

ЭНДОФИТТІ САҢЫРАУҚҰЛАҚТАРДАН ДНҚ БӨЛІП АЛУ ҮШІН СТАВ ӘДІСІН МОДИФИКАЦИЯЛАУ

Жанбыршина Н.Ж.^{1*}, ауыл шаруашылығы ғылымдарының кандидаты, қауымдастырылған профессор, nur767676@mail.ru <https://orcid.org/0000-0002-5291-0781>

Киселев К.В.², биология ғылымдарының кандидаты
kiselev@biosoil.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1025-6491>

Алейнова О.А.², биология ғылымдарының кандидаты
aleynova@biosoil.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2549-8568>

¹*С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті, Астана қ., Қазақстан*

²*«Ресей ғылым академиясының Қиыр Шығыс филиалы Шығыс Азияның жер үсті биотасының биоәртүрлілігінің федералды ғылыми орталығы», Владивосток қ., Ресей*

Анатпа. Эндofитті саңырауқұлақтардан ДНҚ бөліп алудың жаңа әдісі ұсынылды, ол цетилтриметиламмоний бромиді (СТАВ) қосылған қосымша тазарту сатысына негізделген. Бұл әдіспен бөлінген ДНҚ сапасы мен саны әртүрлі факторлардың әсерін, оның ішінде СТАВ буферінің құрамы, температура және инкубация уақыты сияқты шарттарды ескере отырып салыстырмалы түрде бағаланды. Тәжірибелер нәтижесінде ең көп ДНҚ 80°C температурада және 30 минуттан 1 сағатқа дейінгі инкубация уақытында бөлінетіні анықталды. *ITS1* маркер аймағына арналған ПТР осы шарттарда ең күшті сигнал көрсетті. Этил спирті және натрий ацетатында реципитациялау арқылы ДНҚ-ны қосымша тазарту оқшауланған ДНҚ мөлшерін азайтса да, ПТР сигналының қарқындылығын жақсартады. Өсімдіктердің өсуін ынталандыру және олардың биотикалық әрі абиотикалық стресстерге төзімділігін арттыру мақсатында эндofитті саңырауқұлақтарды қолдану әдістерін әзірлеу үшін осы саңырауқұлақтардың геномдық құрылымын түсіну өте маңызды. Геномдық зерттеулер мен эндofитті саңырауқұлақ түрлерін анықтау – қажетті қадамдар, және бұл үшін молекулалық биология әдістері белсенді түрде қолданылады. Осылайша, ұсынылған әдіс саңырауқұлақтар мен ашытқылардан ДНҚ бөліп алу үшін коммерциялық жинақтармен салыстырғанда тиімді әрі қолжетімді балама болып табылады.

Тірек сөздер: молекулалық генетика, ПТР, *ITS1*, *ДНҚ*, саңырауқұлақ, эндofит.

Кіріспе. Эндofит (ежелгі грек тілінен аударғанда «ішкі» + «өсімдік») - белгілі бір жағдайларда тірі өсімдіктердің ұлпаларында олардың қызметі мен дамуына теріс салдар тудырмай мекен ететін микроорганизмдер. Мұндай ағзаларға саңырауқұлақтар мен бактериялар, ал сирек балдырлар мен вирустар кіруі мүмкін [1].

Эндofитті саңырауқұлақтар өсімдіктердің қоздырғыштарынан ұзақ мерзімді қорғауды қамтамасыз ететін ұлпа басқарып тығыз қарым-қатынасы мен қоршаған ортаның тұрақтылығын ескере отырып, фитопатогендерден ұзақ мерзімді қорғауды қамтамасыз ете алады [2,3] Сонымен қатар, саңырауқұлақтар метаболикалық әмбебаптығымен танымал және биоактивті табиғи қосылыстардың маңызды көзі болып табылады, олардың кейбіреулері микробқа қарсы белсенділікке ие [4]. Эндofитті саңырауқұлақтар кеңістік немесе қоректік заттар үшін бәсекелестік, антибиотиктер, микопаразитизм сияқты әртүрлі механизмдер арқылы немесе жанама түрде және өсімдік иесінің иммунитетін модуляциялау арқылы патогендерінің өсуін көрсетілген [5,6,7]. Сонымен қатар, эндofитті саңырауқұлақтар гиббереллиндер немесе ауксиндер сияқты фитогормон тәрізді молекулалардың биосинтезі арқылы өсімдіктердің өсуін және абиотикалық стресстерге төзімділігін арттырады [8].

Сондай-ақ, эндofитті саңырауқұлақтар жасушадан тыс ферменттердің кең спектрін шығарады, олар өнеркәсіптік қолдану үшін сұранысқа ие. Эндofитті саңырауқұлақтар жасушадан тыс ферменттердің кең ауқымын өндіретіні белгілі, бұл олардың өнер-кәсіптік қолданылуына сұраныстың артуына себеп болып отыр. Әртүрлі ауыл шаруашылығы

өнімдерін өндіретін өнеркәсіптер осы ферменттерді жаппай өндіру үшін саңырауқұлақтарды өсіру субстраттары ретінде пайдалана алады, әсіресе оларды қайта өңдеу әдісі ретінде. Алайда, мұндай жанама өнімдер көбінесе микробтардың өсуіне қолайсыз жағдайлар туғызуы мүмкін, мысалы, жоғары тұз концентрациясы. Сондықтан осы зерттеудің мақсаты – қолайсыз жағдайларда өсетін өсімдіктерден, атап айтқанда, эндофитті саңырауқұлақтардың әлеуетін бағалау, яғни олардың алты ферменттің (амилаза, липаза, протеаза, целлюлаза, пектиназа және лакказа) *in vitro* өндірісін стандартты және тұзды жағдайларда зерттеу болды. Зерттеулер көрсеткендей, көптеген саңырауқұлақ түрлерінде бұл ферменттік белсенділік NaCl қосылған ортада салыстырмалы түрде сақталды. Тұзға төзімділігі бар изоляттарды зерттеу барысында, өсу субстраттарын пайдалану арқылы, көптеген агроөнеркәсіптік кешендерде кездесетін қосалқы өнімдерге тән қасиеттер анықталды. Бұл зерттеу осы қосылыстарды әрі қарай зерттеуге және олардың өндірісін оңтайландыруды дамытуға бағытталған алғашқы қадам ретінде қарастырылуы тиіс [9].

Агроөнеркәсібінің азық-түлік әртүрлі жанама өнімдері осы ферменттерді жаппай өндіру үшін, әсіресе оларға құндылық қосу әдісі ретінде саңырауқұлақтарды өсіру субстраттары ретінде пайдаланылуы мүмкін. Өсімдіктердің өсуін ынталандыру әдістерін және олардың эндофитті саңырауқұлақтар арқылы биотикалық және абиотикалық кернеулерге төзімділігін жасау үшін эндофитті саңырауқұлақтар геномын ұйымдастырудың негізгі принциптерін білу қажет. Геномның ұйымдастырылуын зерттеу және саңырауқұлақтардың түрін анықтау үшін нуклеин қышқылдарын, атап айтқанда ДНҚ-ны бөліп алуға негізделген молекулалық биология әдістері кеңінен қолданылады. Саңырауқұлақтардан ДНҚ-ны бөліп алудың бірқатар шектеулері мен ерекшеліктері бар, бұл саңырауқұлақтар құрылысының биологиялық ерекшеліктерімен байланысты. Саңырауқұлақтардың жасушалық қабырғасының құрылымдық ерекшеліктері, сондай-ақ спецификалық қайталама метаболиттердің, соның ішінде токсиндердің мазмұны ДНҚ-ның жоғары сапалы оқшаулануына кедергі келтіруі мүмкін. Қазіргі уақытта HiPure SF өсімдік ДНҚ жинағы (Маген, Қытай), EcoPURE BYF геномдық ДНҚ жинағы (EcoTech Biotechnology, Түркия), DNeasy Plant (QIAGEN, Нидерланды) сияқты саңырауқұлақтар мен ашытқылардан тиімді ДНҚ экстракциясын ұсынатын бірқатар коммерциялық жинақтар бар.) немесе DiamondDNA зауытының жинағы (DiamondDNA, Ресей). Дегенмен, бұл жинақтар жиі қымбат. Осыған байланысты саңырауқұлақтардан ДНҚ алудың тиімді және арзан әдісін жасау мәселесі туындайды.

