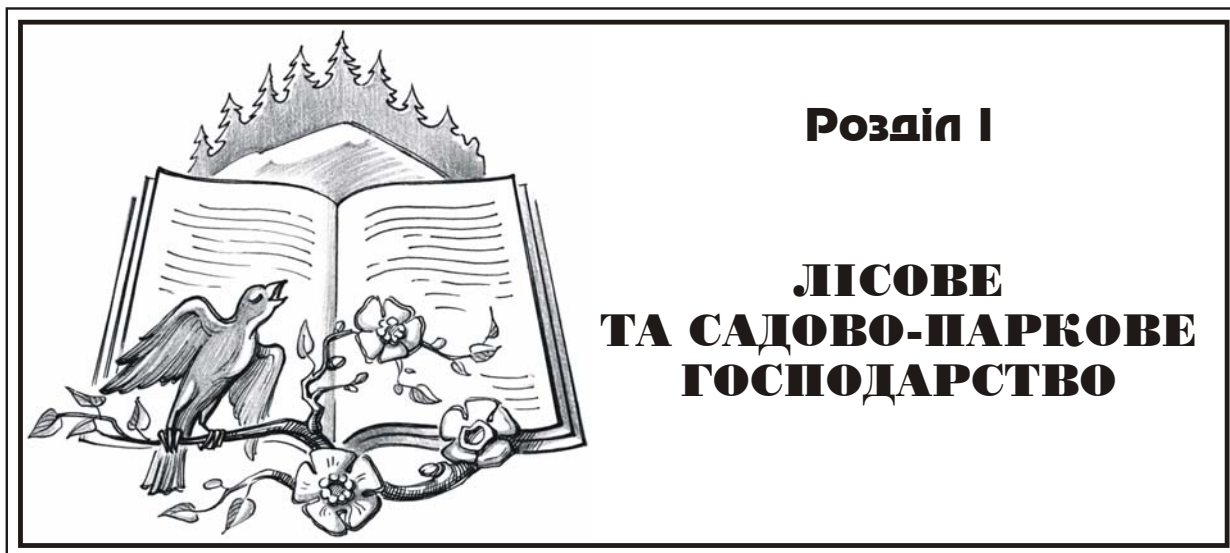




Розділ I

ЛІСОВЕ ТА САДОВО-ПАРКОВЕ ГОСПОДАРСТВО

УДК 630*165.53

Доц. Р.Т. Гут, канд. біол. наук; інж. М.В. Радченко;
проф. Г.Т. Криницький, д-р біол. наук – УкрДЛТУ

СУЧАСНІ МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ СУМАРНОЇ ДНК З РОСЛИННИХ ОРГАНІЗМІВ

Наведено сучасні дані щодо особливостей структурно-функціональної організації геному рослинних організмів, проаналізовано основні методичні підходи до виділення сумарної ДНК з рослинного матеріалу та принципи, що лежать в їхній основі. Знання переваг та недоліків вказаних методів є запорукою отримання успішних результатів при проведенні молекулярно-біологічних досліджень.

Doc. R.T. Gout; Eng. M.V. Radchenko; Prof. G.T. Krynytskyi – USUFWT

Plant nucleic acid purification, technical hints and application

This guide gives an overview of recent advances in molecular genetics to genome structure and organization in plants, and also main techniques used for plant nucleic acid purification which provides useful guidelines for successful results.

Біорозмаїття нашої планети включає близько двох мільйонів видів організмів. У ході еволюції біосфери одні види організмів виникали, інші зникали. У найближчій перспективі біорозмаїття нашої планети може скоротитись на 500 тисяч видів і підвидів тварин та рослин [4]. Тому вивчення генетичного потенціалу лісів, розробка заходів щодо збереження їхнього біорозмаїття є завданням першочергового значення.

Питання охорони і збереження лісів тісно пов'язане з генетико-селекційними роботами. В історії розвитку цих робіт можна виділити декілька принципово важливих і якісно відмінних напрямків: еколого-географічний, фенотипічний, генетико-популяційний та морфо-фізіологічний [1, 6, 7]. На даний час особливо актуальним є використання в цих напрямках молекулярно-генетичних маркерів, оскільки вони дозволяють зрозуміти структуру геному рослинних організмів, його організацію та функціонування [9, 50], дослідити гени, що визначають розвиток будь-якої ознаки рослинного організму [5]. Незважаючи на те, що молекулярно-генетичні маркери в дослідженнях лісових порід використовуються значно рідше, ніж в дослідженнях сільсько-

господарських культур, в останні роки нагромадилась велика кількість інформації стосовно організації, картування та еволюції їхнього геному, диференційної експресії генів [10, 18, 21], а також молекулярних маркерів, методів створення рекомбінантних ДНК та міжродового перенесення генів. Отримані дані дають змогу долати міжвидові бар'єри у дерев лісових порід. З використанням методів генетичної інженерії створено ряд трансгенних рослин, що містять гени філогенетично неспоріднених рослин і навіть вищих і нижчих організмів, включаючи бактерії та віруси [12, 28, 35, 74].

Водночас необхідно зауважити, що генно-інженерні методи досліджень лісових деревних порід, які б дозволили створити банки даних для ідентифікації генотипів у популяціях, на лісонасінневих ділянках і плантаціях, скласти генетичні карти плюсових та елітних дерев, дослідити фундаментальні процеси первинного та вторинного біосинтезу, створити трансгенні рослини є нерозробленими. Для вирішення сучасних лісівничих завдань, в першу чергу, необхідно освоїти методи екстракції та очистки ДНК основних лісоутворюючих порід України.

Молекулярна організація геному ядра, хлоропластів та мітохондрій лісових деревних видів

Дезоксирибонуклеїнові кислоти (ДНК), рибонуклеїнові кислоти (РНК) та білки – універсальні детермінанти генетичної поведінки прокаріотичних та еукаріотичних організмів. У рослинних організмів генетична інформація є розподіленою між органелами клітини: ядром, мітохондріями та хлоропластами.

Загальна характеристика генетичної інформації ядра. ДНК ядра входить до складу хромосом. Хромосоми – це стабільні ядерні структури, здатні до самовідтворення і забезпечення рівного розподілу генетичного матеріалу при поділі клітин. Ці властивості забезпечують три структурні елементи: реплікатори, центромери і теломери. До складу хромосом входить: хроматин – комплекс дволанцюгової ДНК з гістоновими (*H1*, *H2A*, *H2B*, *H3*, *H4*) та іншими білками, які переважно називають негістоновими (рис. 1) [59]. В ДНК ядра закодована основна інформація про будову структурних та каталітичних білків і перебіг основних молекулярних та біохімічних процесів у клітині та організмі в цілому.

