

Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin, e-mail: [magdalena.zapalska@up.lublin.pl](mailto:magdalena.zapalska@up.lublin.pl)

KRZYSZTOF KOWALCZYK, ANGELIKA JARUGA,  
MAGDALENA ZAPALSKA

**Porównanie wydajności metod izolacji DNA  
z igieł i drewna modrzewia europejskiego  
(*Larix decidua* Mill.)**

---

Comparison of the DNA extraction methods efficiency from needles and wood  
of European larch (*Larix decidua* Mill.)

**Streszczenie.** Izolacja DNA jest często pierwszym etapem w analizach molekularnych drzew. Celem pracy było porównanie wydajności sześciu wybranych metod izolacji DNA z materiału wyjściowego, który stanowiły igły modrzewia europejskiego zebrane na początku oraz pod koniec okresu wegetacyjnego (w kwietniu i we wrześniu), a także drewno bielaste i twarde. Stężenie i czystość wyizolowanych preparatów DNA poddano ocenie spektrofotometrycznej. Po przeanalizowaniu wyników wybrano najlepsze (spośród testowanych) metody do izolacji DNA z igieł modrzewia oraz drewna bielastego. Testowane metody nie pozwoliły na wyizolowanie dobrze oczyszczonego DNA z drewna twardego.

**Słowa kluczowe:** *Larix decidua*, izolacja DNA, drewno, igły

WSTĘP

Modrzew europejski (*Larix decidua* Mill.), razem z pozostałymi gatunkami lasotwórczymi w Polsce, wymaga lepszego poznania struktury genetycznej, kluczowej w zachowaniu różnorodności biologicznej w lasach. Analizy DNA pozwalają nie tylko na lepsze zbadanie poszczególnych gatunków drzew na poziomie wewnątrz- i międzypopulacyjnym, lecz także na identyfikację i badanie tożsamości leśnego materiału rozmnożeniowego, hodowlę selekcyjną wspieraną markerami czy weryfikację przynależności taksonomicznej, szczególnie ważną w przypadku gatunków drzew łatwo krzyżu-

jących się, tworzących liczne mieszańce międzygatunkowe [Jagielska 2008, Nowakowska i in. 2010, Chałupka i in. 2011].

Pierwszym etapem analiz molekularnych drzew jest zwykle izolacja całościowego (genomowego) DNA. Sposób, w jaki DNA zostanie wyekstrahowane, ma istotny wpływ na przebieg późniejszych analiz i doświadczeń. Ilość i jakość wyizolowanego DNA zależy m.in. od typu i wieku tkanki oraz od metody wykorzystanej do ekstrakcji DNA [Warner 1996]. Tkanki drzew stanowią trudny materiał do izolacji DNA ze względu na dużą zawartość polisacharydów i metabolitów wtórnych, m.in. polifenoli, żywic, gum oraz garbników [Wilkie 1997, Sharma i in. 2002, Słomski i in. 2004]. Te substancje akumulują się w tkankach drzew podczas rozwoju wegetatywnego i mogą utrudniać przeprowadzenie analiz molekularnych ze względu na hamowanie białek enzymatycznych, takich jak polimeraza DNA czy enzymy restrykcyjne [Ostrowska i in. 1998, Sharma i in. 2002].

Pomimo częstego wykorzystywania igieł i liści drzew jako materiału wyjściowego do izolacji DNA równie ważne jest znalezienie optymalnej metody pozyskiwania DNA z tkanek zdrewniałych, ponieważ w przypadku kradzieży drewna właśnie ta tkanka stanowi podstawowy materiał dowodowy w postępowaniu sądowym [Nowakowska i in. 2010, Nowakowska i Pasternak 2014].

Poszczególne gatunki drzew leśnych różnią się zawartością metabolitów wtórnych w tkankach, w związku z czym istnieje konieczność doboru odpowiedniej metody ekstrakcji DNA do badanego gatunku drzewa. W związku z tym celem pracy było porównanie wydajności wybranych metod izolacji DNA z materiału wyjściowego, który stanowiły igły modrzewia europejskiego zebrane na początku oraz pod koniec okresu wegetacyjnego, a także drewno bielaste i twardzielowe.