Лизис буферлерінің ең жиі қолданылатын компоненттері мыналар:

1. СТАВ (цетилтриметиламмоний бромиді, молекулалық массасы 364,46 г) – бір мезгілде өсімдіктер мен саңырауқұлақтардың жасушалық қабырғаларын, ішкі органеллалардың липидті қабықшаларын бұзатын және ерітетін, сондай-ақ ақуыздарды (ферменттерді) денатурациялайтын катионды жуғыш зат. Сонымен қатар, ол күрделі полисахаридтерді және полифенолдар сияқты қайталама метаболиттерді диссоциацияланады. ЦТАБ полифенолдардан ішінара нуклеин қышқылдарын бөлуге қабілетті жалғыз қосылыс болуы мүмкін. Полисахаридтерді жою ДНҚ-ның арнайы аймақтарын дұрыс шектеу үшін өте маңызды [10].

2. ЭДТА (этилендиаминтетрасірке қышқылы, молекулалық салмағы 372,2 г) - ДНҚ-ны бұзатын ферменттерге қажетті магний иондарын хелаттау арқылы ыдырауды болдырмайды. ЭДТА ДНҚ репликациясына және фрагментациясына (полимеразалар, ДНҚазалар және т.б.) қатысатын ферменттердің Ко-факторы болып табылатын Mg²⁺ иондарын репликациялау үшін қолданылады және сол арқылы ДНҚ-ның босатылуына мүмкіндік береді.

3. Хлороформ – белоктар мен липидтерді еріту арқылы жасуша мембраналарын ұстайтын байланыстарды бұзады, кейін олар полярлы емес хлороформ мен полярлы су

арасындағы интерфазада тұнбамен комплекстер түзеді, бұл ДНҚ-ны липидтер мен белоктардан тазартуға мүмкіндік береді [10]

4. Натрий хлориді немесе хлорлы натрий (NaCl). NaCl ЦТАБ бар ерітінділерден ДНҚ-ны тұндыру үшін қолданылады, өйткені тек NaCl ЦТАБ еріген күйінде сақтай алады, бұл оның ДНҚ-мен бірге тұнбаға түсуіне жол бермейді. Тұзды қосқанда ерітіндіде ақ бұлтты, созылған жолақтар пайда болады, бұл ДНҚ.

5. Этил спирті – өзіне тән иісі бар, мөлдір және түссіз сұйықтық. Этанол - тұндыру үшін қолданылатын екінші компонент. Нуклеин қышқылдары (ДНҚ және РНҚ) теріс зарядталған фосфат топтарына байланысты гидрофильді молекулаларт болып табылады. Тұзды қосқанда оң (+) натрий иондары топтардың теріс зарядын бейтараптандыруы керек, осылайша ДНҚ аз гидрофильді, сондықтан суда аз ериді. Алайда натрий иондары мен фосфат топтарының судағы жақындауы соңғысының диэлектрлік өтімділігі жоғары болғандықтан қиын. Ал этанолдың диэлектрлігі төмен болғандықтан олардың өзара әрекеттесуін айтарлықтай жеңілдетеді.

6. Изопропилді спирт - (изопропил спирті немес пропанол-2, химиялық формуласы $(\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3)$) - органикалық қосылыс, алифатты қатардағы қарапайым екінші бір атомды спирт. Изопропанолдың шекті жағындағы гидроксил тобы бар, ал пропанол -1 изомері бар. ДНҚ-ны изопропанолмен тұндыру кезінде көбіктенудің алдын алу үшін изопропил спирті қосылады. Бөлме температурасында изопропанол тұздардың тұнбаға түсуін азайтып, әрі қарайғы процестерге кедергі келтіруі мүмкін. Эксперименттерде изопропанол үлкен көлемдегі ДНҚ үшін тиімдірек, себебі алкогольдің қажетті мөлшері азаяды және бұл әдіс жылдамдатылады, өйткені салқындату қадамын талап етпейді. Центрифугадан кейін полипропилен түтіктернің қабырғаларында этанол тұнбасынан алынған үлпілдек тұзды түйіршіктерге қарағанда изопропанолды тұнбадан алынған шыны тәрізді тұнбаны көру қиынырақ. Сонымен қатар, реакция шығымын қосарлы тұнбаларды (мысалы, гликоген, сызықтық полиакриламид, тРНҚ) қосу немесе мұздату арқылы оңай арттыруға болады.

7. Натрий ацетаты (натрий этанаты, химиялық формуласы - $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ немесе CH_3COONa немесе AcONa) - сірке қышқылының органикалық натрий тұзы. Ерітіндіде натрий ацетатын (әлсіз қышқылдың тұзы) және сірке қышқылын рН салыстырмалы түрде тұрақты ұстау үшін буфер ретінде пайдалануға болады. Бұл әсіресе биохимияда рН-тәуелді реакцияларда пайдалы. ДНҚ преципитациясы иондық күшті арттыру арқылы, әдетте натрий ацетатын қосу арқылы жақсарады.

Сонымен қатар, рН мәні (лат. *pondus hydrogenii* «сутегінің салмағы») лизис буфері үшін өте маңызды фактор – сулы ерітінділердің қышқылдығының өлшемі. Бұл ерітінділердегі сутегі катиондарының белсенділігін көрсету тәсілі [11]. ДНҚ теріс зарядталған молекула, сондықтан нуклеин қышқылдарын бөліп алу үшін оңтайлы рН 7,5-8,0 рН диапазонында деп есептеледі. Сондай-ақ саңырауқұлақтардың жасуша қабырғасы мен ақуыздарын тиімдірек жою үшін жоғары температураның (60°C жоғары) әсері сияқты физикалық әдістер қолданылады.

Осы қымбат емес компоненттерді және саңырауқұлақ жасушаларына әсер етудің қолжетімді әдістерін пайдалана отырып, олардың эндофитті саңырауқұлақтарының таза ДНҚ препаратын бөліп алуға болады. Осыған байланысты жұмыстың келесі мақсаты тұжырымдалды - қолжетімді және қымбат емес компоненттер мен тәсілдерді пайдалана отырып, эндофитті саңырауқұлақтардан ДНҚ алу үшін ЦТАБ әдісін қолдану.

