

Вишневский А.В. Лесовосстановление под пологом спелых сосновых древостоев в борах Ровненского Полесья

Приведены результаты исследований предыдущего естественного возобновления сосновых древостоев в борах Ровненского Полесья. Показаны закономерности динамики естественного возобновления сосны, его связь с возрастом и полнотой материнского древостоя. Рассмотрены предпосылки и возможность перехода к созданию нового поколения сосновых насаждений с использованием способности древесных пород к самовозобновлению в условиях свежего бора.

Ключевые слова: лесные культуры, естественное возобновление, подрост.

Vishnevsky A.V. Renewal under the pine forests canopy in pine forest conditions of Rivnensky Polissya

The results of studying of the previous natural renewal of pine stands of Rivnensky Polissya are given. The regularities of dynamics of natural pine's renewal, its connection with the age of mother's wood and fullness are shown. The preconditions and possibility of transition to alternative way of creation a new generation of pine forests with the using of ability of tree species for refreshing itself in pine wood conditions are observed.

Keywords: forest cultures, natural restoration, grow.

УДК 630*232.3 *Аспір. Ю.М. Юсипович; ст. наук. співроб. В.А. Ковальова; доц. Р.Т. Гут, д-р біол. наук – НЛТУ України, м. Львів*

**ОСОБЛИВОСТІ ВИДІЛЕННЯ СУМАРНОЇ РНК
З РІЗНИХ ТКАНИН СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ**

Представлено методику виділення сумарної РНК з різних тканин та органів сосни звичайної, в основу якої покладено метод Chang із використанням цетилтриметиламонійброміду. Встановлено, що модифікована методика Chang, адаптована для виділення РНК із різних тканин сосни звичайної, дає змогу отримати високоякісну сумарну РНК, придатну для подальших генно-інженерних маніпуляцій.

Ключові слова: виділення РНК, сосна звичайна, сумарна РНК, ЦТАБ.

Вступ. У диференційній експресії генів сконцентровано відображені зміни генетичних програм організму під дією певних умов зовнішнього середовища. Найповніші дані про функціональну активність геному дає вивченням РНК, яка є посередником під час передачі генетичної інформації від ДНК до білка. Дослідження експресії генів на рівні мРНК здійснюється методами зворотної транскриптазної полімераза-ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР), створення кДНК бібліотек, Нозерн-гібридизації [1, 2]. Необхідною умовою отримання достовірної інформації за транскриптами є виділення із досліджуваних об'єктів достатньої кількості якісної РНК. Для екстракції РНК із тканин тварин широко застосовують гуанідин-тіоціанатний та тріазольний методи. Ці методи виявились менш ефективними для виділення РНК із тканин хвойних рослин, внаслідок високого вмісту в них фенольних сполук та поліцукрів.

S. Chang запропонував методику виділення сумарної РНК із хвої сосни, яка дає змогу досягти високого виходу високоякісного препарату. Такий ефект досягається специфічним складом екстракційного буферу на основі цетилтриметиламоній-броміду (ЦТАБ) та використанням літієво-хлоридної преципітації нуклеїнових кислот. Оскільки кожна тканина і орган характеризується специфічним вмістом хімічних сполук, то виникла необхідність в мо-

дифікації згаданої методики для виділення сумарної РНК із коренів, насіння, стовбура, пагонів, бруньок сосни звичайної.

У цьому дослідженні навели результати виділення сумарної РНК із різних органів і тканин сосни звичайної за модифікованою методикою Chang et. al. [3].

Матеріали і методи. У дослідах використовували: незріле насіння, зібране із серпневих стробіл, зародки сухого насіння, наданого ДП "Сасівське ЛП" Львівської області; хвою, коріння, бруньки та камбій зібрано у грудні з 15-річної сосни звичайної Дендроботанічного саду НЛТУ України. Використано корінці, стебла 2-річних сіянців та корінці, гіпокотилі і сім'ядолі восьмиденних проростків сосни звичайної, вирощених за 25 °С в чашках Петрі на фільтрувальному папері, змоченому дистильованою водою.

Розчини та реактиви готували на MilliQ-воді, обробленій диетилпірокарбонатом (ДЕПК, "Millipore"). Весь посуд обробляли 0,1 М NaOH, промивали MilliQ-водою, обробленою ДЕПК та автоклаували, як і всі буферні розчини.