## MATERIAŁ I METODY

### **Materiał roślinny**

Materiał do badań pobrany został z 6 okazów modrzewia europejskiego (*L. decidua* Mill.), które stanowiły powtórzenia biologiczne. Do analiz wykorzystano igły modrzewia oraz tkanki zdrewniałe. Igły pobrano pod koniec kwietnia, kiedy były już w pełni rozwinięte (6 próbek, po jednej próbce z każdego drzewa) oraz na początku września, przed ich opadnięciem (6 próbek, jak wyżej). Ze ściętych drzew otrzymano krążki o przekroju poprzecznym, z widocznie oddzielającą się warstwą bielu i twardzieli. W krążkach wywiercono otwory (osobno dla bielu i twardzieli – ryc. 1), a uzyskane w ten sposób wióry drzewne stanowiły materiał wykorzystywany do dalszych badań. Próbkę bielu pobrano około 1 cm od warstwy kambium. Analizowano 6 próbek drewna bielastego (po jednej próbce z każdego drzewa) i 6 próbek drewna twardzielowego (jak wyżej).



Ryc. 1. Przekrój pniaka z widocznymi miejscami, z których za pomocą wiertła pobierano tkanki drewna do izolacji DNA (fot. A. Jaruga)

### Izolacja DNA

Do czasu przeprowadzenia analiz materiał przechowywano w temperaturze  $-30^{\circ}\text{C}$ . Izolację DNA przeprowadzano ze 100 mg tkanki roztartej w ciekłym azocie. Testowano 6 metod izolacji DNA:

1. Według Keb-Llanesa i in. [2002] z dodatkowym etapem trawienia RNazą A o stężeniu 1 mg/ml w ilości 5  $\mu\text{l}$  na próbkę.

Roztartą tkankę przeniesiono do 2 ml probówek Eppendorfa zawierających 100  $\mu\text{l}$  20% roztworu SDS. Dodano 300  $\mu\text{l}$  buforu A (2% CTAB; 100 mM Tris – HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA, pH 8,0; 4% PVP-40 000; 1,4 M NaCl; 0,1% kwas askorbinowy; 10 mM  $\beta$ -merkaptotanol) i 900  $\mu\text{l}$  buforu B (100 mM Tris – HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA, pH 8,0; 100 mM NaCl; 10 mM  $\beta$ -merkaptotanol). Próbki inkubowano (10 min/ $65^{\circ}\text{C}$ ). Dodano 410  $\mu\text{l}$  zimnego 5 M octanu potasu i wymieszano przez inwersję. Zwirowano (15 min/12 900 rpm/  $4^{\circ}\text{C}$ ). Supernatant przeniesiono do nowych probówek. Dodano 0,6 V zimnego izopropanolu. Inkubowano na lodzie przez 20 min. Zwirowano (10 min/10 000 rpm). Osad przemyto 70% etanolem, wysuszono i zawieszono w 600  $\mu\text{l}$  buforu TE. Dodano 60  $\mu\text{l}$  3 M octanu sodu i 360  $\mu\text{l}$  zimnego izopropanolu. Inkubowano na lodzie przez 20 min. Próbki zwirowano (10 min/10 000 rpm) i powtórzono płukanie 70% etanolem, rozpuszczanie w buforze TE i wytrącanie. Osad rozpuszczono w 50  $\mu\text{l}$  buforu TE. Dodano 5  $\mu\text{l}$  RNazy A (1 mg/ml) i inkubowano (1 h/ $37^{\circ}\text{C}$ ).

2. Według Deshmukha i in. [2007] z modyfikacjami – zastosowano 100 mM Tris – HCl zamiast 100 mM HEPES w składzie buforu płuczącego oraz trawienie RNazą A o stężeniu 1 mg/ml w ilości 5  $\mu$ l na próbkę.