Нуклеотидний склад ядерної ДНК вищих рослин характеризується високою варіабельністю – від 34 % ГЦ-пар у гінкго до 51 % ГЦ-пар у представників роду *Hordeum* [8]. Одночасно яДНК¹ характеризується дуже високим вмістом 5-метилцитозину. Так, у деяких рослин метильовано до 50 % залишків цитозину [2, 3]. Кількість хромосом, що припадає на один геном у лісових деревних порід, змінюється від 6 до 23 серед покритонасінних видів [77] та від 9 до 19 серед голонасінних [33]. Найкраще дослідженими голонасінними деревними породами є види родини *Pinaceae*. Кількість хромосом, що припадає на їх геном, є кратною 11 або 12, тобто характеризується незначною мінливістю.

¹ яДНК – ядерна ДНК; мДНК – мітохондрійна ДНК; хДНК – хлоропластна ДНК; тРНК – транспортна РНК; рРНК – рибосомна РНК, тпн – тисяч пар нуклеотидів; СТАВ-метод – метод з використанням основного компонента цетилтриметиламонійбромід, ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція.

Голонасінні лісові деревні види – це переважно рослини з диплоїдним набором хромосом рівним 24; виняток становить *Pseudotsuga menziesii*, що має $2n = 26$. Поліплоїди серед голонасінних трапляються дуже рідко [34, 35, 77]. Відомо тільки кілька природних поліплоїдів, серед яких вид *Sequoia sempervirens* – гексаплоїд ($2n = 6 \times 11 = 66$), вид *Juniperus chinensis pfitzeriana* – тетраплоїд ($2n = 4 \times 11 = 44$).

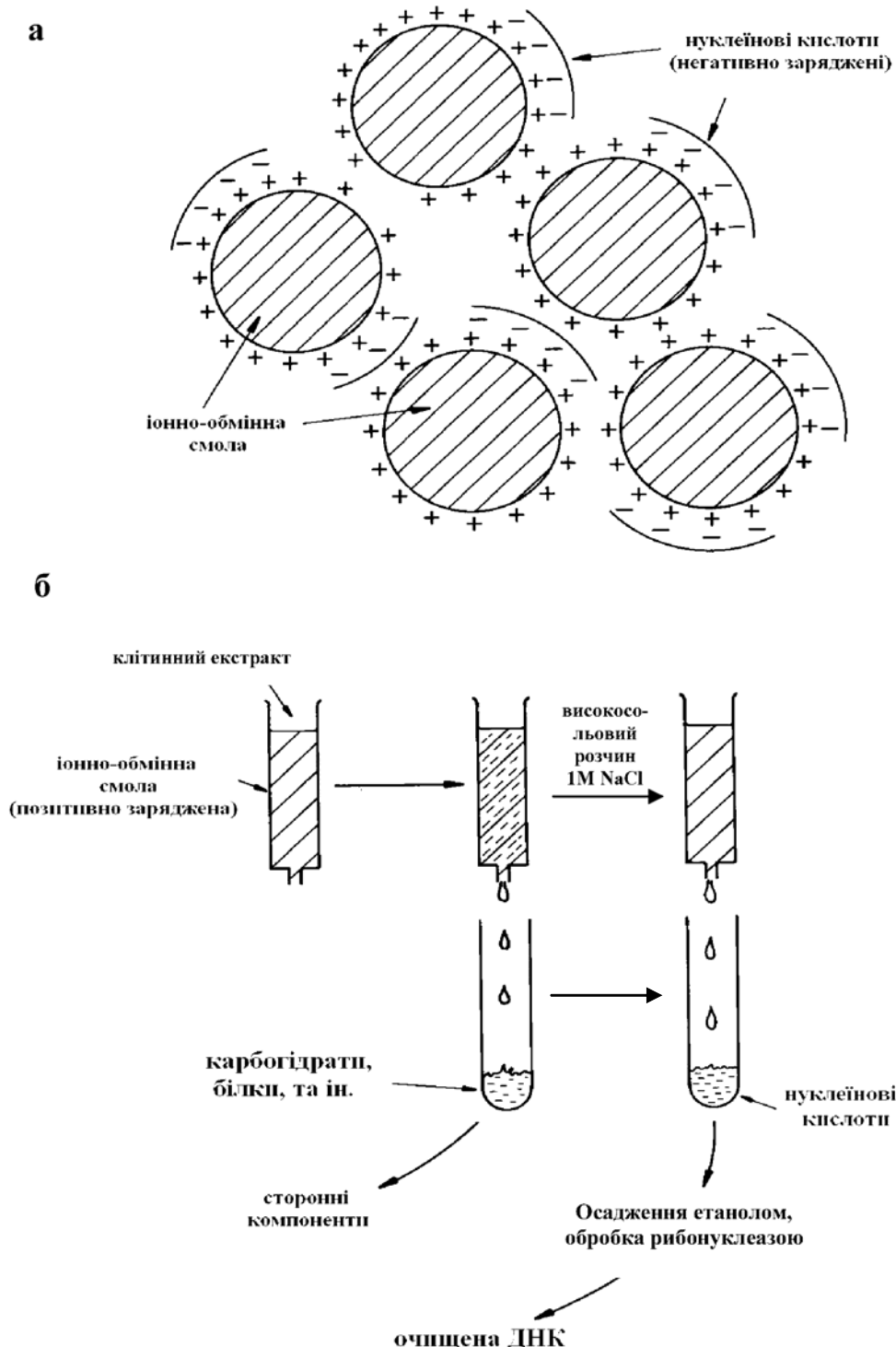


Рис. 1. Виділення сумарної ДНК рослин з використанням іонообмінної хроматографії: а – додавання смоли безпосередньо до клітинних екстрактів; б – додавання клітинних екстрактів до смоли, упакованої в хроматографічній колонці

Цитологічними дослідженнями родини *Pinaceae* показано значну подібність каріотипів (одна субметацентрична та одинадцять метацентричних

хромосом на геном) [56, 62]. Через відсутність процесу подвійного запліднення, ендосперм голонасінних видів є гаплоїдним і тому широко використовується в генетичних наукових дослідженнях. Яскравими прикладами деревних голонасінних рослин, що містять гаплоїдний набір хромосом в ендоспермі, є роди *Pinus*, *Abies*, *Cedrus* [57]. Щоправда у 1997 році С. Пікот та М. Маутаві [57], використовуючи метод лазерної цитометрії, продемонстрували, що деякі види роду *Cupressaceae* містять поліплоїдний ендосперм. Зокрема, ендосперми *Cupressus arizonica*, *Juniperus oxycedrus* та *Thuja orientalis* містять в ядрі гаплоїдний або диплоїдний набір хромосом, тоді як *Cupressus atlantica* та *Cupressus sempervirens* можуть містити гаплоїдний, диплоїдний, триплоїдний, тетраплоїдний, пентаплоїдний та гексаплоїдний набори хромосом. Такі поліплоїди очевидно виникають внаслідок внутрішньоклітинного повторного поділу (ендоредуплікації), або внутрішньоклітинного мітозу [47], якому передують множинне злиття ядер [57]. Ось чому перед проведенням науково-генетичних досліджень необхідно перевірити плоїдність ендосперму.