Зерттеу материалдары мен әдістемесі. Биологиялық материал. Бұл жұмыста үлгі нысаны ретінде біз *Vitis amurensis* Rupr жүзімінің ксилемасынан бұрын оқшауланған *Alternaria tenuissima* (sequence ID KF308883.1) және *Exobasidium japonicum* (MW296846.1) екі түрлі эндофитті саңырауқұлақтарды қолдандық. Бұл саңырауқұлақтар оқшауланған, сипатталған және қазіргі уақытта Ресей ғылым академиясының Қиыр Шығыс бөлімшесі,

Владивосток, Ресей Федерациясы биоәртүрлілік федералды ғылыми орталығының биотехнологиялық зертханасының коллекциясында (-80°C) сақтауда. ДНҚ сапасы мен концентрациясын оқшаулау және талдау. Біз PDA қоректік ортада (картоп декстроза ағары) өсетін 50 мг саңырауқұлақ мицелийін өлшеп алдық. Минометтерді және дистильдерді автоклавтау арқылы зарарсыздандырды (121°C, 0,21 МПа, 20 мин). Үлгіні ерітіндіде ұнтақтағаннан кейін ұсақталған үлгіге үш нұсқада дайындалған 800 мкл ЦТАБ буфері қосылды (1-кесте). 1) 100 mM Tris pH 7,5, 0,7 M NaCl, 40 mM EDTA pH 7,5, 1% цетилтриметиламмоний бромиді (СТАВ); 2) 100 mM Tris pH 7,5, 1,4 M NaCl, 40 mM EDTA pH 7,5, 1% СТАВ; және 3) 100 mM Tris pH 7,5, 0,7 M NaCl, 40 mM EDTA pH 7,5, 2% СТАВ (1-кесте).

1-кесте – Эндофитті саңырауқұлақтардан ДНҚ экстракциясы үшін буферлік құрамының вариациялары

Бір ретті буфер Эхта №1	Бірретті буфер Эхта №2	Бірретті буфер Эхта №3
1. 1 mM Tris pH 7,5-8,0	1. 1 mM Tris pH 7,5-8,0	1. 1 mM Tris, pH 7,5-8,0
2. 0.7 M NaCl	2. 1.4 M NaCl	2. 0.7 M NaCl
3. 40 mM ЭДТА, pH 7,5-8,0	3. 40 mM ЭДТА, pH 7,5-8,0	3. 40 mM ЭДТА, pH 7,5-8,0
4. 1% ЦТАБ	4. 1% ЦТАБ	4. 2% ЦТАБ

Содан кейін үлгі біртекті болғанша араластырылды және «Геном» термостатында 30 минут, 1 сағат немесе 2 сағат бойы 60 °C, 70 °C, 80°C немесе 90°C температурада инкубацияланды («ДНК-технология», Ресей). Содан кейін 300 мкл хлороформ қосылды, мұқият араластырылды және 10 минут бойы 4°C және 16 100 г (5415R, «Eppendorf», Германия) центрифугаланады. Содан кейін 420 мкл үстіңгі зат бөлек түтіктерге жиналды және 950 мкл 96% этанол қосылып, түні бойы -20 ° C температурада ұсталды, содан кейін 10 минут бойы 4°C және 16 100 г центрифугаланады. Жоғарғы сұйықтық алынып тасталды, ал тұнба бөлме температурасында этанол толығымен буланғанша кептірілді (30 мин). Содан кейін шөгінді 150 мкл тазартылған суда ерітілді [12]

Әрі қарай, осы кезеңде ДНҚ сапасы мен саны Р300 спектрофотометрімен («IMPLEN», АҚШ) өлшенді. Содан кейін ПТР жүргізілді. Сонымен қатар, ДНҚ сапасы мен санының ең жоғары параметрлерін көрсететін қосымша ДНҚ тазарту қадамы қосымша қолданылды. Бірінші қосымша тазарту әдісі үшін келесі қадамдар қолданылды:

1) суда ерітілген 150 мкл ДНҚ-ға 150 мкл изопропил спирті қосылды, -20°C-та 30 минут инкубацияланды, содан кейін 10 минут бойы 4°C және 16 100 г центрифугаланады, үстіңгі қабат жойылды;

2) Содан кейін кептірілген тұнбаға 300 мкл су және 700 мкл спирт қосылды, -20 °C температурада 30 минут инкубацияланды, содан кейін 4°C және 16 100 г температурада 10 минут центрифугаланады, шөгінді сұйықтық жойылды;

3) кептірілген шөгінді 500 мкл сумен және 1 мкл RNase 1:100 сұйылтылған (Promega, АҚШ) ерітілді, 37°C температурада 30 минут инкубациялады;

4) алынған қоспаға 950 мкл хлороформ қосылды, 3 минут бойы араластырылды, содан кейін 10 минут бойы 4°C және 16 100 г центрифугалады;

5) жоғарғы фаза (400 мкл) бұрын дайындалған пробиркаларға ауыстырылды, оған 900 мкл этанол және 10 мкл натрий ацетаты қосылды, түні бойы -20 ° C температурада инкубацияланды,

6) 20 минут бойы 4°C және 16100 г центрифугалайды, үстіңгі затты алып тастады, тұнбаны спирт толығымен буланып, 100 мкл суда ерігенше кептірді.

Қосымша тазартудың екінші әдісі келесі қадамдарды қолданды:

1) 1:100 сұйылтылған 1 мкл RNase (Promega, АҚШ) ДНҚ су ерітіндісіне (150 мкл) қосылды және 30 минут бойы 37°C температурада инкубацияланды;

2) содан кейін 300 мкл этанол және 4,5 мкл натрий ацетаты қосылды, -20°C температурада 3 сағат инкубацияланады,

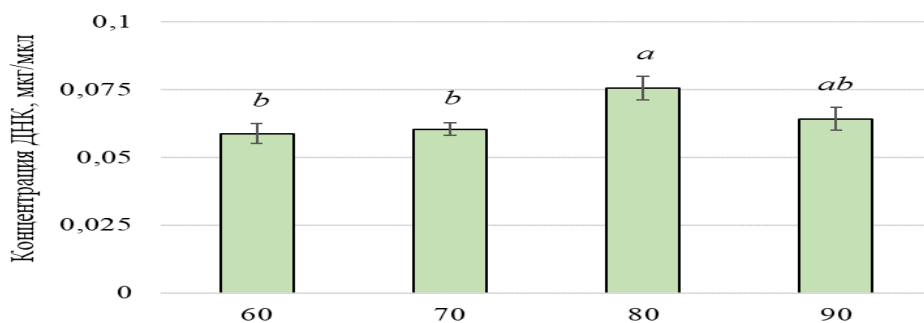
3) 20 мин 4°C және 16100 г центрифугалайды, үстіңгі сұйық алып тасталады, тұнбаны спирт толығымен кептіріп, 100 мкл суды қосады.

ПТР шарттары және деректерді визуализациялау. Саңырауқұлақ *ITS1* pDNA шамамен 315 жұп нуклеотидтер *ITS1* ПТР өнімдерін ампликациялау үшін әмбебап праймерлер пайдалана отырып ампликацияланады. (*ITS5* -5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G және *ITS2* -5' GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC) [13]. Полимеразды тізбекті реакция (ПТР) құрамында 70 мМ Tris-HCl (pH 8,6), 17 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ әрбір dNTP, 0,2 мкМ олигонуклеотид бірлігі және праймерлер бар 20 мкл көлемінде жүргізілді. ДНҚ-полимераза (Тақ полимераза «Силекс М», Мәскеу, Ресей). Талдау 95°C температурада 2 минуттық бастапқы денатурация қадамына, одан кейін 95°C температурада 10 секундтық 38 циклге бағдарламаланған T100 термиялық циклінде (Bio Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, АҚШ) орындалды. , 54°C температурада 10 с, 72°C температурада 30 с, содан кейін 72°C температурада 30 с. Ампликациялық өнімдерді бөлу үшін 1,5% агарозды геледе электрофорез қолданылады. Нәтижелер GelDocGo (Bio-rad, АҚШ) гельдік құжаттама жүйесі арқылы көрнекі түрде көрсетілді [14]. Алынған барлық нәтижелерді статистикалық талдау. Деректер орташа ± стандартты қате ретінде берілген. Алынған мәліметтердің маңыздылығы жұптық Стьюдент тесті арқылы бағаланды.

