

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ПРОБЛЕМ

Научная статья

УДК 633.81:577.113.083

DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-191-198



Оптимизация методики выделения ДНК для изучения генетического разнообразия эфиромасличных роз (*Rosa* L.)

С. Б. Сейтаджиева¹, С. З. Гучетль², С. В. Дидович¹, Е. В. Городня³

¹ Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, Симферополь, Россия

² Федеральный научный центр Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта, Краснодар, Россия

³ Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

Автор, ответственный за переписку: Севиля Бахтияровна Сейтаджиева, sepen@mail.ru

Актуальность. Эфиромасличные розы содержат большое количество органических веществ, ухудшающих очистку ДНК при выделении. Для связывания этих соединений во многих протоколах экстракции ДНК используют токсичные вещества (фенол, меркаптоэтанол). В связи с этим целесообразно оптимизировать методику выделения ДНК из эфиромасличных роз.

Материал и методы. В работе использовались образцы роз из Ботанического сада Крымского федерального университета, а также образцы из коллекции эфиромасличных роз селекционно-семеноводческого центра эфиромасличных культур НИИСХ Крыма. Выделение ДНК проводилось по модифицированному СТАВ-протоколу. Эффективность методики оценивалась методами спектрофотометрии, горизонтального электрофореза и постановкой ISSR-ПЦР.

Результаты. Препараты ДНК, выделенные модифицированным методом, хорошо визуализируются на электрофореграмме и имеют высокие спектрофотометрические показатели. Содержание ДНК в два раза выше в препаратах, полученных с использованием буфера для экстракции с ПВП, по сравнению с буфером без ПВП. Также концентрация выше в препаратах ДНК, выделенных из стеблей, чем из листьев. Параметры чистоты, выражаемые отношением поглощения на длинах волн $A_{260/280}$ и $A_{260/230}$, также выше у препаратов ДНК, экстрагированных из стеблей с обогащенным буфером, причем соотношение $A_{260/230}$ входит в диапазон нормы только в препаратах ДНК, выделенных из стеблей в присутствии ПВП. При этом очистка от белков эффективна без применения фенола и меркаптоэтанола благодаря двукратной промывке смесью хлороформа и изоамилового спирта (24 : 1).

Заключение. Использование ткани стеблей в качестве материала для исследований, добавление поливинилпирролидона (ПВП) в концентрации 2% в буфер для экстракции, а также повторная промывка смесью хлороформа и изоамилового спирта позволяют получить препараты ДНК с высокой концентрацией и показателями чистоты, входящими в диапазоны нормы, пригодные для изучения генетического разнообразия эфиромасличных роз методом ISSR-анализа.

Ключевые слова: эфиромасличные розы, экстракция ДНК, СТАВ-метод, концентрация ДНК, качество ДНК, ISSR-ПЦР

Благодарности: работа выполнена в рамках государственного задания № FNZW-2022-0006 «Молекулярно-генетические и физиолого-биохимические аспекты функционирования биологических процессов агрономически ценных микроорганизмов, продуктивных сортов растений и пород сельскохозяйственных животных».

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: Сейтаджиева С.Б., Гучетль С.З., Дидович С.В., Городня Е.В. Оптимизация методики выделения ДНК для изучения генетического разнообразия эфиромасличных роз (*Rosa* L.). *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2024;185(3):191-198. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-191-198

IDENTIFICATION OF THE DIVERSITY OF CULTIVATED PLANTS AND THEIR WILD RELATIVES FOR SOLVING FUNDAMENTAL AND APPLIED PROBLEMS

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-191-198

Optimization of the DNA isolation procedure for assessing the genetic diversity of essential oil roses (*Rosa* L.)

Sevilia B. Seitadzhieva¹, Saida Z. Guchetl², Svetlana V. Didovich¹, Ekaterina V. Gorodnyaya³¹ Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Russia² V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops, Krasnodar, Russia³ V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia**Corresponding author:** Sevilia B. Seitadzhieva, cepen@mail.ru

Background. High content of organic compounds that worsen nucleic acid purification in aromatic plants, as well as the use of such toxic substances as phenol and mercaptoethanol in many protocols for plant DNA isolation, make it advisable to take the above disadvantages into account when optimizing the DNA extraction technique for the work with essential oil rose plants.

Material and methods. Rose accessions from the Crimean Federal University's Botanical Garden, and those from the collection held by the Research Institute of Agriculture of Crimea were included in the study. DNA extraction was done according to a modified CTAB protocol. Effectiveness of the technique was assessed using spectrophotometry, horizontal electrophoresis, and ISSR-PCR.