Порівняно з голонасінними явище поліплоїдії у покритонасінних розповсюджене ширше [77], зокрема, у родів *Salix* $n=19$ (родина *Salicaceae*), *Tilia* $n=41$ (родина *Tiliaceae*), *Morus*, $n=14$ (родина *Moraceae*), *Acer*, $n=13$ (родина *Aceraceae*). Явище поліплоїдії не виявлено, у деяких родів родини *Fagaceae* (*Fagus*, *Quercus*, $n=12$); *Myrtaceae* (*Eucalyptus*, $n=11$); *Diptocarpaceae* (*Diptocarpus*, $n=10$). Такі дані дозволяють припустити, що поліплоїдія відіграє важливу роль в еволюції покритонасінних [27].

Лісові деревні рослини характеризуються великою різноманітністю ДНК ядра або значною гетерогенністю яДНК [23, 31, 45, 49, 73]. Для вивчення їхніх розмірів використовується ряд методів: мікроспектрофотометрія [49], кінетика реасоціації [37, 38, 58], проточна цитометрія [48, 73]. Сукупність цих трьох методів дає чіткі та достовірні результати. У табл. 1 подані розміри геномів та кількість хромосом в клітинах лісових деревних порід.

Використовуючи метод кінетики реасоціації ДНК, Мікша та Готта [48, 73] вперше у 1973 році показали, що геноми голонасінних видів, зокрема *Pinus resinosa*, *Pinus banksiana*, *Picea glauca*, мають більші розміри, ніж геноми покритонасінних [23]. Наступні експерименти показали, що близько $\frac{3}{4}$ геному хвойних становлять повторювані нуклеотидні послідовності і тільки 20-30 % припадає на унікальні послідовності [58, 37]. Таким чином, великі розміри ядерного геному у рослинних організмів пов'язані із наявністю значної кількості повторюваних нуклеотидних послідовностей. Водночас унікальні послідовності (одна копія на геном) у голонасінних можуть становити менше, ніж 1 % від загальної кількості ядерної ДНК [37, 38].

Повторювані послідовності ДНК у геномі належать до двох категорій: тандемні повторювані нуклеотидні послідовності, які включають теломерні, субтеломерні та центромерні паліндромні повтори, сателітну ДНК та нуклеотидні послідовності генів, що кодують рибосомну (рРНК) та транспортну РНК (тРНК) [16, 17, 20, 29, 30, 43, 51, 61] і нуклеотидні послідовності, розсіяні по геному (дисперсні), що включають різні родини ретротранспозонів [41]. Основними серед них є ретроелементи з довгими кінцевими повторами

(*LTR*-елементи), ретроелементи без довгих кінцевих повторів, короткі елементи, розсіяні по геному ядра (*SINE's*), довгі елементи, розсіяні по геному ядра (*LINE's*) та псевдогени [15, 76, 40]. Ці розсіяні по геному повторювані одиниці можуть бути мовчазними або активно експресуватися.

Табл. 1. Кількість хромосом та розміри геному у лісових деревних порід [10].

Видова назва	Диплоїдний набір хромосом (2n)	DNA (pg/1C)
<i>Abies alba</i> Mill.	24	16.6
<i>Cunninghamia lanceolata</i> Hook.	22	13.6
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	22	11.6
<i>Eucalyptus grandis</i>	22	0.6
<i>Ginkgo biloba</i> L.	24	10.0
<i>Larix laricina</i> K. Koch.	24	9.5
<i>Larix decidua</i> Mill.	24	9.9
<i>Metasequoia glyptostroboides</i> Hu et Cheng.	22	6.5
<i>Picea abies</i> (L.) Karsten	24	14.8
<i>Picea glauca</i> Voss	24	20.2
<i>Picea mariana</i> B.S.P.	24	15.8
<i>Pinus contorta</i> Deugl. Ex Loud	24	18.9
<i>Pinus elliottii</i> Engelm	24	23.3
<i>Pinus gerardiana</i> Wall.	24	28.7
<i>Pinus lambertiana</i> Dougl.	24	29.6
<i>Pinus pinaster</i> Ait.	24	24.4
<i>Pinus radiata</i> Don.	24	22.0
<i>Pinus rigida</i> Mill.	24	20.8
<i>Pinus resinosa</i> Ait.	24	23.4
<i>Pinus strobus</i> L.	24	25.7
<i>Pinus sylvestris</i> L.	24	27.8
<i>Pinus taeda</i> L.	24	21.7
<i>Pinus wallichiana</i> A.B. Jacks	24	24.6
<i>Populus deltoides</i> Marsh.	38	0.5
<i>Pseudotsuga menziesii</i> Franco	26	19.1

Найновіші методи вивчення структури, функцій та еволюції геному базуються на генетичних ДНК-маркерах, які відкрили нову еру в молекулярній генетиці рослин та лісових деревних порід зокрема. Розрізняють маркери ділянок структурних генів, що кодують амінокислотні послідовності, маркери некодуючих ділянок генів та маркери різних послідовностей ДНК, відношення яких до структурних генів, як правило, невідоме.

Загальна характеристика генетичної інформації хлоропластів. У багатьох видів рослин добре вивчена та охарактеризована структура геному хлоропластів. Він представлений двонитковою кільцевою молекулою ДНК, яка в межах виду залишається достатньо консервативною [25, 52]. Розміри такої ДНК сягають від 120 до 217 тпн., переважно 150 тпн. Геном хлоропластів рослин, зокрема деревних лісових порід, включає певну кількість генів (але далеко не всіх), необхідних для функціонування хлоропластів і підтримання їх структури: чотири гени, що кодують рРНК (16S, 23S, 4.5S, 5S), близько тридцяти генів, що кодують тРНК, гени фітосистем, *rbcL*-ген (кодує

велику субодиницю рибулозо-1,5-бісфосфаткарбоксилази/оксигенази) і більш ніж 50 генів, які кодують білки. Різниця у розмірах геномів хлоропластів пов'язана з наявністю пари великих (10-28 тпн) інвертованих повторів, що розмежовуються малою (*SSC*) та великою (*LSC*) однокопійними ділянками ДНК [32, 38, 52, 66, 74]. Значну кількість мутацій ідентифіковано в так званих "гарячих точках", часто локалізованих поблизу *SRC*-районів. Наприклад, у *Pseudotsuga menziensis* такі точки відкриті у гіперваріабельних ділянках повторюваних послідовностей геному хлоропластів, переважно як результат часткової дуплікації генів *tRNA*. Мутації в "гарячих точках" – це основна відмінність консервативних послідовностей ДНК хлоропластів серед видів роду *Pinus* та видів *Larix decidua*, *Larix leptolepis*, *Picea glauca*, *Pseudotsuga menziensis*, *Sequoia sempervirens*, *Calocedrus deccurens*, *Cryptomeria japonica*. На основі послідовностей ДНК хлоропластів, особливо *rbcL*-генів, досліджуються філогенетичні зв'язки деревних видів, зокрема у родин *Betulaceae*, *Salicaceae*, *Pinaceae*, *Cupresaceae*, *Taxodiaceae* [10].