Roztartą tkankę przeniesiono do 2 ml probówek Eppendorfa. Dodano 1000  $\mu$ l buforu płuczącego (100 mM Tris – HCl, pH 8.0; 0,1 % PVP-40 000; 4%  $\beta$ -merkaptotanol) i zworteksowano. Zwirowano (3 min/11 400 rpm). Przemycanie rozartej tkanki powtórzono cztery razy, w celu usunięcia lepkich zanieczyszczeń. Dodano 1 000  $\mu$ l buforu ekstrakcyjnego (15% sacharoza; 50 mM Tris – HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM NaCl). Zwirowano (5 min/ 9 600 rpm). Supernatant wylano. Do osadu dodano 450  $\mu$ l buforu zawieszającego (20 mM Tris – HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA, pH 8.0) i 80  $\mu$ l 10% SDS. Inkubowano (15 min/70°C). Ostudzono do temperatury pokojowej i dodano 300  $\mu$ l 7.5 M octanu amonu. Inkubowano na lodzie przez 30 min. Zwirowano (15 min/11 400 rpm). Przeniesiono górną warstwę do nowych probówek. Dodano 1 V zimnego izopropanolu. Zwirowano (15 min/11 400 rpm). Osad dwukrotnie przepłukano 70% etanolem. Wyszuszony osad rozpuszczono w 150  $\mu$ l buforu TE. Dodano 5  $\mu$ l RNazy A (1 mg/ml) i inkubowano (1h/37°C). Dodano 1 V mieszaniny chloroformu z alkoholem izoamylovym (24 : 1) i zmieszano. Zwirowano (10 min/11 400 rpm). Górną warstwę przeniesiono do nowych probówek. Dodano  $\frac{1}{10}$  V 7.5 M octanu amonu oraz 2 V zimnego absolutnego etanolu. Inkubowano (20 min/-30°C). Zwirowano (10 min/12 800 rpm). Osad przemyto 70% etanolem. Rozpuszczono w 50  $\mu$ l buforu TE.

3. Według Novaesa i in. [2009] z modyfikacjami – zastosowano trawienie RNazą A o stężeniu 1 mg/ml w ilości 5  $\mu$ l na próbkę.

Roztartą tkankę przeniesiono do 2 ml probówek Eppendorfa zawierających 1 ml buforu ekstrakcyjnego (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 100 mM Tris – HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA, pH 8,0; 2% PVP-40 000). Zamieszano przez inwersję. Dodano 35  $\mu$ l proteinazy K (1 mg/ml) i 35  $\mu$ l 20% SDS. Zmieszano przez inwersję. Inkubowano (1 h/60°C), od czasu do czasu mieszając. Dodano 600  $\mu$ l mieszaniny chloroformu z alkoholem izoamylovym (24 : 1) i mieszano przez inwersję (5 min). Zwirowano (15 min/15 300 rpm). Przeniesiono supernatant do nowych probówek. Dodano 140  $\mu$ l 10% CTAB i 280  $\mu$ l 5 M NaCl. Wymieszano. Powtórzono ekstrakcję mieszaniną chloroformu z alkoholem izoamylovym. Dodano 1 V zimnego izopropanolu i inkubowano przez całą noc w temperaturze -20°C. Zwirowano (10 min/15 300 rpm). Osad trzykrotnie przemyto zimnym 70% etanolem. Rozpuszczono w 50  $\mu$ l buforu TE. Dodano 5  $\mu$ l RNazy A (1 mg/ml) i inkubowano (1 h/ 37°C).

4. Według Ziegenhagena i in. [1993] z modyfikacjami – zastosowano trawienie RNazą A o stężeniu 1 mg/ml w ilości 5  $\mu$ l na próbkę oraz trzykrotną ekstrakcję za pomocą 350  $\mu$ l mieszaniny fenolu z chloroformem i alkoholem izoamylovym (25 : 24 : 1) zamiast oddzielnych ekstrakcji za pomocą fenolu, mieszaniny fenolu z chloroformem oraz chloroformu.