Results. DNA preparations extracted with the modified technique were well visualized on the electropherogram and demonstrated high spectrophotometric values. DNA content was twice as high in preparations isolated with an extraction buffer with PVP, compared to a PVP-free buffer. The concentration was also higher in DNA extracts from stems than that from leaves. Purity parameters expressed by the absorption ratios at wavelengths $A_{260/280}$ and $A_{260/230}$ were again higher for DNA extracts from stems isolated with an enriched buffer; the $A_{260/230}$ ratio falling within the normal range only in DNA extracted from stems in the presence of PVP. Besides, DNA extracts were effectively purified from proteins without phenol or mercaptoethanol, due to double rinsing with a chloroform/isoamyl alcohol (24 : 1) mixture.

Conclusion. Using rose stem tissues as the research material, adding 2% PVP to the extraction buffer, and twofold rinsing with a chloroform/isoamyl alcohol mixture made it possible to obtain DNA extracts with high concentrations and purity indices within normal ranges suitable for the ISSR analysis of essential oil rose genetic diversity.

Keywords: essential oil rose, DNA extraction, CTAB method, DNA concentration, DNA quality, ISSR-PCR

Acknowledgements: this research was conducted within the framework of the state task, Project No. FNZW-2022-0006 "Molecular genetics, physiological and biochemical aspects of the functioning of biological processes in agronomically valuable microorganisms, productive plant cultivars, and farm animal breeds".

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Seitadzhieva S.B., Guchetl S.Z., Didovich S.V., Gorodnyaya E.V. Optimization of the DNA isolation procedure for assessing the genetic diversity of essential oil roses (*Rosa* L.). *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2024;185(3):191-198. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-191-198

Введение

Эфиромасличные розы относятся к числу востребованных культур благодаря широкому применению получаемых из них продуктов переработки. Наиболее ценным видом среди группы эфиромасличных роз является *Rosa × damascena* Mill. (роза дамасская) и ее разновидности, известная под названием «Казанлыкской розы». Роза дамасская – гибрид между *R. gallica* L. (р. французская, или р. галлика) и *R. canina* L. (р. собачья). Другим гибридом с *R. gallica*, относящимся к масличным розам, является *R. × centifolia* L. (р. столепестная, или столстная, или центифолия). Одним из способов повышения качества продукции является выведение сортов с улучшенными признаками. Исследования по оценке генетического разнообразия сортов являются важной составляющей научной базы для реализации этой задачи (Nazarenko et al., 2006; Zolotilov, Nevkrytaya, 2017; Suprun et al., 2020).

Успех молекулярно-генетических исследований растений напрямую зависит от количественного содержания и качества ДНК, которая в дальнейшем будет использована для постановки ПЦР. Выделение ДНК из фруктовых, ароматических и других растений (киви, яблоня, персик, мята, роза, полынь, цитронелла, базилик, пеларгония и т. д.) часто затруднительно из-за содержания таких ингибирующих веществ, как эфирные масла, вторичные метаболиты, полифенолы, полисахариды и др. Полисахариды повышают вязкость раствора, а полифенолы связываются с ДНК, придавая осадку коричневый цвет и делая его непригодным для исследований (Khanuja et al., 1999; Sahu et al., 2012; Jabbarzadeh et al., 2019; Hu et al., 2022).

Для устранения этих сложностей можно использовать ткани разных частей растений в качестве материала для исследований, поскольку химический состав в них может различаться (Kutlunina, Yermoshin, 2017).

Также целесообразно избегать применения таких токсичных веществ как фенол, β-меркаптоэтанол и др., традиционно используемых в стандартных протоколах экстракции растительной ДНК (Murray, Thompson, 1980; Doyle J.J., Doyle J.L., 1987; Demeke et al., 2009). Фенол-хлороформный метод является золотым стандартом для выделения ДНК и может быть использован для работы с разным материалом: растениями, кровью, суспензиями культур. Он обеспечивает высокий выход и является относительно недорогим. Одновременное применение двух органических растворителей повышает эффективность очистки ДНК от белков, поэтому фенол используется в комплексе с хлороформом и изоамиловым спиртом (Yeprintsev et al., 2008; Dairawan, Shetty, 2020). Меркаптоэтанол разрушает дисульфидные мостики в белках, нарушая их третичную и четвертичную структуру, а также ингибирует процессы, которые напрямую или косвенно повреждают ДНК. Кроме того, меркаптоэтанол элиминирует активность ферментов нуклеаз, освобождаяемых при лизисе клеток (Ryabushkina et al., 2012; Tiwari et al., 2017).

В качестве безопасной альтернативы β-меркаптоэтанола применяют 1–2-процентный поливинилпирролидон (ПВП) с низкой молекулярной массой (10 000), который осаждает ДНК, не уменьшая ее концентрацию. ПВП связывает полифенолы и препятствует окрашиванию осадка ДНК в темный цвет (Sahu et al., 2012; Vodchits et al., 2014; Brishten, Vasilevich, 2021). Очищенная ДНК в дальнейшем может быть использована для оценки генетиче-

ского разнообразия методом ISSR-анализа (Godwin et al., 1997; Sukhareva, Kuluev, 2018).