Зерттеу нәтижелері және оларды талқылау. Жұмыстың нәтижесінде ДНҚ бөліп алу кезінде тиімділігіне СТАВ көмегімен негізгі ДНҚ экстракция әдісінің 36 модификациясы зерттелді. Модификациялар лизис буферінің ерітіндісінің құрамын, инкубация уақыты мен температурасын өзгертуден тұрды. Қолданылған барлық модификациялар және алынған негізгі спектрофотометриялық параметрлер 2-кестеде берілген.

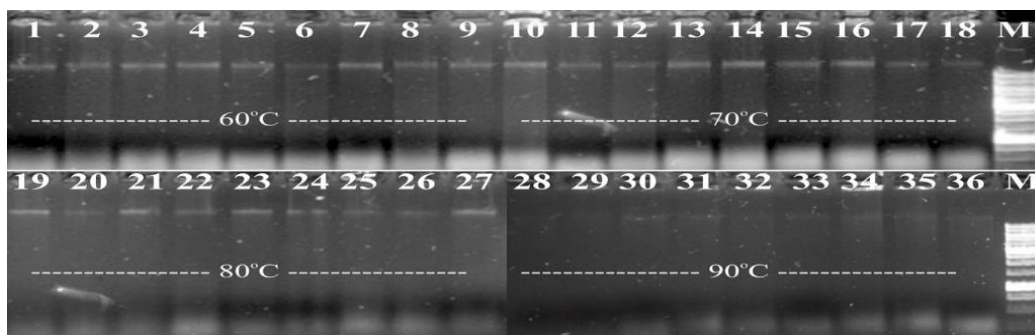
Буферлік ерітінділердің құрамы мен инкубация уақыты оқшауланған ДНҚ саны мен сапасына айтарлықтай әсер етпегенін, ал температура маңыздырақ рөл атқарғанын атап өткен жөн. Осылайша, 60°C температурада біз 0,48-0,71 мкг/мкл концентрациясы бар ДНҚ-ның ерітіндісін ала алдық; 70°C температурада - 0,54-0,65 мкг/мкл; 80°C температурада - 0,58-0,87 мкг/мкл; 90°C - 0,47-0,85 мкг/мкл (2-кесте). Әртүрлі температурада алынған барлық нәтижелерді орташа алсақ, онда ең жоғары ДНҚ-бөлу концентрациясы 80°C – 0,08 мкг/мкл инкубациялау кезінде қол жеткізілді (сурет 1), бұл басқа температураларды қолданған кездегіден 1,2-1,3 есе жоғары болды. Температураның одан әрі жоғарылауы ДНҚ концентрациясының жоғарылауына әкелмеді, сонымен қатар жоғары молекулалық ДНҚ мөлшері төмендеді (2-сурет), ал 230 және 320 нм толқын ұзындығында алынған мөндер өсті. Бұл жоғары молекулалық салмақты ДНҚ-ның ықтимал ыдырауын және ДНҚ-мен бірге басқа заттардың қосымша экстракциясын көрсетеді, сондықтан біз саңырауқұлақ ДНҚ-сын бөліп алу үшін ең оңтайлы температура ретінде 80°C таңдадық.

Содан кейін үлгілер спиртте қосымша қайта тұндыру арқылы тазартылды. Бірінші ұзағырақ ДНҚ тазарту процедурасы нәтижесінде алынған ДНҚ концентрациясын 0,003-0,009 мкг/мкл-ге дейін айтарлықтай төмендететіні көрсетілді (3-кесте), бұл тазартылмаған үлгілерге қарағанда 9-27 есе аз (1-сурет, 2-кесте). Оның үстіне гельдік электрофорезде ДНҚ-ны бөлінгенің көрмедік (3а-сурет). ДНҚ тазартудың екінші әдісі де ДНҚ концентрациясын төмендетті, бірақ біріншісі сияқты емес: 0,022-0,069 мкг/мкл-ге дейін (3-кесте), бұл тазартусыз қарағанда 1,2-3,6 есе аз болды (1-сурет, 2-кесте). Бірақ гельдік электрофорез екінші әдіспен тазартудан кейін жоғары молекулалық ДНҚ-да төмен молекулалы нуклеин қышқылдарының қоспалары жоқ екенін көрсетті (3б-сурет).



1-сурет – СТАВ әдісімен бөлінген ДНҚ-ның сулы ерітінділерінің әртүрлі температураларда концентрациясы

Бұл концентрация 60 – 60°C; 70 – 70°C; 80 – 80°C; 90 – 90°C. Бірдей әріптерден тұратын құралдар жұптастырылған t сынағы ($p < 0,05$) көмегімен статистикалық түрде ерекшеленбеді.



2-сурет – Сипатталған СТАВ әдісін пайдаланып бөлінген ДНҚ-ның агарозды гель электрофорезінің нәтижелері

Үлгі нөмірлері 2-кестедегідей, М – ДНҚ маркері 1 Кб (13 фрагмент 0,25-тен 10 Кб дейінгі, СибЭнзим, Ресей). Электрофорезге 10 мкл сулы ерітіндісі ДНҚ қолданылды

ДНҚ-да төмен молекулалы нуклеин қышқылдарының қоспалары жоқ екенін көрсетті (3 б-сурет). Одан әрі оқшауланған ДНҚ-ны тексерудің маңызды қадамы ПТР өнімдерін алу болды (4-сурет). ПТР саңырауқұлақ таксономиясы үшін кеңінен қолданылатын *ITS1* тізбегі үшін праймерлердің көмегімен орындалғанын атап өту маңызды [13]. ПТР кезінде әрбір оқшауланған үлгіде ПТР реакциясы үшін алынған судағы ДНҚ ерітіндісінің 0,5 және 2 мкл алынды. Содан кейін алынған ПТР өнімдерінің ерекшелігі мен күші гельдік электрофорез көмегімен анықталды. Айта кету керек, біз барлық ДНҚ үлгілерінде *ITS1* тізбегінің ПТР өнімін ала алдық, бірақ 80 және 90°C оқшауланған үлгілерден сигнал тұрақтырақ және күштірек болды. (4в,г-сурет).

Жоғарыда көрсетілгендей, қосымша ДНҚ тазарту оқшауланған ДНҚ концентрациясын айтарлықтай төмендетеді, бәлкім, бұл 0,5 мкл тазартылған ДНҚ қосылған барлық ПТР үлгілерінің басқаларға қарағанда айтарлықтай нашар болғанына әсер етуі мүмкін (4е, д-сурет).

2 мкл тазартылған ДНҚ қосылған ПТР үлгілеріндегі сигналдар деңгейі қосымша тазартусыз ДНҚ бар үлгілерге қарағанда жоғары екенін ескеру маңызды (4е-сурет). Осылайша, ДНҚ-ны қосымша тазарту қадамдарымен пайдалану кезінде ПТР реакциясының негізгі матрицаларын өзгерту маңызды - енгізілген ДНҚ үлгісінің көлемін 20 мкл үшін 2-4 мкл дейін арттыру.