Загальна характеристика генетичної інформації мітохондрій. Геноми мітохондрій вищих рослин складаються з кільцевих та лінійних молекул ДНК різних розмірів (200 тпн – 2400 тпн.) [55, 64, 65]. Великий розмір геному мітохондрій зумовлений наявністю інтронів та повторюваних послідовностей (великих та малих диспергованих повторів, що служать центрами гомологічної рекомбінації) [53, 54, 55], більшими розмірами генів, дуплікаціями генів, більшою кількістю генів, процесами рекомбінації геному мітохондрій з геномами хлоропластів або ядра [53, 54]. Гени мітохондрій кодують білки, задіяні до процесів транскрипції, трансляції, реплікації та рекомбінації свого геному, а також білки окисного фосфорилування (*atp*-гени) та продукти, які забезпечують цитоплазматичну стерильність у особин чоловічої статі (*cms*-гени) [44, 63].

мДНК еволюціонує набагато швидше, ніж ядерна, а мутації у ній відбуваються майже у десять разів частіше. В результаті виникає широкий внутрішньовидовий поліморфізм, і істотні зміни виявляються навіть в межах кількох поколінь. Завдяки високій швидкості мутування поліморфізм центрів рестрикції стає дуже зручним параметром при популяційно-генетичних дослідженнях рослин [24, 69].

Методи виділення сумарної ДНК деревних рослин

Основоположними методами в чисельних молекулярно-біологічних підходах, що використовуються при вивченні рослинних організмів і які визначають успіх досліджень, є методи виділення сумарної ДНК. Всі вони включають чотири основні методичні етапи: відбір та зберігання рослинної фітомаси; руйнування рослинного матеріалу з подальшим вивільненням вмісту клітин; видалення усіх компонентів клітинних екстрактів за винятком ДНК; концентрування отриманих препаратів ДНК [11, 60].

Етап відбору рослинної фітомаси та її зберігання. Етап відбору рослинної фітомаси є надзвичайно важливим, оскільки впливає на легкість та ефективність виділення, а також концентрацію та чистоту водного розчину

виділеної сумарної ДНК. Залежно від подальшої експериментальної мети на цьому етапі необхідно враховувати: вік рослин, тип рослинної тканини, яку використовуватимуть у роботі, специфічні умови її росту (інтенсивність та спектр світла, тривалість світлового дня, кількість поживних речовин та води) [11, 70]. Вік, тип тканини та умови росту рослини впливають на її фітомасу та накопичення таких вторинних метаболітів як полісахариди, поліфеноли, флавоноїди. Ці метаболіти за своїми хімічними властивостями часто подібні до нуклеїнових кислот, тому їх важко усунути з препаратів ДНК. Вторинні метаболіти та хімічні реагенти (солі, феноли), що залишаються в результаті процедури виділення сумарної ДНК, спричиняють непередбачувані результати подальших експериментів: пригнічують ферментативні реакції (обернену транскрипцію, ПЛР, реакції рестрикційного аналізу), призводять до неточного мікроспектрофотометричного аналізу, до зміни електрофоретичної рухливості молекул ДНК, до помилок дозування, пов'язаних із підвищеною в'язкістю препаратів ДНК, до деградації нуклеїнових кислот [70].

Етап відбору рослинної фітомаси найчастіше базується на виборі молодих, здорових рослин, які часто, перед безпосереднім використанням в експериментах, поміщають на один або два дні у темноту. Така процедура дозволяє запобігти накопиченню високого рівня вторинних метаболітів у тканинах рослин. Для правильного відбору рослинної тканини необхідно враховувати її вік, плоідність, кількість вакуолей, властивості клітинних стінок (наприклад кількість лігніну), рівень генетичної експресії. Переважно обирають молоді тканини, які складаються з великої кількості дрібних клітин і які, відповідно, містять більшу кількість молекул нуклеїнових кислот, а їхні клітинні стінки легше руйнуються. Крім цього, відповідний об'єм молодої тканини містить менше вторинних рослинних метаболітів порівняно зі старими тканинами.

Рослинна фітомаса рідко використовується відразу після відбору, тому розроблені прості та ефективні методи її зберігання, які забезпечують цілісність нуклеїнових кислот. Неправильне зберігання рослинних зразків призводить до деградації молекул ДНК. Розрізняють тимчасові та довготривалі методи зберігання рослинних зразків. До тимчасових методів належать зберігання при температурі +4 °С, в герметично закритих ємностях з метою запобігання дегідратації. Тривалість такого зберігання залежить від робочого матеріалу: листові пластинки і видозмінені листові пластинки (голки) – один день, бруньки та зразки великого розміру (гілки, корені) – кілька днів. Серед довготривалих методів зберігання розрізняють:

- заморожування, коли цілі або розтерті зразки зберігаються при температурі –80 °С;
- висушування, з використанням силікагелів, дегідраторів харчових продуктів, ліофілізаторів [19, 70]. Тривалість виготовлення таких зразків повинна складати менше, ніж 24 год з наступним зберіганням в герметичних умовах, в темноті, при кімнатній температурі;
- зберігання розтертих зразків у буферах лізису, які розроблені відповідними комерційними фірмами.

Етап руйнування рослинного матеріалу з подальшим вивільненням вмісту клітин. Етап руйнування рослинного матеріалу проводять з метою подальшого вивільнення рідкого вмісту клітин [60]. Недостатнє руйнування

зразків веде до неповного вивільнення і відповідно нижчої концентрації молекул ДНК у водному розчині. Розрізняють два основних підходи до руйнування: фізичні, коли клітини рослинних зразків руйнуються тривалою механічною дією та біохімічні, коли лізис клітин здійснюється з використанням хімічних реагентів, які розщеплюють клітинні стінки і мембрани клітин та органел. Використання біохімічних методів для рослинних організмів є мало-ефективним, частіше застосовують фізичні методи. До фізичних методів належить розтирання рослинного матеріалу з використанням ступки та товкача, гомогенізатора або млинка.