Цель работы – оптимизация методики выделения ДНК для дальнейшей оценки генетического разнообразия образцов коллекции эфиромасличных роз Научно-исследовательского института сельского хозяйства Крыма (НИИСХ Крыма) путем сравнения эффективности экстракции из разных частей растений и добавления 2-процентного ПВП в СТАВ-буфер.

Материалы и методы исследований

Материалом для исследований служили образцы роз из Ботанического сада им. Н.В. Багрова Крымского федерального университета и из коллекции эфиромасличных роз селекционно-семеноводческого центра эфиромасличных культур НИИСХ Крыма (<https://ckp-rf.ru/usu/507515/>) (табл. 1).

За основу протокола выделения был взят СТАВ-метод, описанный в литературе (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987; Huang et al., 2013). Исследуемый материал был разделен на две группы: 1) образцы молодых листьев и стеблей, обработанные стандартным СТАВ-буфером (2-процентный СТАВ; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 1,4 M NaCl; 0,2-процентный β-меркаптоэтанол); 2) тот же материал, экстрагируемый в СТАВ-буфере с добавлением 2-процентного ПВП.

1. 100 мг ткани измельчали в ступке с 1 мл предварительно прогретого при 65°C СТАВ-буфера, переносили в пробирки и термостатировали при 65°C 1 час, перемешивая каждые 15 мин.

2. Добавляли равное количество смеси хлороформа и изоамилового спирта (24 : 1), смешивали интенсивным встряхиванием до получения однородной суспензии и центрифугировали 10 мин при 14 000 g и 4°C.

3. Отбирали верхнюю фазу в новые пробирки и повторяли пункт 2.

4. Переносили верхнюю фазу в новые пробирки, добавляли равный объем охлажденного при –20°C изопропанола и смешивали аккуратным переворачиванием. Оставляли на 30 мин при –20°C и центрифугировали при 14 000 g и 4°C в течение 10 мин.

5. Удаляли супернатант и добавляли 70-процентный этанол, охлажденный при –20°C, в объеме, равном объему изопропанола. Смешивали переворачиванием и центрифугировали 10 мин при 14 000 g и 4°C.

6. Сливали супернатант и отбирали остатки спирта наконечником.

7. Высушивали в термостате при 65°C с открытой крышкой в течение 5 мин.

8. Добавляли 100 мкл буфера TE, термостатировали при 65°C 10 мин и встряхивали на микроцентрифуге «Вортекс» до растворения осадка. Полученный экстракт ДНК хранили при –20°C.

Количество и качество выделенной ДНК оценивали методами спектрофотометрии на приборе SPECTROstar Nano в двух повторностях (BMG LABTECH, Германия) и горизонтального электрофореза в 1,5-процентном агарозном геле. Полученные препараты ДНК использовались для постановки ISSR-ПЦР с праймерами ISSR-A34, ISSR-B10, ISSR-B13, ISSR-230/41, ISSR-807, ISSR-812, ISSR-834 и ISSR-840. Реакционная смесь общим объемом 20 мкл имела следующий состав: 10 нг ДНК, однократный буфер, 0,2 mM дНТФ («Евроген» Россия), 10 пМ праймера («Евроген» Россия), 2,5 единицы активности (е. а.) Hot Start Taq-полимеразы (Qiagen, Германия). Ам-