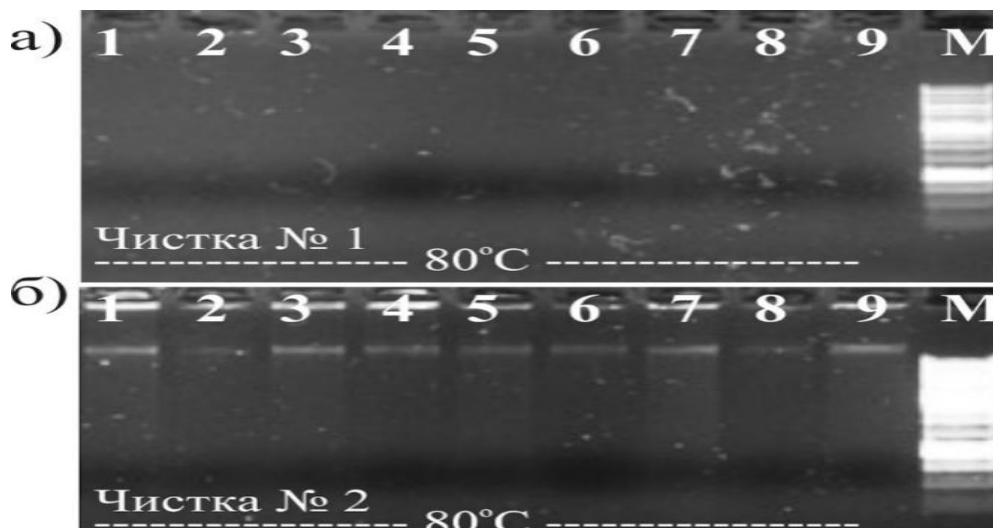
2-кесте – ДНҚ оқшаулаудың СТАВ әдісінің әртүрлі модификациялары арқылы бөлінген ДНҚ-ның сулы ерітінділерінің спектрофотометриялық параметрлері. Буферлік ерітінділердің құрамы 1-кестеде көрсетілген

№	Көрсеткіштер	С, мкг/мкл	230 нм	260 нм	280 нм	320нм	260/280	260/230
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Буфер 1, 60°С, 30мин	0.068 ±0.006	0.036 ±0.005	0.030 ±0.002	0.016 ±0.001	0.002 ±0.001	1.96 ±0.06	0.88 ±0.13
2	Буфер 1, 60°С, 1 сағ	0.071 ±0.006	0.039 ±0.007	0.031 ±0.004	0.018 ±0.002	0.003 ±0.001	1.84 ±0.05	0.86 ±0.14
3	Буфер 1, 60°С, 2 сағ	0.068 ±0.010	0.041 ±0.006	0.032 ±0.004	0.018 ±0.002	0.004 ±0.001	1.93 ±0.03	0.77 ±0.09
4	Буфер 2, 60°С, 30мин	0.048 ±0.004	0.026 ±0.003	0.021 ±0.002	0.011 ±0.001	0.002 ±0.001	1.96 ±0.03	0.79 ±0.10
5	Буфер 2, 60°С, 1 сағ	0.049 ±0.004	0.031 ±0.003	0.022 ±0.002	0.013 ±0.001	0.002 ±0.001	1.80 ±0.07	0.71 ±0.09
6	Буфер 2, 60°С, 2 сағ	0.060 ±0.003	0.039 ±0.005	0.028 ±0.004	0.017 ±0.003	0.004 ±0.001	1.93 ±0.04	0.69 ±0.08
7	Буфер 3, 60°С, 30 мин	0.055 ±0.006	0.029 ±0.006	0.066 ±0.031	0.013 ±0.002	0.002 ±0.001	1.93 ±0.08	0.87 ±0.16
8	Буфер 3, 60°С, 1 сағ	0.067 ±0.011	0.043 ±0.008	0.031 ±0.007	0.019 ±0.004	0.004 ±0.001	1.88 ±0.05	0.73 ±0.11
9	Буфер 3, 60°С, 2 сағ	0.053 ±0.007	0.034 ±0.005	0.024 ±0.002	0.014 ±0.002	0.003 ±0.001	1.86 ±0.03	0.71 ±0.10
10	Буфер 1, 70°С, 30мин	0.065 ±0.006	0.047 ±0.005	0.030 ±0.004	0.018 ±0.003	0.004 ±0.001	1.87 ±0.07	0.63 ±0.08
11	Буфер 1, 70°С, 1 сағ	0.061 ±0.004	0.037 ±0.008	0.025 ±0.006	0.015 ±0.004	0.004 ±0.001	1.90 ±0.06	0.67 ±0.09
12	Буфер 1, 70°С, 2 сағ	0.056 ±0.005	0.039 ±0.008	0.066 ±0.037	0.016 ±0.003	0.005 ±0.001	1.82 ±0.09	0.65 ±0.08
13	Буфер 2, 70°С, 30мин	0.058 ±0.005	0.047 ±0.006	0.028 ±0.04	0.018 ±0.003	0.005 ±0.001	1.79 ±0.07	0.57 ±0.02
14	Буфер 2, 70°С, 1 сағ	0.065 ±0.003	0.052 ±0.003	0.032 ±0.07	0.020 ±0.004	0.006 ±0.001	1.82 ±0.05	0.57 ±0.03
15	Буфер 2, 70°С, 2 сағ	0.054 ±0.003	0.034 ±0.008	0.022 ±0.006	0.016 ±0.003	0.004 ±0.001	1.95 ±0.09	0.61 ±0.02
16	Буфер 3, 70°С, 30мин	0.061 ±0.005	0.047 ±0.011	0.027 ±0.007	0.016 ±0.004	0.004 ±0.002	1.86 ±0.07	0.58 ±0.03
17	Буфер 3, 70°С, 1 сағ	0.060 ±0.008	0.044 ±0.008	0.028 ±0.003	0.015 ±0.003	0.004 ±0.001	1.90 ±0.06	0.57 ±0.04
18	Буфер 3, 70°С, 2 сағ	0.058 ±0.006	0.039 ±0.007	0.027 ±0.004	0.015 ±0.003	0.004 ±0.001	1.87 ±0.06	0.60 ±0.05
19	Буфер 1, 80°С, 30мин	0.081 ±0.015	0.065 ±0.011	0.039 ±0.009	0.025 ±0.008	0.007 ±0.001	1.89 ±0.09	0.56 ±0.05
20	Буфер 1, 80°С, 1 сағ	0.073 ±0.011	0.065 ±0.007	0.033 ±0.005	0.020 ±0.003	0.005 ±0.001	1.95 ±0.10	0.48 ±0.04
21	Буфер 1, 80°С, 2 сағ	0.067 ±0.012	0.055 ±0.009	0.032 ±0.007	0.020 ±0.004	0.009 ±0.004	1.91 ±0.08	0.52 ±0.04