Найбільш поширений метод руйнування полягає в розтиранні зразків рослинного матеріалу за присутності рідкого азоту з використанням ступки та товкача. Таким методом можна розтерти як велику, так і малу кількість рослинної фітомаси. Малий об'єм фітомаси часто розтирають, використовуючи модифіковане обладнання. Модифікація залежить від типу рослинної тканини і базується на руйнуванні з використанням скляного бруска, пластикового товкачика або дерев'яної палички та мікроцентрифужної пробірки об'ємом 1,5-2 мл. Залежно від надходження рослинного зразка такі модифікації призводять до зниження концентрації ДНК в отриманих препаратах на 20-80 %. Водночас такі підходи дозволяють уникнути перехресного забруднення зразків у серійних дослідах.

Гомогенізатори – це спеціально розроблені відповідними фірмами прилади для руйнування м'яких свіжих тканин в присутності буферу лізису. Їх дія базується на обертанні ротора з дуже великою швидкістю, що спричиняє руйнування тканин комбінуванням турбулентної та механічної дії. Такі гомогенізатори не використовуються для руйнування твердих тканин (гілки, корені).

Млинки – це прилади для руйнування м'яких та твердих тканин рослинного організму за допомогою вольфрамовокарбідних, сталевих або скляних кульок. Тканини руйнуються у присутності буферу лізису, якщо зразок свіжий, або у присутності рідкого азоту, якщо матеріал заморожений. Оптимальні параметри руйнування визначаються емпірично і залежать від розміру, типу кульок, швидкості їх обертання та моделі млинка, тривалості руйнування і кількості вихідного матеріалу. Деякі млинки дозволяють розтерти до 200 зразків протягом 2-4 хвилини.

Етап видалення усіх компонентів клітинних екстрактів за винятком ДНК. Основними компонентами розтертого рослинного матеріалу є зруйновані клітинні стінки, мембрани та рідкий вміст клітини. До таких зразків додають буфер екстрагування й усувають залишки клітинних стінок та мембран шляхом центрифугування. При цьому в клітинних екстрактах залишаються в основному білки, РНК, ДНК та вуглеводи. Для усунення з такого екстракту усіх компонентів, за винятком ДНК, використовують дві принципово різні методики: іонообмінну хроматографію на смолах; обробку клітинних екстрактів хімічними та біохімічними реагентами [45, 46, 60].

Використання іонообмінної хроматографії базується на принципі електростатичних взаємодій. Негативно заряджені молекули ДНК зв'язуються з позитивно зарядженими поверхнями іонообмінних хроматографічних

смоли (рис. 1). Цього можна досягти двома способами: додаванням смоли безпосередньо до клітинних екстрактів (рис. 1а); додаванням клітинних екстрактів до смоли, упакованої в хроматографічній колонці (рис. 1б). Нуклеїнові кислоти зв'язуються із смолою і залишаються у колонці, а сторонні компоненти, що несуть позитивний або нейтральний заряд, проходять через колонку. Однак необхідно зауважити, що додавання розчинів з високою концентрацією солей дестабілізує електростатичну взаємодію молекул нуклеїнових кислот та іонообмінної смоли.

Розрізняють ряд методів виділення сумарної ДНК шляхом обробки клітинних екстрактів хімічними та біохімічними реагентами: *СТАВ*-метод [26, 45, 60, 67, 68]; метод Делапорта [11, 22]; метод Рауза [11]; центрифугування в градієнті хлористого цезію [11], їх модифікації та методи з використанням комерційних наборів реагентів.

СТАВ-метод виділення сумарної ДНК з рослинних організмів базується на використанні детергенту броміду цетилтриметиламонію (ЦТМБ), який утворює нерозчинні комплекси з нуклеїновими кислотами (рис. 2). Такі комплекси осаджують центрифугуванням, при цьому в бюретці екстрагування залишаються білки, вуглеводи та інші сторонні компоненти. Осад ресуспендують в 1М NaCl , що спричиняє дисоціацію комплексів нуклеїнова кислота – ЦТМБ. Далі нуклеїнові кислоти осаджують етанолом, а РНК усувають обробкою рибонуклеазами (рис. 2) [26, 45, 60, 67, 68].