Roztartą tkankę przeniesiono do probówek Eppendorfa o pojemności 2 ml zawierających 800  $\mu$ l buforu ekstrakcyjnego (100 mM octanu sodu, pH 5,2; 50 mM EDTA, pH 8,0; 500 mM NaCl; 2% PVP-40 000; 1,4% SDS) podgrzanego do temperatury 65°C. Inkubowano (20 min/65°C). Zwirowano (15 min/14 000 rpm). Supernatant przeniesiono do nowych probówek. Dodano  $\frac{1}{3}$  V 5 M octanu potasu. Inkubowano na lodzie (30 min). Zwirowano (10 min/10 000 rpm/ 4°C). Przeniesiono supernatant do nowych

próbówek. Dodano 0.6 V izopropanolu. Inkubowano (30 min/ $-20^{\circ}\text{C}$ ). Zwirowano (15 min/ 14 000 rpm/  $4^{\circ}\text{C}$ ). Osad rozpuszczono w 350  $\mu\text{l}$  buforu TE. Dodano 5  $\mu\text{l}$  RNazy A (1 mg/ml) i inkubowano (30 min/ $37^{\circ}\text{C}$ ). Przeprowadzono trzykrotną ekstrakcję dodając za każdym razem 350  $\mu\text{l}$  mieszaniny fenolu z chloroformem i alkoholem izoamylowym (25 : 24 : 1). Po dodaniu mieszaniny ekstrakcyjnej mieszano przez inwersję, wirovano (10 min/14 000 rpm) i przenoszono górną warstwę do nowej próbówki. Dodano 350  $\mu\text{l}$  mieszaniny chloroformu z alkoholem izoamylowym (24 : 1), mieszano przez inwersję i zwirowano (10 min/14 000 rpm). Do supernatantu dodano 2.5 V 96% etanolu i  $\frac{1}{10}$  V 3 M octanu sodu. Inkubowano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  przez całą noc. Zwirowano (30 min/14 000 rpm/ $4^{\circ}\text{C}$ ). Osad przepłukano 70% etanolem. Wyszuszone osad rozpuszczono w 50  $\mu\text{l}$  buforu TE.

5. Wg Porebski i in. [1997] z modyfikacjami – zmiana skali izolacji z makro na mikro.

Roztartą tkankę przeniesiono do próbek Eppendorfa o pojemności 2 ml. Dodano 800  $\mu\text{l}$  buforu ekstrakcyjnego (100 mM Tris – HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20mM EDTA, pH 8,0; 0,2% CTAB; 0,3%  $\beta$ -merkaptotanol; 1 % PVP-40 000). Inkubowano (1h / $60^{\circ}\text{C}$ ). Dodano 800  $\mu\text{l}$  mieszaniny chloroformu z alkoholem izoamylowym (24 : 1) i mieszano przez inwersję (20 min). Zwirowano (20 min/3000 rpm). Przeniesiono górną warstwę do nowej próbówki. Dodano  $\frac{1}{2}$ V 5M NaCl. Wymieszano. Dodano 2V zimnego 96% etanolu. Zamieszano. Inkubowano w lodzie przez 20 min. Zwirowano (10 min/10 000 rpm). Przepłukano 70% etanolem. Osad rozpuszczono w 300  $\mu\text{l}$  buforu TE przez noc ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Dodano 5  $\mu\text{l}$  RNazy A (1 mg/ml). Inkubowano (1 h/ $37^{\circ}\text{C}$ ). Dodano 3  $\mu\text{l}$  proteiny K (1 mg/ml). Inkubowano (30 min/ $37^{\circ}\text{C}$ ). Dodano 300  $\mu\text{l}$  mieszaniny fenolu z chloroformem i alkoholem izoamylowym (25 : 24 : 1). Mieszano przez inwersję (5 min). Zwirowano (12 min/14 000 rpm). Przeniesiono górną warstwę do nowych próbek. Przeprowadzono reekstrakcję, dodając 50  $\mu\text{l}$  buforu TE do fazy organicznej. Dodano  $\frac{1}{10}$  V 3M octanu sodu i 2V zimnego, absolutnego etanolu. Zamieszano. Inkubowano przez noc w  $-30^{\circ}\text{C}$ . Zwirowano (20 min/14 000 rpm). Przepłukano 70% etanolem. Osad rozpuszczono w 50  $\mu\text{l}$  buforu TE.