Таблица 1. Образцы розы, использованные в исследованиях

Table 1. Rose accessions used in the research

Образец / Accession	Биологический статус / Biological status
Образцы Ботанического сада им. Н.В. Баргова / Accessions from the N.V. Bagrov Botanical Garden	
<i>Rosa canina</i> L.	вид / species
‘Ватерлоо’ / ‘Waterloo’	сорт / cultivar (<i>R. moschata</i> Mill.)
Образцы из Болгарии / Accessions from Bulgaria	
‘Белая’ / ‘Belaya’	сорт / cultivar (<i>R. alba</i> L.)
‘Искра’ / ‘Iskra’	сорт / cultivar (<i>R. damascena</i> Mill.)
‘Казанлыкская’ / ‘Kazanlykskaya’	сорт / cultivar (<i>R. damascena</i> Mill.)
‘Свежен’ / ‘Svezhen’	сорт / cultivar (<i>R. damascena</i> Mill.)
Образцы НИИСХ Крыма / Accessions from the RIA of Crimea	
‘Аура’ / ‘Aura’	сорт / cultivar (<i>R. damascena</i> Mill. × <i>R. gallica</i> L.)
‘Золушка’ / ‘Zolushka’	сорт / cultivar [‘Весна’ / ‘Vesna’ (<i>R. damascena</i> Mill. × <i>R. gallica</i> subsp. <i>eryosyla</i> Kell. var. <i>austriaca</i> Grantz f. <i>panonica</i> Br.) × ‘Крымская Красная’ / ‘Krymskaya Krasnaya’ (<i>R. gallica</i> L.)]
<i>R. indica</i> Major	вид / species
‘Лада’ / ‘Lada’	сорт / cultivar [‘Белая’ / ‘Belaya’ (<i>R. alba</i> L.) × ‘Мичуринка’ / ‘Michurinka’ (<i>R. damascena</i> Mill.) × <i>R. gallica</i> L.]
‘Лань’ / ‘Lan’	сорт / cultivar [‘Белая’ / ‘Belaya’ (<i>R. alba</i> L.) × ‘Мичуринка’ / ‘Michurinka’ (<i>R. damascena</i> Mill.) × <i>R. gallica</i> L.]
‘Легрина’ / ‘Legrina’	сорт / cultivar [‘Белая’ / ‘Belaya’ (<i>R. alba</i> L.) × ‘Мичуринка’ / ‘Michurinka’ (<i>R. damascena</i> Mill.) × <i>R. gallica</i> L.]
‘Радуга’ / ‘Raduga’	сорт / cultivar [‘Весна’ / ‘Vesna’ (<i>R. damascena</i> Mill. × <i>R. gallica</i> subsp. <i>eryosyla</i> Kell. var. <i>austriaca</i> Grantz f. <i>panonica</i> Br.) × ‘Крымская Красная’ / ‘Krymskaya Krasnaya’ (<i>R. gallica</i> L.)]

плификация проводилась в термоциклере T-100 (BIORAD, США) по следующей программе: начальная денатурация при 95°C – 15 мин; далее 35 циклов: денатурация при 94°C – 30 с, отжиг при 49,0–58,0°C – 30 с, элонгация при 72°C – 1 мин; финальная элонгация при 72°C – 10 мин. Продукты ПЦР визуализировали с помощью горизонтального электрофореза в 2-процентном агарозном геле в 0,5-кратном ТАЕ-буфере с окрашиванием бромистым этидием в течение часа при напряжении тока 120 В.

Результаты и обсуждение

В нашей работе применение фенола в смеси с хлороформом и изоамиловым спиртом для очистки ДНК от белков было заменено двукратной промывкой экстракта смесью хлороформа и изоамилового спирта для лучшей очистки. После добавления изопропанола для осаждения ДНК смесь выдерживали при –20°C в течение 30 мин, так как, согласно данным литературы, количество выпавшего осадка зависит от длительности инкубации (Huang et al., 2013; Tiwari et al., 2017). В результате был получен слабоокрашенный осадок, который хорошо растворялся в ТЕ-буфере.

При визуализации ДНК методом горизонтального электрофореза отмечено, что ДНК, выделенная из стеб-

лей, менее фрагментирована (Vodchits et al., 2014) и имеет длину 10 000–13 000 пн (рис. 1).

Данные спектрофотометрического анализа параметров ДНК отображены в таблицах 2 и 3.

При использовании стандартного СТАВ-буфера концентрации препаратов ДНК в большинстве случаев составляли в среднем 100 нг/мкл. Препараты ДНК, выделенные с добавлением ПВП в экстрагирующий буфер, имеют концентрации больше 200 нг/мкл, что может говорить о лучшей очистке от примесей, повышающей выход препарата.

Спектрофотометрический показатель качества, выражаемый отношением поглощения на длинах волн $A_{260/280}$, характеризует степень очистки от белковых примесей и в большинстве случаев входит в установленный диапазон нормы 1,8–2,0. Если этот показатель меньше 1,8, это говорит о недостаточной очистке от белков, если больше 2,0 – о присутствии РНК в растворе (Tiwari et al., 2017).

Спектрофотометрический показатель качества, выражаемый отношением поглощения на длинах волн $A_{260/230}$ (диапазон нормы 2,0–2,2), является индикатором загрязнения полифенолами, полисахаридами и вторичными метаболитами (Tiwari et al., 2017). Отмечено, что только у препаратов ДНК, экстрагированных из стеблей обогащенным СТАВ-буфером, этот параметр входит в установленный диапазон нормы (см. табл. 3).

