимою, найбільш тривалим і теплим вегетаційним періодом. Це значною мірою змінило умови зростання і формування урожаю сільськогосподарських культур [1-3].

Певну стурбованість викликає невідповідність термічного режиму потребам рослин картоплі, особливо середньостиглих і пізніх сортів. Теплі зими, збільшення тривалості безморозного періоду сприяють накопиченню і збереженню в міжвегетаційний період грибних, бактеріальних, вірусних захворювань, а також виживаності шкідників, зростанню їх кількості і шкодочинності. Зона розташування Інституту картоплярства НААН має сприятливі погодні умови для розповсюдження грибних збудників хвороб картоплі, особливо для альтернатозу.

Альтернатоз (рання суха плямистість, макроспоріоз, суха концентрична плямистість) – широко розповсюджене захворювання картоплі на всіх континентах земної кулі.

Шкодоочинність захворювання визначається ступенем ураження вегетативної маси, зменшенням асиміляційної поверхні листків, змінами у фізіологічно-біологічних процесах ушкоджених рослин. У роки, спри-