До 0,2-1,0 г замороженої тканини, яку розтирали в ступці з рідким азотом, додавали 1 мл попередньо підігрітого до 65 °С ЦТАБ-буферу (2 % ЦТАБ, 100 мм трис-HCl, рН 8,0, 25 мм ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота), 2 М NaCl, 2 % полівінілпіролідон (ПВП), 0,5 г/л спермідин, 2 % β -меркаптоетанол додавали в суміш перед використанням). Суспензію інкубували за 65 °С 10-15 хв із інтенсивним перемішуванням через кожні 2 хв і додавали один об'єм (1 мл) суміші хлороформу з ізоаміловим спиртом (24:1). Суміш осаджували центрифугуванням за 13 000 об/хв протягом 2-3 хв за кімнатної температури. Отриману верхню фазу рідини переносили в нову пробірку і повторно екстрагували сумішню хлороформу з ізоаміловим спиртом. До верхньої фази, отриманої після центрифугування за кімнатної температури протягом 2-3 хв 13 000 об/хв, додавали $\frac{1}{4}$ об'єму 10 М LiCl. Осадження здійснювали впродовж ночі за 4 °С. Осад, що утворився після центрифугування за 14 000 об/хв, 30 хв 4 °С, ресуспендовували в 300 мкл, підігрітого до 60 °С, ДСН-буферу (1 М NaCl; 0,5 % ДСН (додецилсульфат натрію); 10 мм трис-HCl, рН 8,0, 1 мм ЕДТА). Суспензію екстрагували однаковим об'ємом хлороформ-ізоамілової суміші і, додавши два об'єми охолодженого 96 % етанолу, витримували протягом ночі за -20 °С. РНК осаджували центрифугуванням за 14 000 об/хв 4 °С впродовж 30 хв. Осад двічі промивали в 500 мкл охолодженого 70 % етанолу. Осад РНК висушували в пробірках 10-15 хв (37 °С) і розчиняли в необхідному об'ємі автоклавованої та обробленої ДЕПК MilliQ-води. Концентрацію РНК визначали спектрофотометрично за A_{260} , якість – за співвідношенням A_{260}/A_{280} , на спектрофотометрі Biotech Photometer UV1101/1101T "Biochrom" та електрофоретично в 1 %-му агарозному гелі у трис-боратному буфері, рН 8,3 (50 мм трис- H_3BO_3 , 2 мм ЕДТА) за напруги 20 В/см².

Результати дослідження. РНК легко деградує під дією ендогенних та екзогенних РНКаз, тому процес її виділення потребує максимальної чистоти та попередньої підготовки до роботи. Усі розчини для виділення РНК, готувались на стерильній MilliQ-воді, обробленій 0,05-0,1 % ДЕПК, який інактивує РНК-ази. Бактерії та гриби, які можуть поширюватися із пилом, а також руки є основним джерелом РНК-аз, тому посуд багаторазового використання

обробляли 0,1 М NaOH. Для того, щоб уникнути забруднення, дотримувалися стандартної мікробіологічної технології роботи – працювали в стерильних умовах у рукавичках, відкриваючи реактиви на короткий час.

Отримання високоякісної сумарної РНК залежить від вихідного матеріалу, способу його зберігання та від особливостей методу виділення. Під час виділення сумарної РНК із сосни звичайної, необхідно правильно зібрати й підготувати матеріал для виділення. Найкраще використовувати свіжі тканини із молодих, активно ростучих пагонів, проростків і хвої. Ми використали свіжозібрані зразки і зразки, які зберігалися замороженими (-70 °С). Тканини, які не були попередньо заморожені у рідкому азоті перед тривалим зберіганням за -70°С, містили повністю деградовану сумарну РНК (рис.). На відміну від ДНК, РНК є нестійкою, тому під час транспортування свіжого матеріалу, або довготривалого зберігання, його обов'язково потрібно подрібнити стерильним лезом і заморозити у рідкому азоті для зберігання [4]. В іншому разі, порушення внутрішньоклітинного гомеостазу призводить до деградації рибонуклеїнової кислоти.