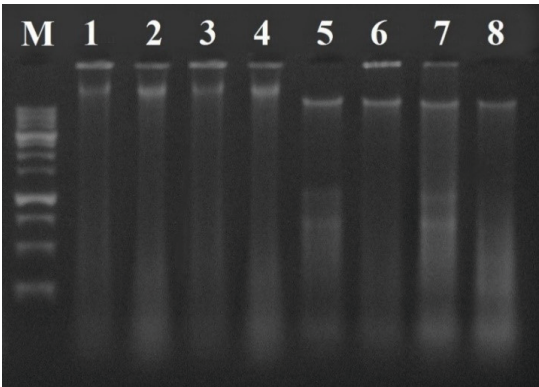


Рис. 1. Электрофореграмма препаратов ДНК, выделенных из листьев и стеблей сортов ‘Лань’ и ‘Ватерлоо’ стандартным (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987) и модифицированным СТАВ-буфером: 1 – ‘Лань’, лист, без ПВП; 2 – ‘Лань’, лист, с ПВП; 3 – ‘Ватерлоо’, лист, без ПВП; 4 – ‘Ватерлоо’, лист, с ПВП; 5 – ‘Лань’, стебель, без ПВП; 6 – ‘Лань’, стебель, с ПВП; 7 – ‘Ватерлоо’, стебель, без ПВП; 8 – ‘Ватерлоо’, стебель, с ПВП.
М – маркер молекулярного веса ДНК Sky-High 250–10 000 пн

Fig. 1. Electropherogram of DNA extracted from the leaves and stems of cvs. ‘Lan’ and ‘Waterloo’ using standard and modified buffers: 1 – ‘Lan’, leaf, without PVP; 2 – ‘Lan’, leaf, with PVP; 3 – ‘Waterloo’, leaf, without PVP; 4 – ‘Waterloo’, leaf, with PVP; 5 – ‘Lan’, stem, without PVP; 6 – ‘Lan’, stem, with PVP; 7 – ‘Waterloo’, stem, without PVP; 8 – ‘Waterloo’, stem, with PVP.
M – DNA ladder Sky-High 250–10,000 bp

Таблица 2. Концентрации ДНК в препаратах, выделенных из листьев и стеблей сортов ‘Лань’ и ‘Ватерлоо’ стандартным и модифицированным СТАВ-буфером

Table 2. Concentrations of DNA extracted from the leaves and stems of cvs. ‘Lan’ and ‘Waterloo’ using standard and modified CTAB buffers

Сорт / Cultivar	Орган растения / Plant organ	Концентрация, нг/мкл / Concentration, ng/μl	
		СТАВ-буфер без ПВП / CTAB buffer without PVP	СТАВ-буфер с ПВП / CTAB buffer with PVP
‘Лань’ / ‘Lan’	Лист / Leaf	128,2 ± 2,62	229,4 ± 0,67
	Стебель / Stem	90,6 ± 1,28	249,3 ± 1,77
‘Ватерлоо’ / ‘Waterloo’	Лист / Leaf	95,3 ± 0,66	225,0 ± 0,43
	Стебель / Stem	94,1 ± 1,45	230,3 ± 1,67

Примечание: измерение проведено в двукратной повторности
Note: measurements taken in two replications

Таблица 3. Качественные показатели препаратов ДНК, выделенных из листьев и стеблей сортов ‘Лань’ и ‘Ватерлоо’ стандартным и модифицированным СТАВ-буфером

Table 3. Quality characteristics of DNA extracted from the leaves and stems of cvs. ‘Lan’ and ‘Waterloo’ using standard and modified CTAB buffers

Сорт / Cultivar	Орган растения / Plant organ	Показатель качества A _{260/280} / Quality index for A _{260/280}		Показатель качества A _{260/230} / Quality index for A _{260/230}	
		СТАВ-буфер без ПВП / CTAB buffer without PVP	СТАВ-буфер с ПВП / CTAB buffer with PVP	СТАВ-буфер без ПВП / CTAB buffer without PVP	СТАВ-буфер с ПВП / CTAB buffer with PVP
‘Лань’ / ‘Lan’	Лист / Leaf	1,80 ± 0,02	1,84 ± 0,01	1,73	1,81 ± 0,01
	Стебель / Stem	1,84 ± 0,01	1,85 ± 0,01	1,83 ± 0,01	2,03 ± 0,02
‘Ватерлоо’ / ‘Waterloo’	Лист / Leaf	1,73 ± 0,02	1,83	1,84 ± 0,01	1,79 ± 0,01
	Стебель / Stem	1,86 ± 0,01	1,90 ± 0,01	1,92 ± 0,01	2,02 ± 0,01

Примечание: измерение проведено в двукратной повторности
Note: measurements taken in two replications

Постановка ПЦР с использованием в качестве матрицы препаратов ДНК, экстрагированных из стеблей роз СТАВ-буфером, содержащим ПВП в концентрации 2%, и ISSR-праймерами, позволила четко различить амплифицированные фрагменты на электрофореграмме, что говорит о высоком качестве препаратов ДНК и отсутствии компонентов, ингибирующих реакцию (рис. 2).