1	2	3	4	5	6	7	8	9
22	Буфер 2, 80°C, 30мин	0.077 ±0.006	0.063 ±0.010	0.037 ±0.004	0.022 ±0.003	0.006 ±0.002	1.94 ±0.07	0.58 ±0.07
23	Буфер 2, 80°C, 1 сағ	0.083 ±0.009	0.067 ±0.008	0.039 ±0.004	0.023 ±0.002	0.006 ±0.001	1.98 ±0.08	0.55 ±0.05
24	Буфер 2, 80°C, 2 сағ	0.063 ±0.007	0.050 ±0.006	0.030 ±0.003	0.018 ±0.002	0.006 ±0.003	1.94 ±0.07	0.58 ±0.04
25	Буфер 3, 80°C, 30мин	0.087 ±0.006	0.070 ±0.007	0.043 ±0.004	0.027 ±0.003	0.009 ±0.002	1.86 ±0.07	0.57 ±0.03
26	Буфер 3, 80°C, 1 сағ	0.064 ±0.004	0.051 ±0.003	0.029 ±0.003	0.016 ±0.003	0.004 ±0.002	2.01 ±0.11	0.54 ±0.06
27	Буфер 3, 80°C, 2 сағ	0.058 ±0.011	0.049 ±0.003	0.027 ±0.006	0.015 ±0.004	0.004 ±0.002	2.05 ±0.12	0.51 ±0.04
28	Буфер 1, 90°C, 30мин	0.047 ±0.006	0.042 ±0.006	0.020 ±0.003	0.012 ±0.002	0.004 ±0.001	1.94 ±0.08	0.44 ±0.03
29	Буфер 1, 90°C, 1 сағ	0.053 ±0.008	0.055 ±0.016	0.025 ±0.004	0.015 ±0.003	0.003 ±0.001	1.92 ±0.08	0.40 ±0.03
30	Буфер 1, 90°C, 2 сағ	0.068 ±0.004	0.058 ±0.005	0.033 ±0.002	0.021 ±0.002	0.006 ±0.001	1.87 ±0.07	0.53 ±0.04
31	Буфер 2, 90°C, 30мин	0.051 ±0.005	0.042 ±0.006	0.023 ±0.003	0.013 ±0.003	0.003 ±0.001	1.92 ±0.09	0.54 ±0.04
32	Буфер 2, 90°C, 1 сағ	0.061 ±0.010	0.060 ±0.009	0.029 ±0.005	0.017 ±0.004	0.005 ±0.001	1.93 ±0.08	0.43 ±0.03
33	Буфер 2, 90°C, 2 сағ	0.085 ±0.023	0.073 ±0.022	0.042 ±0.013	0.026 ±0.009	0.008 ±0.003	1.58 ±0.22	0.54 ±0.02
34	Буфер 3, 90°C, 30мин	0.078 ±0.020	0.064 ±0.017	0.037 ±0.009	0.023 ±0.007	0.005 ±0.003	1.53 ±0.23	0.54 ±0.03
35	Буфер 3, 90°C, 1 сағ	0.076 ±0.011	0.072 ±0.013	0.035 ±0.009	0.021 ±0.008	0.005 ±0.003	1.95 ±0.21	0.49 ±0.08
36	Буфер 3, 90°C, 2 сағ	0.069 ±0.008	0.054 ±0.005	0.032 ±0.006	0.019 ±0.004	0.005 ±0.002	1.90 ±0.09	0.32 ±0.11

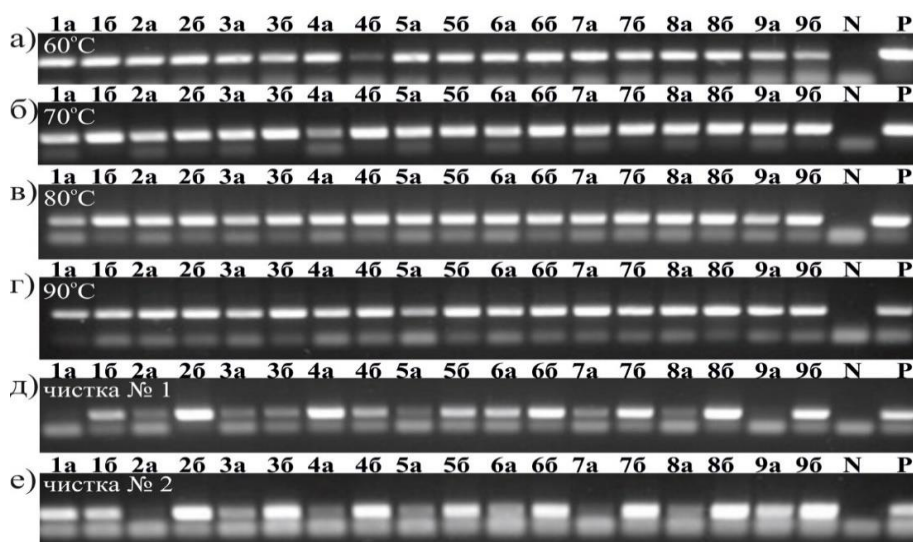
3-кесте – 80⁰С температурада ДНҚ оқшаулау үшін СТАВ әдісінің әртүрлі модификацияларымен бөлінген және бірінші және екінші ДНҚ тазарту әдістерін қолдану арқылы қосымша тазартылған ДНҚ су ерітінділерінің спектрофотометриялық параметрлері

№	Көрсеткіштер	C, кг/мкл	230 нм	260 нм	280 нм	320нм	260/280	260/230
Бірінші іқосымша тазалау процедурасы								
1	Буфер 1, 80°C, 30мин	0.003 ±0.001	0.007 ±0.005	0.007 ±0.003	0.005 ±0.001	0.002 ±0.001	1.56 ±0.06	1.90 ±0.35
2	Буфер 1, 80°C, 1 сағ	0.006 ±0.001	0.012 ±0.002	0.017 ±0.003	0.012 ±0.002	0.005 ±0.001	1.71 ±0.09	0.96 ±0.26
3	Буфер 1, 80°C, 2 сағ	0.003 ±0.001	0.005 ±0.003	0.005 ±0.003	0.004 ±0.003	0.004 ±0.002	1.41 ±0.28	1.18 ±0.06
4	Буфер 2, 80°C, 30мин	0.009 ±0.005	0.013 ±0.003	0.011 ±0.004	0.005 ±0.003	0.406 ±0.233	1.38 ±0.22	0.74 ±0.26
5	Буфер 2, 80°C, 1 сағ	0.004 ±0.002	0.007 ±0.003	0.011 ±0.005	0.008 ±0.004	0.003 ±0.002	1.75 ±0.12	1.28 ±0.39
6	Буфер 2, 80°C, 2 сағ	0.004 ±0.002	0.005 ±0.002	0.009 ±0.003	0.006 ±0.002	0.002 ±0.001	1.64 ±0.11	1.88 ±0.41
7	Буфер 3, 80°C, 30 мин	0.005 ±0.003	0.010 ±0.007	0.011 ±0.007	0.008 ±0.004	0.003 ±0.002	1.34 ±0.29	1.50 ±0.49
8	Буфер 3, 80°C, 1 сағ	0.004 ±0.002	0.002 ±0.001	0.008 ±0.002	0.005 ±0.002	0.001 ±0.001	1.75 ±0.17	1.75 ±0.25
9	Буфер 3, 80°C, 2 сағ	0.005 ±0.003	0.017 ±0.011	0.013 ±0.008	0.009 ±0.005	0.005 ±0.003	1.64 ±0.28	0.79 ±0.21
10	Буфер 1, 80°C, 30мин	0.025 ±0.005	0.017 ±0.003	0.013 ±0.005	0.009 ±0.004	0.003 ±0.001	1.55 ±0.12	0.73 ±0.11
11	Буфер 1, 80°C, 1 сағ	0.022 ±0.003	0.025 ±0.003	0.019 ±0.003	0.014 ±0.003	0.005 ±0.002	1.51 ±0.09	0.72 ±0.10
12	Буфер 1, 80°C, 2 сағ	0.031±0.009	0.021 ±0.008	0.016 ±0.007	0.011 ±0.004	0.005 ±0.002	1.59 ±0.09	0.72 ±0.09
13	Буфер 2, 80°C, 30мин	0.045±0.008	0.033 ±0.003	0.023 ±0.005	0.016 ±0.004	0.005 ±0.003	1.52 ±0.14	0.67 ±0.09
14	Буфер 2, 80°C, 1 сағ	0.032±0.007	0.019 ±0.002	0.015 ±0.003	0.011 ±0.003	0.003 ±0.002	1.68 ±0.07	0.77 ±0.08
15	Буфер 2, 80°C, 2 сағ	0.033±0.009	0.026 ±0.009	0.019 ±0.007	0.014 ±0.006	0.006 ±0.003	1.70 ±0.13	0.64 ±0.07
16	Буфер 3, 80°C, 30мин	0.049±0.023	0.039 ±0.021	0.030 ±0.018	0.022 ±0.011	0.007 ±0.004	1.81 ±0.19	0.75 ±0.07
17	Буфер 3, 80°C, 1 сағ	0.069±0.026	0.054 ±0.023	0.037 ±0.016	0.025 ±0.011	0.009 ±0.005	1.81 ±0.14	0.71 ±0.08
18	Буфер 3, 80°C, 2 сағ	0.024±0.008	0.012 ±0.003	0.010 ±0.005	0.007 ±0.004	0.005 ±0.003	1.97 ±0.45	0.73 ±0.10