6. Wg Sharmy i in. [2002] z modyfikacjami – zmiana skali izolacji z makro na mikro.

Dodano 600  $\mu\text{l}$  roztworu do homogenizacji (5 M NaCl; 2% sarkozyl). Zamieszano i zwirowano (15 min/9000 rpm). Przeniesiono supernatant do nowych próbek. Dodano 1 V mieszaniny chloroformu z alkoholem izoamylowym (24 : 1). Zwirowano (15 min/6000 rpm). Przeniesiono górną fazę do nowych próbek. Dodano 2 V buforu ekstrakcyjnego (100 mM Tris – HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 2% CTAB). Inkubowano (35 min/ $60^{\circ}\text{C}$ ). Dodano 1 V mieszaniny chloroformu z alkoholem izoamylowym (24 : 1). Zwirowano (15 min/6000 rpm). Przeniesiono górną warstwę do nowych próbek. Dodano  $\frac{1}{30}$  V 3 M octanu sodu. Dodano 0.6 V izopropanolu. Zmieszano i zwirowano (10 min/10 000 rpm). Osad przepłukano 70% etanolem i rozpuszczono w 500  $\mu\text{l}$  buforu TE. Dodano 5  $\mu\text{l}$  RNazy A (1 mg/ml) i inkubowano (1h/ $37^{\circ}\text{C}$ ). Dodano 1 V mieszaniny chloroformu z alkoholem izoamylowym (24 : 1). Zwirowano (10 min/14 000 rpm). Przeniesiono górną warstwę do nowej próbówki. Dodano 2 V zimnego absolutnego etanolu. Zwirowano (10 min/10 000 rpm). Osad przepłukano 70% etanolem. Rozpuszczono w 50  $\mu\text{l}$  buforu TE.

## Ocena preparatów DNA

Stężenie i czystość wyizolowanego DNA oznaczono przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Pomiar prowadzono na próbkach DNA o objętości 1  $\mu$ l. Stężenia określono, korzystając z założenia, że absorbancja ma wartość 1 dla dsDNA o stężeniu 50  $\mu$ g/ml. Czystość DNA określano na podstawie wartości współczynnika  $A_{260}/A_{280}$  (stosunek absorbancji przy długościach fali 260 nm i 280 nm) oraz współczynnika  $A_{260}/A_{230}$  (stosunek absorbancji przy długościach fali 260 nm i 230 nm). Interpretacja współczynnika  $A_{260}/A_{280}$  pozwala na określenie stopnia zanieczyszczenia próbki białkiem. Wartość współczynnika  $A_{260}/A_{280}$  w granicach 1,8–2,0 oznacza brak zanieczyszczenia próbki białkiem. Wartość poniżej tego zakresu wskazuje na obecność zanieczyszczeń białkowych w próbce. Interpretacja współczynnika  $A_{260}/A_{230}$  pozwala na określenie zanieczyszczenia próbek substancjami absorbującymi promieniowanie o długości fali 230 nm – głównie polisacharydami oraz odczynnikami wykorzystywanymi do izolacji DNA, takimi jak EDTA oraz etanol. Wartość współczynnika  $A_{260}/A_{230}$  dla czystych preparatów DNA powinna zawierać się w zakresie 1,8–2,0. Mniejsza wartość współczynnika wskazuje na zanieczyszczenie próbki związkami wykazującymi absorbancję przy długości fali 230 nm. Wartość współczynnika  $A_{260}/A_{230}$  większa niż 2,0 wskazuje natomiast na obecność w próbce innych komponentów komórkowych [Tibbits i in. 2006, Gryzińska i in. 2013, Nowakowska i Pasternak 2014].

## WYNIKI

Testowano 6 metod izolacji DNA z igieł i drewna modrzewia europejskiego (*L. decidua* Mill). Badania przeprowadzono na 6 próbkach igieł zebranych na początku sezonu wegetacyjnego, 6 próbkach igieł pochodzących z końca sezonu wegetacyjnego, 6 próbkach bielu i 6 próbkach twardzieli modrzewia. Średnie wyniki z analizy spektrofotometrycznej uzyskane dla badanych powtórzeń biologicznych, obrazujące stężenie i czystość preparatów DNA przedstawiono w tabeli 1.