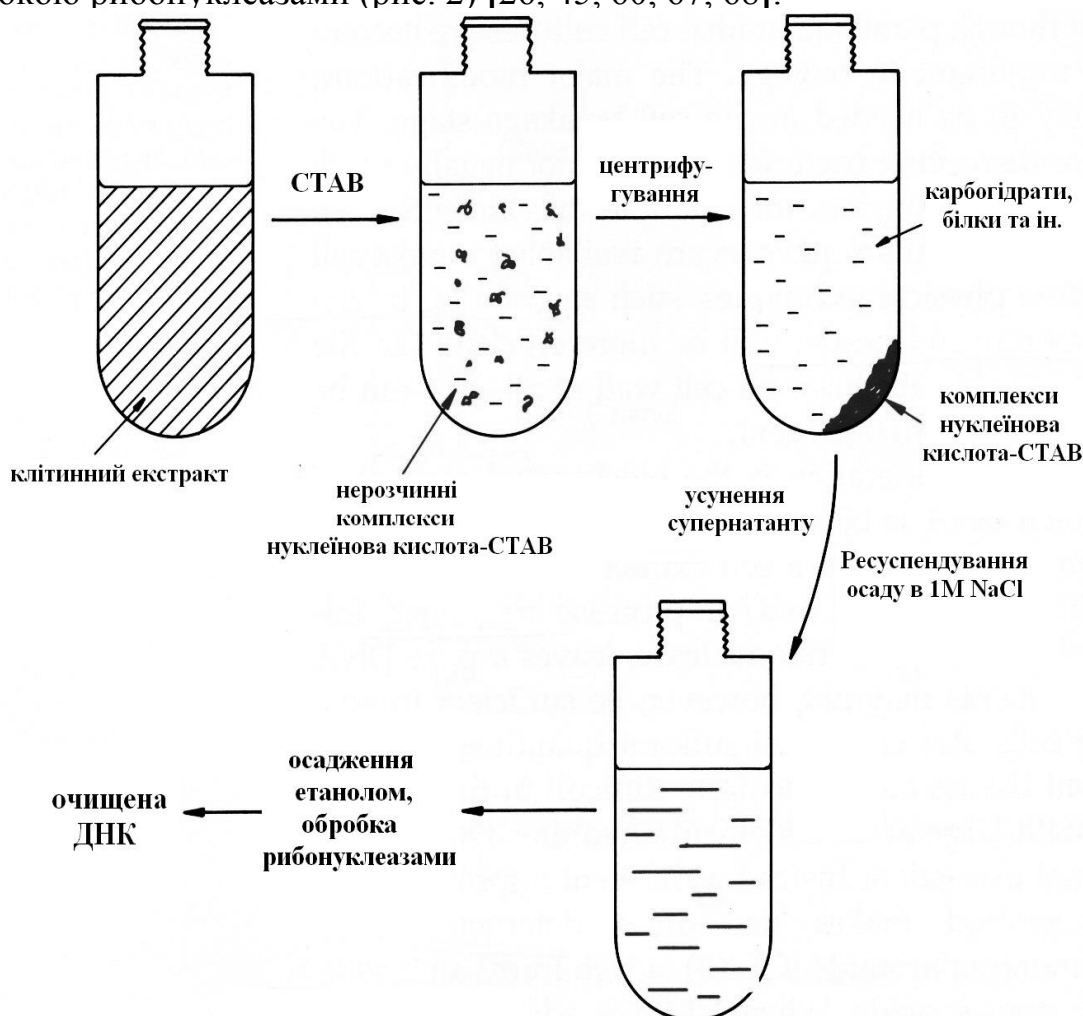


Рис. 2. Виділення сумарної ДНК рослин *СТАВ*-методом

Метод Делапорта виділення сумарної ДНК з рослинних організмів базується на проведенні таких операцій: розтиранні рослинних тканин у буфері лізису, що містить детергент додецилсульфат натрію; фільтруванні лізату; осадженні сторонніх компонентів екстракту (білків, вуглеводів та ін.) розчинами з високою концентрацією солей; обробці рибонуклеазою водних розчинів ДНК з наступним переосадженням спиртом [11, 22]. Концентрація та чистота препаратів ДНК, виділених таким методом, є різною залежно від виду рослин.

Метод Рауза полягає у механічному руйнуванні рослинних зразків з наступною інкубацією у буфері екстрагування, при температурі +90°C протягом 20 хв. [68]. Такий лізат використовують безпосередньо у подальших дослідженнях. Препарати сумарної ДНК рослин, отримані за методом Рауза, часто непридатні для використання у чутливих реакціях. Вони містять сторонні компоненти, що пригнічують ряд ферментативних реакцій та часто призводять до деградації ДНК. У зв'язку з цим даний метод в експериментальній роботі використовується рідко.

Табл. 2. Порівняльна характеристика методів виділення сумарної ДНК рослинних організмів

Параметри	Комерційні набори реагентів	СТАВ-метод	Метод Делапорта	Метод Рауза	Центрифугування в градієнті хлористого цезію
Зразки	Рослинні клітини та тканини	Рослинні клітини та тканини	Свіжі рослинні тканини	Рослинні клітини та тканини	Рослинні тканини
Використання методу для великої кількості видів рослин	так	ні	ні	ні	так
Якість препаратів ДНК	висока	середня	низька	дуже низька	висока
Осадження етанолом	необов'язкове	обов'язкове	обов'язкове	необов'язкове	обов'язкове
Час отримання 24 зразків ДНК	менше однієї години	2-4 години, переосадження протягом ночі	2-4 години, переосадження протягом ночі	одна година	12 годин
Зручність методу	висока	середня	низька	висока	низька
Методи зберігання зразків ДНК	довготермінові	довготермінові	тимчасові	свіжі зразки	довготермінові
Результати використання препаратів ДНК у подальшій роботі	відмінні	середні	низькі	дуже низькі	відмінні

Метод виділення сумарної ДНК рослинних організмів центрифугуванням у градієнті хлористого цезію базується на механічному руйнуванні тканин, їх екстрагуванні в буфері, що містить детергент, обробці екстракту про-

теазами, осадженні нуклеїнових кислот ізопропанолом, центрифугуванні водного розчину очищеної сумарної ДНК у градієнті хлористого цезію в присутності бромистого етидію [60]. Останній етап триває кілька десятків годин. Препарати ДНК, отримані вказаним методом, є високоочищеними та висококонцентрованими.

Методи виділення сумарної ДНК з рослинних організмів з використанням комерційних наборів реагентів базуються на двох основних підходах, наведених вище. Деякі набори реактивів забезпечують виділення сумарної ДНК із 192 зразків одночасно. Такі методи виділення є надзвичайно ефективними, оскільки дають змогу отримувати ДНК високої чистоти та концентрації за невеликий проміжок часу. Однак, у зв'язку з дороговизною, їх доступність є обмеженою.

Підсумовуючи сказане вище необхідно зазначити, що даний огляд розкриває суть методичних підходів до виділення сумарної ДНК з рослинних об'єктів. Їхні переваги та недоліки відображені у табл. 2.

Література

1. Алтухов Ю.П., Крутовский К.В., Духарев В.А. и др. Биохимическая генетика популяций лесных древесных растений// кн. Лесная генетика, селекция и физиология древесных растений. Материалы Международного симпозиума. – М.: 1989. – С. 16-24.
2. Богданов Ю.Ф., Прозоров А.А. и др. Молекулярная организация генома растений// Организация генома. – М.: И-во "Наука" 1989. – С. 218.
3. Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК и его значение в дифференцировке видов и эволюции геномов// М: И-во МГУ 1972. – С. 279.
4. Голубець М.А. Плівка життя// Львів: Пол. 1997. – С. 186.
5. Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение// Физиология и Биохимия Культ. Растений 2002 т.34. № 4. – С. 279-295.
6. Криницкий Г.Т. Морфофизиологические основы селекции древесных растений// Киев Автореф. 1993. – С. 46
7. Роне В.М. Генетический анализ природных популяций// Отбор лесных древесных. – Рига: Зинатне 1978. – С. 271.
8. Слюсаренко А.Г. Первинна структура ДНК і положення організмів у системі// М.: В-во МДУ 1972.С. 196.
9. Ahuja M.R. Genetic engineering in forest trees: State of the art and future perspectives. In: S.M. Jain and S.C. Minocha (Eds.)// Molecular Biology of Woody Plants 2000 Vol. 1 P. 31-49.
10. Ahuja M.R. Recent advances in molecular genetics of forest trees// Euphytica 2001. Vol. 121 P. 173-195.
11. Ausubel F.M. et al. Current Protocols in Molecular Biology// New York: John Wiley and Sons, Inc. 1990. P. 4.3.1.
12. Baucher M., Monties B., van Montagu M., Boerjan W. Biosynthesis and genetic engineering of lignin// Crit Rev Plant Sci. 1998. Vol. 17. P. 125-197;
13. Baxevanis A.D. The molecular Biology Database Collection: 2002 update// Nucleic Acids Research. 2002. Vol. 30. P. 1-12.
14. Bennetzen J.L., Schrick K., Springer P.S. Brown W.E., San-Miguel P. Active maize genes are modified and flanked by diverse classes of modified highly repetitive DNA// Genome 1994. Vol. 37. P. 565-576.
15. Bennetzen J.L. The contribution of retroelements to plant genome organization, function and evolution// Trends in Microbiol. 1996. Vol. 4. P. 347-353.
16. Bobola M.S., Eckert R.T., Stapelfeldt K., Smith D.S., Gueette D. Using nuclear and organelle DNA markers to discriminate among *Picea rubens*, *Picea mariana* and their hybrids// Can J For Res. 1996. Vol. 26. P. 433-443.