3-сурет – Әртүрлі әдістермен тазартудан кейін 80°C инкубацияда сипатталған СТАВ әдісін пайдаланып бөлінген ДНҚ-ның агарозды гель электрофорезінің нәтижелері

1-9 үлгі сандары 2-кестедегі 19-27 сандарына сәйкес келеді. М – 1 Кб ДНҚ маркер (0,25-тен 10 Кб-қа дейінгі 13 фрагмент, (СибЭнзим, Ресей). Электрофорезге 10 мкл сулы ерітіндісі ДНҚ қолданылды.



4-сурет – СТАВ әдісінің әртүрлі модификациялары арқылы бөлінген ДНҚ-дан алынған *ITS1* ген аралық аймағының ПТР өнімдерінің агарозды гель электрофорезінің нәтижелері

Агарозды геле электрофорез нәтижелері СТАВ әдісінің түрлі модификацияларымен бөлінген ДНҚ-дан алынған *ITS1* аралық кеңістік учаскелерінің ПТР өнімдерін көрсетеді. Ұяшықтар нөмірленгендегі «а» және «б» әріптері ПТР үшін алынған ДНҚ мөлшерін білдіреді – 0,5- және 2 мкл. (а) 60°C температурада бөлінген ДНҚ-дан алынған ПТР өнімдері, нөмірлер 1-9 сәйкес келеді, ал 2 кестедегі 1-9 аралығына сәйкес келеді; (б) 70°C температурада бөлінген ДНҚ бойынша 1-9 сандары 2 кестенің 10-18 сандарына сәкес келеді; (в) 80°C температурада бөлінген ДНҚ бойынша 1-9 сандары 2- кестедегі 19-27 сандарына сәйкес келеді. (г) 90°C температурада бөлінген ДНҚ бойынша 1-9 сандары 2-кестедегі 28-36 сандарына сәйкес келеді. (д) 80°C температурада бөлінген және бірінші тазарту схемасы бойынша қосымша тазартылған ДНҚ-дан алынған ПТР өнімдері, нөмірлер

1-9 сәйкес келеді 2-кестедегі 19-27 нөмірлеріне; (е) 80°C температурада бөлінген және екінші тазарту схемасы бойынша қосымша тазартылған ДНҚ-дан алынған ПТР өнімдері, нөмірлер 1-9 сәйкес келеді 2-кестедегі 19-27 нөмірлеріне. Электрофорезге 20 мкл ПТР өнімі қолданылады.

Қорытынды. Осылайша, біз саңырауқұлақтардың ДНҚ бөліп алу әдістерін оңтайландырдық, бұл тиімді ПТР реакцияларын жүргізуге жарамды, жеткілікті жоғары концентрациядағы ДНҚ-ы бөліп алуға мүмкіндік береді. Осыдан 80°C температура 30 минут -1 сағ ішінде буферлік ертінділердің ұсынылған нұсқалары жақсы нәтиже көрсетті. Егер төмен молекулалық нуклеин қышқылдарының қоспалары жоқ жоғары молекулалы ДНҚ қажет болса, онда ұсынылған схема бойынша (№2) қосымша тазарту жүргізу ұсынылады, бірақ бұл оқшауланған ДНҚ мөлшерінің төмендеуіне әкеледі, сол себепті әрі қарай ПТР-дағы реакциясына қосылатын матрицаның көлемін ұлғайту қажет болады.

Әдебиеттер:

- [1] **Ivanova, N.V.,** Fazekas A.J., Hebert D.N. Semi-automated, membrane-based protocol for DNA isolation from plants //Plant Molecular Biology Reporter. – 2008. – Vol. 26. – P. 186-198.
- [2] **Reverchon, F.,** et al. Shifts in the rhizosphere microbiome and exudation profile of avocado (*Persea americana* Mill.) during infection by *Phytophthora cinnamomi* and in presence of a biocontrol bacterial strain //CABI Agriculture and Bioscience. – 2023. – Vol. 4. – №. 1. – P. 23. <https://doi.org/10.1186/s43170-023-00167-1>.
- [3] **Rodriguez, R.J.,** et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles //New phytologist. – 2009. – Vol. 182. – №. 2. – P. 314-330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>.
- [4] **Segaran, G.,** Sathiavelu M. Fungal endophytes: A potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir //Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2019. – Vol. 21. – C. 101284.
- [5] **Busby, P.E.,** Ridout M., Newcombe G. Fungal endophytes: modifiers of plant disease //Plant molecular biology.–2016.– Vol. 90. – P. 645-655. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0412-0>.
- [6] **Collinge, D.B.,** B Jensen., H.J.Jørgensen. Fungal endophytes in plants and their relationship to plant disease //Current Opinion in Microbiology. – 2022. – Vol 69. – P. 102177. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102177>.
- [7] **Sharma, I.,** et al. Fungal endophyte bioinoculants as a green alternative towards sustainable agriculture //Heliyon.–9 e19487. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19487>
- [8] **K.Tripathy, S.,** et al. Exploring rapid and efficient protocol for isolation of fungal DNA //International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – 2017. – Vol. 6. – №. 3. – P. 951-960. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.603.113>.
- [9] **Chithra, S.J.,** B. Jasim. Endophytic *Phomopsis* sp. colonization in *Oryza sativa* was found to result in plant growth promotion and piperine production //Physiologia plantarum. –2017.– №. 4. 160, P. 437–446. <https://doi.org/10.1111/ppl.12556>
- [10] **García-Latorre, C.,** Rodrigo S., Santamaría O. Potential of fungal endophytes isolated from pasture species in Spanish dehesas to produce enzymes under salt conditions //Microorganisms.–2023.– Vol.11.–№.4.–P.908. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040908>
- [11] **Красильникова, Л.А.** Биохимия растений. – 2004. – С. 163-164.
- [12] **Kiselev, K.V.,** Dubrovina A.S., Tyunin A.P. The methylation status of plant genomic DNA influences PCR efficiency //Journal of plant physiology.–2015.– Vol.175.–P.59-67. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.10.017>.
- [13] **Борисова, Г.Г.,** Ермошин А.А., Малева М. Г., Чукина Н.В. Основы биохимии вторичного обмена растений: учебно-методическое пособие.М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2014. – 128 с.
- [14] **White, T. J.,** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics //PCR Protocols: A guide to methods and applications/Academic Press, Inc. – 1990. pp. 315-322.