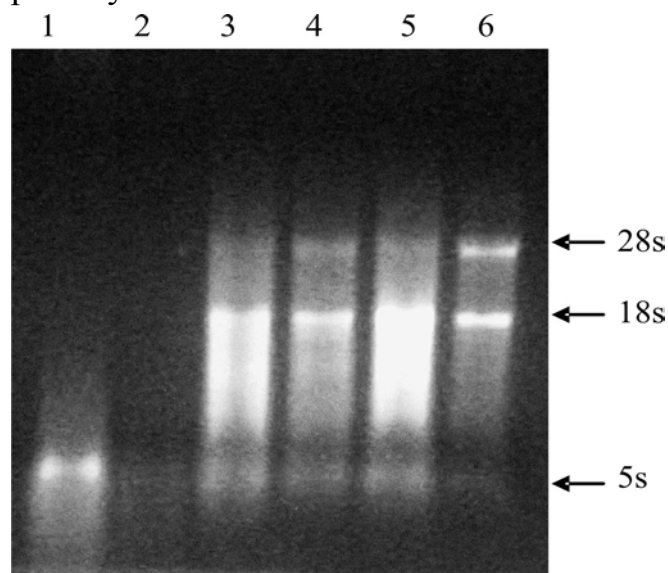


Рис. Електрофореграма сумарної РНК сосни звичайної: 1, 2 – повністю деградована РНК заморожених стебел та коріння 2-річної сосни;
3, 5 – деградований препарат РНК; 8-денних проростків сосни внаслідок пересушування в термостаті;
4 – напівдеградована РНК 8-денних проростків сосни; 6 – типовий зразок незруйнованої РНК 8-денних проростків сосни

Для виділення сумарної РНК із тканин сосни звичайної ми модифікували методику Chang et. al. [3]. Поліфеноли і поліцукри, які містяться у високій концентрації у тканинах хвойних, мають здатність зв'язуватись з нуклеїновими кислотами, чим істотно зменшують вихід і чистоту препаратів РНК [5-7]. Вплив цих сполук усунуто використанням у екстракційному буфері ПВП і β-меркаптоетанолу. ЕДТА інгібує ендогенні РНКазы за рахунок утворення комплексів із двовалентними катіонами, які є активаторами цих ензимів. Для ефектної екстракції нуклеопротейдних комплексів використано високу концентрацію NaCl та ЦТАБ. Депротейнізація РНК досягається застосуванням ДСН [8]. В екстракційному буфері міститься спермідин – це поліамін, який слугує для

осадження ДНК на початкових етапах екстрагування. Для отримання препаратів сумарної РНК високої чистоти використано повторну екстракцію нуклеїнової кислоти сумішшю хлороформу з ізоаміловим спиртом. Після екстракції хлороформ-ізоаміловим розчином препарати РНК звільняються від домішок ДНК та інших сполук осадженням за наявності 10 М LiCl [9].

Осадження та промивання 70 % етанолом забезпечують необхідне очищення препарату від різноманітних домішок та залишків Li^+ .

Критичним є етап висушування препарату РНК, оскільки пересушені препарати РНК деградують та погано розчиняються у воді (рис.).

Для визначення якості сумарної РНК здійснювали електрофорез в 1 % агарозному гелі в трис-боратному буфері, нуклеїнові кислоти візуалізували бромистим етидієм. Сумарна РНК на електрофореграмі має вигляд шлейфу від 8000 до 300 основ. Ділянка з найбільшою інтенсивністю світіння розміщена в області 2000 основ. мРНК зазвичай містить 10-25 % рибосомальної РНК (рРНК), яку видно на гелі у вигляді смуг біля 2000 основ (18 s рРНК), 5000 основ (28 s рРНК), а також інколи в ділянці 100 основ (5 s рРНК) (рис.).

Важливе значення для високого виходу сумарної РНК із різних тканин має співвідношення вихідної наважки зразку та екстракційного буферу. Експериментальним шляхом ми визначили оптимальне їх співвідношення залежно від типу тканини, які наведено в таблиці. Очевидно, що на 1 мл ЦТАБ-буферу припадає менша маса наважки насіння та зародків, ніж камбію чи коріння 15-річної сосни. Це пов'язано з особливостями біохімічного складу, періоду росту та розвитку цих органів дерева.

Індикатором забруднення препарату білками та поліфенолами є показник співвідношення A_{260}/A_{280} (табл.) [10]. Значення A_{260}/A_{280} у всіх зразках, становило 1,6-2,0, що вказує на високу чистоту препаратів і можливість використання їх у подальшій роботі для дослідження експресії генів.

Табл. Характеристика препаратів сумарної РНК різних тканин сосни звичайної

№ ПП	Вегетативні органи та насіння, взяті для виділення сумарної РНК	Співвіднош. маси зразка до екстр. буферу, г/мл	Концентр. мкг/мл, за OD_{260}	A_{260}/A_{280}
1	Незріле насіння	1: 5	2,68	2,08
2	Зародки сухого насіння	1: 12	1,24	1,88
3	Корінці 8-денних проростків	1: 3	1,05	1,88
4	Гіпокотилі 8-денних проростків	1: 5	1,37	1,98
5	Сім'ядолі 8-денних проростків	1: 5	1,53	2,02
6	Камбій 15-річної сосни	1: 2	1,09	1,61
7	Хвоя 15-річної сосни	1: 5	2,38	2,03
8	Вегетативні бруньки 15-річної сосни	1: 5	1,95	2,04
9	Коріння 15-річної сосни	1: 4	1,58	2,08