сахаридов может быть выше, чем в других частях растения.

Четкая визуализация продуктов ISSR-ПЦР подтверждает эффективность данной методики экстракции ДНК и ее пригодность для дальнейшего генотипирования эфиромасличных роз методом ISSR-маркирования.

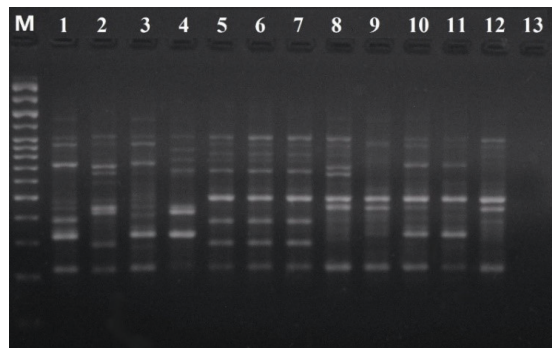


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймером ISSR-840: 1 – *Rosa canina* L.; 2 – ‘Аура’; 3 – ‘Белая’ (*R. alba* L.); 4 – *R. indica* Major; 5 – ‘Искра’; 6 – ‘Казанлыкская’; 7 – ‘Свежен’; 8 – ‘Золушка’; 9 – ‘Лада’; 10 – ‘Лань’; 11 – ‘Легрина’; 12 – ‘Радуга’; 13 – отрицательный контроль.
М – маркер молекулярного веса ДНК Step100 Long 100–3000 пн

Fig. 2. Electropherogram of PCR products obtained with the primer ISSR-840: 1 – *Rosa canina* L.; 2 – ‘Aura’; 3 – ‘Belaya’ (*R. alba* L.); 4 – *R. indica* Major; 5 – ‘Iskra’; 6 – ‘Kazanlykskaya’; 7 – ‘Svezhen’; 8 – ‘Zolushka’; 9 – ‘Lada’; 10 – ‘Lan’; 11 – ‘Legrina’; 12 – ‘Raduga’; 13 – negative control.
M – DNA Ladder Step100 Long 100–3000 bp

Добавление в СТАВ-буфер 2-процентного ПВП позволяет увеличить концентрацию ДНК в полученных препаратах в два раза по сравнению с применением стандартного СТАВ-буфера как для листьев, так и для стеблей. Этот показатель выше в препаратах ДНК, выделенных из стеблей, чем из листьев, что говорит о лучшей очистке ДНК от полисахаридов и, соответственно, о более эффективной экстрагируемости ДНК из этого вида ткани. Причем у сорта ‘Лань’ эти различия выражены больше. Предположительно, это связано с тем, что сорт ‘Лань’ является эфиромасличным в отличие от декоративного сорта ‘Ватерлоо’, являющегося гибридом розы мускусной, и особенности химического состава в разных частях растения обуславливают эту разницу.

Более качественную очистку препарата из стеблей в присутствии ПВП подтверждают другие спектрофотометрические параметры ДНК. Показатель чистоты $A_{260/280}$ соответствует нормальным значениям, что подтверждает эффективность двукратной промывки смесью хлороформа и изоамилового спирта (24 : 1) без применения фенола и меркаптоэтанола. Этот параметр выше у препаратов ДНК, полученных из стеблей, по сравнению с препаратами, выделенными из листьев. Также отмечено его увеличение при использовании буфера с ПВП.

Параметр $A_{260/230}$ более информативен при оценке качества очистки ДНК. Для обоих сортов отмечены значительные различия между показателями у препаратов, полученных из листьев и стеблей. Также видны отличия в параметрах при использовании стандартного и обогащенного буфера для аналогичных видов тканей. При этом только у препаратов ДНК, выделенных из стеблей со СТАВ-буфером, обогащенным ПВП, соотношение $A_{260/230}$ имеет значение, соответствующее норме. Это согласуется с данными других авторов (Ryabushkina et al., 2012; Brishten, Vasilevich, 2021) о том, что в листьях, обычно используемых для выделения ДНК, содержание поли-

Заключение

В результате проведенных исследований оптимизирована методика выделения ДНК из растений рода *Rosa*. Показана эффективность экстракции из ткани стеблей с использованием СТАВ-буфера с добавлением поливинилпирролидона (ПВП) в концентрации 2%. Полученные таким образом препараты ДНК лучше очищены от полифенолов, полисахаридов и других органических веществ по сравнению с препаратами ДНК из листьев. В протоколе не используются токсичные вещества меркаптоэтанол и фенол, применяемые для осаждения белков. Препарат ДНК эффективно очищается от этих соединений двукратной промывкой смесью хлороформа и изоамилового спирта. Оптимизированная методика экстракции ДНК позволяет получить препарат с количественными и качественными показателями, пригодными для его дальнейшего использования в изучении генетического разнообразия образцов коллекции эфиромасличных роз НИИСХ Крыма. Данный протокол может быть рекомендован для применения в исследованиях по генотипированию и изучению генетического разнообразия роз.