[15] **Tüzel, Y** et al. Utilization of olive oil processing waste composts in organic tomato seedling production //Agronomy. – 2020. – Vol. 10. – №. 6. – P. 797.

[16] **De Paula, N.M.**, et al. Biotechnological potential of fungi from a mangrove ecosystem: Enzymes, salt tolerance and decolorization of a real textile effluent // Microbiological Research. – 2022. – Vol. 254. – P. 126-137.

References:

[1] **Ivanova, N.V.**, Fazekas A.J., Hebert D.N. Semi-automated, membrane-based protocol for DNA isolation from plants //Plant Molecular Biology Reporter. – 2008. – T. 26. – C. 186-198.

[2] **Reverchon, F.** et al. Shifts in the rhizosphere microbiome and exudation profile of avocado (*Persea americana* Mill.) during infection by *Phytophthora cinnamomi* and in presence of a biocontrol bacterial strain //CABI Agriculture and Bioscience. – 2023. – T. 4. – №. 1. – C. 23. <https://doi.org/10.1186/s43170-023-00167-1>.

[3] **Rodriguez, R.J.** et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles //New phytologist. – 2009. – T. 182. – №. 2. – C. 314-330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>

[4] **Segaran, G.**, Sathiavelu M. Fungal endophytes: A potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir //Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2019. – T. 21. – C. 101284.

[5] **Busby, P.E.**, Ridout M., Newcombe G. Fungal endophytes: modifiers of plant disease //Plant molecular biology.–2016.–T. 90. – C. 645-655. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0412-0>

[6] **Collinge, D.B.**, Jensen B., Jørgensen H. J. L. Fungal endophytes in plants and their relationship to plant disease //Current Opinion in Microbiology. – 2022. – T. 69. – C. 102177. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102177>

[7] **Sharma, I.** et al. Fungal endophyte bioinoculants as a green alternative towards sustainable agriculture //Heliyon. – 9, e19487. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19487>

[8] **Tripathy, S.K.** et al. Exploring rapid and efficient protocol for isolation of fungal DNA //International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – 2017. – T. 6. – №. 3. – C. 951-960. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.603.113>

[9] **Chithra, S.J.**, B. Jasim. Endophytic *Phomopsis* sp. colonization in *Oryza sativa* was found to result in plant growth promotion and piperine production //Physiologia plantarum. –2017.– №. 4. 160, 437–446. <https://doi.org/10.1111/pp1.12556>

[10] **García-Latorre, C.**, Rodrigo S., Santamaría O. Potential of fungal endophytes isolated from pasture species in Spanish dehesas to produce enzymes under salt conditions //Microorganisms.– 2023.–T.11.–№.4.–C.908. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040908>

[11] **Krasilnikova, L.A.** Biohimiya rastenii. – 2004. – S. 163-164.. [in Russian]

[12] **Kiselev, K.V.**, Dubrovina A.S., Tyunin A.P. The methylation status of plant genomic DNA influences PCR efficiency //Journal of plant physiology.–2015.–T.175.–C.59-67. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.10.017>

[13] **Borisova, G.G.**, Ermoşin A.A., Maleva M. G., Chukina N.V. Osnovy biohimii vtorichnogo obmena rastenii: uchebno-metodicheskoe posobie.M-vo obrazovaniya i nauki Ros. Federatsii, Ural. feder. un-t. – Ekaterinburg: İzd-vo Ural. un-ta, 2014. – 128 s. [in Russian]

[14] **White, T.J.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics //PCR Protocols: A guide to methods and applications/Academic Press, Inc. – 1990. pp. 315-322

[15] **Tüzel, Y.**, et al. Utilization of olive oil processing waste composts in organic tomato seedling production //Agronomy. – 2020. – T. 10. – №. 6. – C. 797.

[16] **De Paula, N.M.**, et al. Biotechnological potential of fungi from a mangrove ecosystem: Enzymes, salt tolerance and decolorization of a real textile effluent //Microbiological Research. – 2022. – T. 254. – C. 126899.

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА СТАВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ ЭНДОФИТНЫХ ГРИБОВ

Жанбыршина Н.Ж.^{1*}, кандидат сельскохозяйственных наук
Киселев К.В.², кандидат биологических наук
Алейнова О.А.², кандидат биологических наук

¹*Казахский агротехнический исследовательский университет им.С. Сейфуллина, Казахстан, г.Астана*

²*Федеральный научный центр Биоразнообразия Наземной Биоты Восточной Азии, ДВО РАН, г.Владивосток, Россия*

Аннотация. Предложен новый метод экстракции ДНК из эндофитных грибов, основанный на дополнительном этапе очистки с использованием бромид цетилтриметиламмония (СТТА). Качество и количество ДНК, выделенной этим методом, оценивались относительно различных факторов, включая состав СТАВ-буфера, температуру и время инкубации. Результаты экспериментов показали, что наибольшее количество ДНК выделяется при температуре 80°C и времени инкубации от 30 минут до 1 часа. ПЦР с маркерной областью ITS1 при этих условиях дала самый сильный сигнал. Дополнительная очистка ДНК с использованием этанола и ацетата натрия уменьшает количество выделенной ДНК, но улучшает интенсивность ПЦР-сигнала. Для разработки методов использования эндофитных грибов с целью стимулирования роста растений и повышения их устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам крайне важно понять геномную структуру этих грибов. Геномные исследования и идентификация видов эндофитных грибов являются необходимыми шагами, и для этого активно используются методы молекулярной биологии. Таким образом, предложенный метод является эффективной и доступной альтернативой коммерческим наборам для экстракции ДНК из грибов и дрожжей.

Ключевые слова: молекулярная генетика, растения, ПЦР, ITS, СТАВ, грибы, эндофит.

MODIFICATION OF THE CTAB METHOD FOR DNA EXTRACTION FROM ENDOPHYTIC FUNGI

Zhanbyrshina N.Zh.^{1*}, Candidate of Agricultural Sciences
Kiselev K.V.², Candidate of Biology Sciences
Aleinova O.A.², Candidate of Biology Sciences

S. Seifullin Kazakh Agrotechnical Research University, Kazakhstan, Astana
Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

Annotation. A new method for DNA extraction from endophytic fungi is proposed, based on an additional purification step using cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). The quality and quantity of DNA extracted by this method were comparatively assessed, taking into account various factors, including the composition of the CTAB buffer, temperature, and incubation time. Experimental results revealed that the highest DNA yield was obtained at 80°C with an incubation time ranging from 30 minutes to 1 hour. PCR with the ITS1 marker region under these conditions gave the strongest signal. Additional DNA purification using ethanol and sodium acetate reduced the amount of isolated DNA, but improved the intensity of the PCR signal. Understanding the genomic structure of these fungi is crucial for developing methods to use endophytic fungi to stimulate plant growth and enhance their resistance to biotic and abiotic stresses. Genomic studies and identification of endophytic fungal species are essential steps, and molecular biology techniques are actively used for this purpose. Thus, the proposed method is an efficient and accessible alternative to commercial kits for DNA extraction from fungi and yeasts.

Keywords: molecular genetics, plants, PCR, ITS, CTAB, fungi, endophyte.