17. **Bobola M.S., Smith D.E., Klien A.S.** Five major nuclear ribosomal repeats represent a large and variable fraction of the genomic DNA of *Picea rubens* and *Picea mariana*// *Mol Biol Evol.* 1992. Vol. 9. P. 125-137.
18. **Cervera M.T., Plomion C., Malpica C.** Molecular markers and genome mapping in woody plants// *Molecular Biology of Woody Plants 2000a* Vol. 1. P. 375-394.
19. **Chase M.W., Hills H.H.** Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies// *Taxon* 1991. Vol. 40. P. 215.
20. **Cullis C.A., Griessen G.P., Gorman S.W., Teasdale R.D.** the 25S, 18S, and 5S ribosomal RNA genes from *Pinus radiata*// *Molecular Genetics of Forest Trees* 1988. P. 34-40.
21. **Dean C., Schmidt R.** Plant genome: A current molecular description// *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1995. Vol. 46. P. 395-418.
22. **Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B.** A plant DNA miniprep: version II// *Plant Mol Biol ReP.* 1993. Vol. 1.P. 19.
23. **Dhillon S.S.** DNA in tree species// J.M. Bonga & D.J. Durzan (Eds.), *Cell and Tissue Culture in Forestry* 1987. Vol.1. P. 298-313.
24. **Dong J., Wagner D.B.** Taxonomic and population differentiation of mitochondrial diversity in *Pinus banksiana* and *Pinus contorta*// *Theor Appl Genet.* 1993. Vol. 86. P. 573-578.
25. **Downie S.R., Palmer J.D.** Use of chloroplast DNA rearrangements in restructuring plant phylogeny// *Molecular Systematics in Plants* P. 14-35.
26. **Doyle J.J., Doyle J.L.** A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue// *Phytochemical Bulletin* 1987. Vol. 19. P. 11.
27. **Drewry A.** The G-banded Karyotype of *Pinus resinosa* Ait.// *Silvae Genet.* 1988. Vol.37. P. 218-221.
28. **Fladung M., Kumar S., Ahuja M.R.** Genetic transformation of *Populus* genotypes with different chimeric gene constructs: transformation efficiency and molecular analysis// *Transgenic Research* 1997. Vol. 6. P. 111-121.
29. **Flavell R.** The structure and control expression of ribosomal RNA genes// *Oxford Surv. Plant Mol Cell Biol* 3. 1986. P. 251-274.
30. **Gorman S.W., Teasdale R.D., Cullis C.A.** Structure and organization of the 5S RNA genes (5S DNA) in *Pinus radiata* (Pinaceae). *Plant Syst Evol.* 1992. Vol.183. P. 223-234.
31. **Grattapaglia D., Bradshaw H.D.** Nuclear DNA amounts of commercially important *Eucalyptus* species and hybrids// *Can. J For ReS.* 1994. Vol.24. P. 1074-1078.
32. **Hiratsuka J., Shimada H., Whittier R. et al.** The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid inversion during the evolution of cereals// *Mol Gen Genet.* 1989. Vol. 217. P. 185-194.
33. **Khoshoo, T.N.** Chromosome numbers in gymnosperms// *Silvae Genet.* 1961. Vol. 10. P. 1-9.
34. **Khoshoo, T.N.** Polyploidy in gymnosperm// *Evolution* 1959. Vol.13. P. 24-39.
35. **Klopfenstein N.B., McNabb H.S., Hart E.R. et al.** Transformation of *Populus* hybrids to study and improve pest resistance// *Silvae Genet.* 1993 Vol. 42. P. 86-90.
36. **Klug A.** Les Prix Nobel// Stockholm, Sweden, Nobel Foundation. 1982. P. 93.
37. **Kriebel H.B.** DNA sequence components of the *Pinus strobus* nuclear genome// *Can J For ReS.* 1985. Vol.15. P. 1-4.
38. **Kriebel H.B.** Molecular structure of forest trees// *Clonal forestry I. Genetics and Biotechnology* P. 224-240.
39. **Kornberg R.D., Klug A.**// *Sci Amer.* 1981. Vol. 244(2). P. 52.
40. **Kumar A., Bennetzen J.L.** Plant retrotransposons// *Annu Rev Genet.* 1999. Vol. 33. P. 479-532.
41. **Lapitan N.L.V.** Organization and evolution of higher plant nuclear genomes// *Genome* 1992. Vol. 35. P. 171-181.
42. **Liu Y.G., Mitsukawa N., Oosumi T., Whiller R.F.** Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert Junctions by thermal asymmetric interlaced PCR// *Plant J.* 1995. Vol. 8. P. 457.
43. **Long E.O., David I.B.** Repeated genes in eukaryotes// *Annu Rev Plant Biochem.* 1980. Vol. 49. P. 727-764.
44. **Mackenzie S., McIntosh L.** Higher plant mitochondria// *Plant Cell* 1999. Vol. 11. P. 571-585.