Висновки. Особливості біохімічного складу тканин кожного деревного виду потребує особливого підходу та оптимізації методів виділення РНК. Процес виділення нуклеїнових кислот потребує максимальної чистоти та попередньої підготовки до роботи. Для виділення РНК сосни звичайної найкраще використовувати свіжозібрані тканини проростків, молодих пагонів та хвої. Значний вміст фенолів, поліцукрів та ендогенних РНК-аз у тканинах сосни ускладнює вихід необхідної якості та кількості сумарної РНК, умови висушування та зберігання також можуть впливати на її якість. Важливе зна-

чення для виходу оптимальної кількості сумарної РНК з різних тканин має визначення співвідношення вихідної маси наважки зразка і екстракційного буфера. Зберігати отриманий препарат варто у 70 % етанолі за -20 °С коротко- і довготерміново – за -70 °С. Модифікована методика Chang адаптована для виділення РНК із різних тканин сосни звичайної дає змогу отримати високоякісну сумарну РНК, придатну для подальших генно-інженерних маніпуляцій.

Література

1. **Azevedo H.** An improved method for high-quality RNA isolation from needles of adult maritime pine trees / Azevedo H., Lino-Neto T., Tavares Rui M. // Plant molecular biology reporter. – 2003. – Vol. 21. – P. 333-338.
2. **Gehrig H.H.** An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides / Gehrig H.H., Winter K., Cushman J., et al. // Plant molecular biology reporter. – 2000. – Vol. 18. – P. 369-376.
3. **Chang S.** A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees / Chang S., Puryear J., Cairney J. // Plant Mol. Biol. Rep. – 1993. – Vol. 11. – P. 113-116.
4. **Гут Р.Т.** Порівняльний аналіз різних методів виділення ДНК з хвої сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) / Р.Т. Гут, Ю.В. Вербовицька // Науковий вісник НЛТУ України : зб. наук.-техн. праць. – Львів : РВВ НЛТУ України. – 2005. – Вип. 15.5. – С. 116-121.
5. **Kiefer E.** A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites / E. Kiefer, W. Heller, D. Ernst // Plant molecular biology reporter. – 2000. – Vol. 18. – P. 33-39.
6. **Lewinsohn E.** Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms / Lewinsohn E., Steele C.L., Croteau R. // Plant molecular biology reporter. – 1994. – Vol. 12, № 1. – P. 20-25.
7. **Salzman R.A.** An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates / Salzman R.A., Fujita T., Zhu-Salzman K., et al. // Plant Molecular biology reporter. – 1999. – Vol. 17. – P. 11-17.
8. **Топчій Н.** Сучасні методи виділення ДНК вищих рослин / Н. Топчій // Вісник львівського університету. – Сер.: Біологічна. – Львів. – 2006. – Вип. 42. – С. 26-31.
9. **Су М.** Выделение высококачественной РНК из различных тканей *Populus* / Су М., Цзан В., Яо Н., Хуан М. // Физиология растений. – 2009. – Т. 56, № 5. – С. 791-795.
10. **Kolossova N.** Isolation of high-quality RNA from gymnosperm and angiosperm trees / Kolossova N., Miller B., Ralph S., et al. // BioTechniques. – 2004. – Vol. 36, № 5. – P. 821-824.

Юсипович Ю.М., Ковалева В.А., Гут Р.Т. Особенности выделения суммарной РНК из разных тканей сосны обыкновенной

Представлена методика выделения суммарной РНК из разных тканей и органов сосны обыкновенной, в основу которой положен метод Chang с использованием цетилтриметиламмонийбромида. Установлено, что модифицированная нами методика Chang, адаптированная для выделения РНК из разных тканей сосны обыкновенной, дает возможность получить высококачественную суммарную РНК, пригодную для последующих генно-инженерных манипуляций.

Ключевые слова: выделение РНК, сосна обычная, суммарная РНК, ЦТАБ.

Yusypovych Yu.M., Kovalyova V.A., Gout R.T. The specials of a total RNA isolation from various Scots pine tissues

In this article are presented a total RNA isolating method from different tissues and organs of Scots pine which is based on Chang's method using cetyltrimethylammonium-bromide. Described that the method of Chang is modified by us adapted for the selection of RNA from different types of pine-tree ordinary, enables to get high-quality total RNA, suitable for subsequent gene engineerings manipulations.

Keywords: RNA isolation, Scots pine, total RNA, CTAB.