References / Литература

- Brishten A.M., Vasilevich I.V. Comparative characterization of DNA extracted with the CTAB-PVP-mercaptoethanol protocol from different plant organs (bud, leaf, and stem) (Sravnitel'naya kharakteristika vydelennoy DNK protokolom "TsTAB-PVP-merkaptioetanol" iz raznykh organov (pochka, list, stebel) rasteniy). In: *Scientific Potential of the Youth for the Future of Belarus: Proceedings of the XV International Youth Scientific and Practical Conference; Pinsk; April 9, 2021 (Nauchny potentsial molodezhi – budushchemu Belarusi: materialy XV mezhdunarodnoy molodezhnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii; Pinsk; 9 apre-*

- lya 2021 g.). Pinsk: Polessky State University; 2021. p.62-64. [in Russian] (Бриштен А.М., Василевич И.В. Сравнительная характеристика выделенной ДНК протоколом «ЦТАБ- PVP- меркаптоэтанол» из разных органов (почка, лист, стебель) растений. В кн.: *Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси: материалы XV международной молодежной научно-практической конференции; г. Пинск; 9 апреля 2021 г.* Пинск: Полесский государственный университет; 2021. С.62-64). URL: <https://www.polessu.by/sites/default/files/files/21-itc/Научный%20потенциал%20молодежи%20-%20%20%20%20%20часть.pdf> [дата обращения: 15.02.2023].
- Dairawan M., Shetty P.J. The evolution of DNA extraction methods. *American Journal of Biomedical Science and Research*. 2020;8(1):39-45. DOI: 10.34297/AJBSR.2020.08.001234
- Demeke T., Ratnayaka I., Phan A. Effects of DNA extraction and purification methods on real-time quantitative PCR analysis of Roundup Ready soybean. *Journal of AOAC International*. 2009;92(4):1136-1144. DOI: 10.1093/jaoac/92.4.1136
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1987;19(1):11-15.
- Godwin I.D., Aitken E.A.B., Smith L.W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*. 1997;18(9):1524-1528. DOI: 10.1002/elps.1150180906
- Hu C.G., Honda C., Kita M., Zhang Z., Tsuda T., Moriguchi T. A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2002;20(1):69. DOI: 10.1007/BF02801935
- Huang Q.X., Wang X.C., Kong H., Guo Y.L. Guo A.C. An efficient DNA isolation method for tropical plants. *African Journal of Biotechnology*. 2013;12(19):2727-2732. DOI: 10.5897/AJB12.524
- Jabbarzadeh Z., Khosh-Khui M., Salehi H., Saberivand A. Optimization of DNA extraction for ISSR studies in seven important rose species of Iran. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*. 2009;3(4):639-642.
- Khanuja S.P.S., Shasany A.K., Darokar M.P., Kumar S. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant molecular biology Reporter*. 1999;17(1):74. DOI: 10.1023/A:1007528101452
- Kutlunina N.A., Yermoshin A.A. Molecular genetics methods in plant studies: educational and methodological guide (Molekulyarno-geneticheskiye metody v issledovanii rasteniy: uchebno-metodicheskoye posobiye). Yekaterinburg: Ural University; 2017. [in Russian] (Кутлунина Н.А., Ермошин А.А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений: учебно-методическое пособие. Екатеринбург: Издательство Уральского университета; 2017).
- Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. 1980;8(19):4321-4325. DOI: 10.1093/nar/8.19.4321
- Nazarenko L.G., Korshunov V.A., Kochetkov E.S. Rose cultivation for essential oil production (Efiromaslichnoye rozovodstvo). L.G. Nazarenko (ed.). Simferopol: Tavriya; 2006. [in Russian] (Назаренко Л.Г., Коршунов В.А., Кочетков Е.С. Эфиромасличное розоводство / под ред. Л.Г. Назаренко. Симферополь: Таврия; 2006).
- Ryabushkina N.A., Omasheva M.E., Galiakparov N.N. Specific features of DNA extraction from plant objects (Spetsifika vydeleniya DNK iz rastitelnykh ob'yektov). *Biotechnology. Theory and Practice*. 2012;(2):9-26. [in Russian] (Рябушкина Н.А., Омашева М.Е., Галиакпаров Н.Н. Специфика выделения ДНК из растительных объектов. *Биотехнология. Теория и практика*. 2012;(2):9-26). DOI: 10.11134/btp.2.2012.1
- Sahu S.K., Thangaraj M., Kathiresan K. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *ISRN Molecular Biology*. 2012;2012:205049. DOI: 10.5402/2012/205049
- Scientific and Technological Infrastructure of the Russian Federation. Collections of Essential Oil, Spicy, Aromatic and Medicinal Plants: [website]. [in Russian] (НТИРФ. Коллекции эфирномасличных, пряно-ароматических и лекарственных растений: [сайт]). URL: <https://ckp-rf.ru/usu/507515/> [дата обращения 10.02.2023].
- Sukhareva A.S., Kuluev B.R. DNA markers for genetic analysis of crops. *Biomcs*. 2018;10(1):69-84. [in Russian] (Сухарева А.С., Кулуев Б.Р. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений. *Биомика*. 2018;10(1):69-84). DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-15
- Suprun I.I., Plugatar S.A., Stepanov I.V., Naumenko T.S. Analysis of genetic relationships of genotypes of the genus *Rosa* L. from the collection of Nikita Botanical Gardens using ISSR and IRAP DNA markers. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):474-480. DOI: 10.18699/VJ20.639
- Tiwari S., Tomar R.S., Tripathi M.K., Ahuja A. Modified protocol for plant genomic DNA isolation. *Indian Research Journal of Genetics and Biotechnology*. 2017;9(4):478-485.
- Vodchits N.V., Zaitseva I.O., Kirikivoch I.G., Yurchenko E.O., Volotovitch A.A. Comparison of the methods of total genomic DNA extraction from highbush blueberry. *Bulletin of Polessky State University. Series in Natural Sciences*. 2014;(2):25-30. [in Russian] (Водчиц Н.В., Зайцева И.О., Кирикович И.Г., Юрченко Е.О., Волотович А.А. Сравнительный анализ методов экстракции общей геномной ДНК голубики высокорослой. *Вестник Полесского государственного университета. Серия природоведческих наук*. 2014;(2):25-30).
- Yepintsev A.T., Popov V.N., Fedorin D.N. Identification and study of gene expression: educational and methodological manual for universities (Identifikatsiya i issledovaniye ekspressii genov: uchebno-metodicheskoye posobiye dlya vuzov). Voronezh: Voronezh State University; 2008. [in Russian] (Епринцев А.Т., Попов В.Н., Федорин Д.Н. Идентификация и исследование экспрессии генов: учебно-методическое пособие для вузов. Воронеж: Воронежский государственный университет; 2008).
- Zolotilov V.A., Nevkrytaya N.V. Laying out and exploiting essential oil rose nurseries: guidelines (Zakladka i ekspluatatsiya matochnikov rozy efiromaslichnoy: metodicheskoye rekomendatsii). Simferopol: Research Institute of Agriculture of Crimea; 2017. [in Russian] (Золотилов В.А., Невкрытая Н.В. Закладка и эксплуатация маточников розы эфиромасличной: методические рекомендации. Симферополь: НИИСХ Крыма; 2017).