45. **Murrey M.G., Thompson W.F.** Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA// *Nucleic Acid Res.* 1980. Vol. 8. P. 4321.
46. **Murray B.G.** Nuclear DNA amounts in gymnosperms// *Ann Bot* 82 (Supplement A). 1998. P. 3-15.
47. **Nagl W.** Cdc2-kinase, cyclins and the switch from proliferation to polyploidization// *Protoplasma* 1995. Vol.188 P. 144-150.
48. **O'Brien I.E.W., Smith D.R., Cardner R.C., Murray W.J. et al.** Flow cytometric determination of genome size in *Pinus*// *Plant Science* 1996. Vol. 115. P. 91-99.
49. **Ohri D., Khoshoo T.N.** Genome size in gymnosperms// *Plant syst Evol.* 1986. Vol. 153. P. 119-132.
50. **Ouborg N.J., Piquot Y., Van Groenendael J.M.** Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants// *Journal of Ecology* 1999. Vol. 87 P. 551-568.
51. **Quijada A.A., Liston A., Delgado P., Vaques-Lobo A., Alvarez-Buylla E.R.** Variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) region of *Pinus rzedowskii* revealed by PCR-RFLP// *Theor Appl Genet.* 1998. Vol. 96. P. 539-544.
52. **Palmer J.D.** Chloroplast DNA evolution and biosystematics uses of chloroplast DNA variation// *Am Naturalist* 1987. Vol.130. P. 6-29.
53. **Palmer J.D.** Chloroplast and mitochondrial genome evolution in land plants// *Plant Gene Research: Cell Organelles* 1992. P. 99-133.
54. **Palmer J.D., Soltis D., Soltis P.** Large size and complex structure of mitochondrial DNA in two nonflowering land plants// *Curr Genet.* 1992. Vol. 21. P. 125-129.
55. **Palmer J.D., Adams K.L., Cho Y., Parkinson C.L., Qui Y.-L., Song K.** Dynamic of plant mitochondrial genome: Mobile genes and introns and highly variable mutation rates// *Variation and Evolution in Plants and Microorganism.* 2000. P. 35-57.
56. **Pederick, L.A.** Chromosome relationships between *Pinus* species// *Silvae Genet.* 1970. Vol.19. P. 171-179.
57. **Pichot C., M. El Maataoui** Flow cytometric evidence for multiple ploidy levels in the endosperm of some gymnosperm species// *Theor Appl Genet* 1997. Vol.94 P. 865-870.
58. **Rake A.W., Miksche J.P., Hall R.B. Hanson K.M.** DNA reassociation kinetics for four conifers// *Can J genet Cytol.* 1980. Vol.22. P. 69-79.
59. **Raven P.H., Johnson G.B.** *Biology*// WBC/McGraw-Hill 1990. P. 327.
60. **Richards E., Reichardt M., Rogers S.** Preparation of genomic DNA from plant tissue// Ausubel F.M. et al., eds. *Current Protocols in Molecular Biology* 1994. P. 2.3.1.
61. **Rogers S.O., Bendich A.J.** Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer// *Plant Mol Biol.* 1987. Vol. 9. P. 509-520.
62. **Saylor, L.C.** Karyotype analysis of genus *Pinus* – subgenus *Pinus*// *Silvae Genet.* 1972. Vol. 21. P. 155-163.
63. **Sederoff R.R.** Molecular mechanism of mitochondrial-genome evolution in higher plants// *Am Naturalist* 1987. Vol.130. P. 30-45.
64. **Sederoff R.R., Stomp A.-M., Gwynn B. et al.** Application of recombinant DNA techniques to pines: A Molecular approach to genetic engineering in forestry// *Cell and Tissue Culture in Forestry* 1987. Vol. 1. P. 314-329.
65. **Sederoff R.R.** Tree genomes: What will we understand about them by the year 2020 and how might we use that knowledge// *Forest Genetic and Sustainability* 2000. P. 23-30.
66. **Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M. et al.** The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its organization and expression// *EMBO* 1986. Vol. 5. P. 2043-2049.
67. **Sperisen et al.** Comparison of two rapid DNA extraction protocols for gymnosperms for application in population genetic and phylogenetic studies// *Forest Genetics*, in press 2000.
68. **Steiner J.J., Poklemba C.J., Fjellstrom R.G., Elliot L.F.** A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analyses// *Nucleic Acid Res.* 1995. Vol. 23. P. 2569.
69. **Strauss S.H., Hong H.-P., Hipkins V.D.** High levels of population differentiation for mitochondrial DNA haplotypes in *Pinus radiata*, *muricata*, and *attenuata*// *Theor Appl Genet.* 1993. Vol. 86. P. 605-611.
70. **Systma K.K., Givnish T.J., Smith J.F., Hahn W.J.** Collection and storage of plant samples for macromolecular comparisons// *Methods Enzymology* 1993. Vol. 234. P. 23.
71. **Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J.** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA// *Plant Mol Biol.* 1991. Vol. 17. P. 1150.

72. **Wagner D.B.** Nuclear, chloroplast, and mitochondrial DNA polymorphisms as biochemical markers in population genetic analyses of forest trees// New Forest 1992. Vol. 6. P. 373-390.
73. **Wakamiya I., Newton R.J., Price J.S.** Genome size and environmental factors in the genus *Pinus*// Am J Bot. 1993. Vol. 80. P. 1235-1241.
74. **Wakasugi T., Tsudzuki J., Ito S., Nakashima K., Tsudzuki T., Sugiura M.** Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*// Proc Natl Acad Sci USA 1994. Vol. 91. P. 9794-9798.
75. **Wenk A.R., Quinn M., Whetten R.W., Pullman G. and Sederoff R.** High-frequency *Agrobacterium*- mediated transformation of Norway spruce (*Picea abies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*)// Plant Mol Biol. 1999. Vol. 39. P. 407-416.
76. **Wessler S.R., Bureau T.E., White S.E.** LTR-transposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes// Curr Opinions Genet. 1995. Vol. 5. P. 814-821.
77. **Wright J.W.** Introduction to Forest Genetics// Academic Press 1976.

УДК 630*181.28

Доц. Ю.М. Дебринюк, канд. с.-г. наук – УкрДЛТУ

РІСТ І ПРОДУКТИВНІСТЬ *PSEUDOTSUGA MENZIESII* (MIRB.) FRANCO У ЛІСОВИХ КУЛЬТУРАХ УКРАЇНСЬКОГО РОЗТОЧЧЯ

Розглянуто аспекти росту та особливості накопичення деревини в чистих і змішаних насадженнях псевдотсуги Мензіса. Звернуто увагу на схеми і способи змішування, розміщення посадкових місць, сумісність зростання з іншими породами, перевагу створення чистих деревостанів, вибір придатних для культивування провенієнцій.

Doc. Yu.M. Debrinuk – USUFWT

Growth and productivity of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco at forest cultures of Ukrainian Roztochya

It is discussed the aspect of growth and wood mass accumulation peculiarities at pure and mixed stands of Douglas fir by age periods. It was analyzed such factors as even tree distribution of trees on plots; compatibility of mixed growth with other species; advantages of pure stands creation; selection of adapted provenancies for cultivation. At same time, it was studied such silvicultural aspects as schemes and methods of mixing, distribution of planting sites.

За винятком *Populus trichocarpa*, жодна інша деревна порода океанічної зони хвойних лісів Північної Америки не має такого розтягнутого та екологічно диференційованого природного ареалу, як *Pseudotsuga menziesii* [27].

Псевдотсуга або дугласія, одна із найбільш поширених хвойних порід Канади і США [47], була описана двома відомими шотландськими вченими – Арчибальдом Мензієсом (1754-1842) та Девідом Дугласом (1799-1834), імена яких і відображені в новій і старій видовій назвах породи – *Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco та *P. douglasii* Lindl. Трапляється також ще назва-синонім породи – *P. taxifolia* Lamb. Birtton.

Як повідомляє Н. Knüchel [38], природний ареал псевдотсуги Мензіса простягається в меридіальному напрямку від півночі Мексики до Британської Колумбії, по тихоокеанському узбережжю доходить до Каліфорнії. Із заходу на схід простягається від о. Ванкувер до штату Альберта. На південному сході досягає західної частини Техасу за винятком штату Невади.