Информация об авторах

Севиля Бахтияровна Сейтаджиева, младший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, 295043 Россия, Республика Крым, Симферополь, ул. Киевская, 150, cepen@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1334-2758>

Саида Заурбиевна Гучетль, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральный научный центр Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта, 350038 Россия, Краснодар, ул. Филатова, 17, saida.guchetl@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2193-5230>

Светлана Витальевна Дидович, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, 295043 Россия, Республика Крым, Симферополь, ул. Киевская, 150, sv-alex.68@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6569-0602>

Екатерина Васильевна Городняя, кандидат биологических наук, доцент, Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, 295007 Россия, Республика Крым, Симферополь, пр. Академика Вернадского, 4, e.gorodnyaya@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1142-9630>

Information about the authors

Sevilia B. Seitadzhieva, Associate Researcher, Research Institute of Agriculture of Crimea, 150 Kievskaya St., Simferopol 295493, Russia, cepen@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1334-2758>

Saida Z. Guchetl, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops, 17 Filatova St., Krasnodar 350038, Russia, saida.guchetl@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2193-5230>

Svetlana V. Didovich, Cand. Sci (Agriculture), Leading Researcher, Research Institute of Agriculture of Crimea, 150 Kievskaya St., Simferopol 295493, Russia, sv-alex.68@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6569-0602>

Ekaterina V. Gorodnyaya, Cand. Sci (Biology), Associate Professor, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, 4, Akademika Vernadskogo Ave., Simferopol 295007, Republic of Crimea, Russia, e.gorodnyaya@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1142-9630>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 16.05.2023; одобрена после рецензирования 13.07.2024; принята к публикации 04.09.2024.

The article was submitted on 16.05.2023; approved after reviewing on 13.07.2024; accepted for publication on 04.09.2024.