Pośród wszystkich testowanych metod izolacji DNA najlepszą wydajność w przypadku igieł z obu terminów zbioru uzyskano z wykorzystaniem metod według Novaesa i in. [2009] oraz Porebski i in. [1997]. Z igieł zebranych w kwietniu, stosując metodę Novaesa i in. [2009], wyizolowano średnio 90,83  $\mu$ g DNA ze 100 mg tkanki. Średnia ilość DNA wyizolowanego metodą Porebskiego i in. [1997] była trzykrotnie mniejsza. Wyizolowane tymi metodami preparaty DNA były pozbawione zanieczyszczeń białkowych (wartość współczynnika  $A_{260}/A_{280}$  w zakresie 1,8–2,0), jednak zawierały inne komponenty komórkowe (wartość współczynnika  $A_{260}/A_{230}$  przekraczała 2,0).

Metody według Keb-Llanesa i in. [2002] oraz Deshmukha i in. [2007] pozwoliły na uzyskanie z igieł czystych preparatów DNA, o wartościach obu współczynników absorbancji mieszczących się w zakresie 1,8–2,0 lub bliskich tym wartościom. Wydajność metody opracowanej przez Keb-Llanesa i in. [2002] była średnio czterokrotnie wyższa niż metody opracowanej przez Deshmukha i in. [2007] (tab. 1).

Przy izolowaniu DNA z drewna bielastego najlepszą wydajność uzyskano, stosując protokół według Novaesa i in. [2009]. DNA uzyskane tą metodą wolne było od zanieczyszczeń białkowych (wartość współczynnika  $A_{260}/A_{280}$  oscylowała w okolicy 1,8), jednak

preparaty DNA były zanieczyszczone związkami absorbującymi promieniowanie o długości fali 230 nm (np. polisacharydami, etanolem, EDTA), o czym świadczy wartość współczynnika  $A_{260/230}$ , wynosząca średnio 1,45.

W porównaniu z metodą według Novaesa i in. [2009] protokół Porebski i in. [1997] pozwolił uzyskać dwukrotnie mniejszą ilość DNA z drewna bielastego, jednak preparaty te charakteryzowały się wysoką czystością (wartość obu współczynników absorbancji na poziomie 1,8).

Tabela 1. Wyniki analiz spektrofotometrycznych uzyskanych preparatów DNA (średnie z 6 powtórzeń biologicznych). Ilość DNA podano w  $\mu\text{g}$  na 100 mg tkanki  
Table 1. Results of spectrophotometric analysis of DNA samples (mean of 6 biological replicates). DNA quantity is given in  $\mu\text{g}$  of DNA per 100 mg of tissue

Metoda izolacji Extraction method		Novaes i in. 2009	Porebski i in. 1997	Keb Llanes i in. 2002	Deshmukh i in. 2007	Ziegenhagen i in. 1993	Sharma i in. 2002
Igły zebrane w kwietniu Needles collected in April	ilość DNA DNA quantity	90,83	31,57	20,29	4,45	–	–
	$A_{260/280}$	2,02	1,96	1,84	1,84	–	–
	$A_{260/230}$	2,28	2,25	1,93	2,13	–	–
Igły zebrane we wrześniu Needles collected in September	ilość DNA DNA quantity	35,74	20,88	17,19	3,92	–	–
	$A_{260/280}$	1,98	1,87	1,91	1,82	–	–
	$A_{260/230}$	2,25	2,28	1,90	1,94	–	–
Biel Whitewood	ilość DNA DNA quantity	8,37	3,87	4,53	1,14	–	–
	$A_{260/280}$	1,78	1,80	1,72	1,72	–	–
	$A_{260/230}$	1,45	1,80	1,28	2,11	–	–
Twardziel Heartwood	ilość DNA DNA quantity	1,54	2,52	–	–	–	–
	$A_{260/280}$	0,77	0,99	–	–	–	–
	$A_{260/230}$	0,09	0,19	–	–	–	–

Metoda według Keb-Llanesa i in. [2002] pozwoliła uzyskać ze 100 mg drewna bielastego średnio 4,53  $\mu\text{g}$  DNA, przewyższając pod względem wydajności metodę Porebski i in. (1997). Jednak preparaty otrzymane tą metodą zanieczyszczone były związkami absorbującymi przy długości fali 230 nm (np. EDTA, etanolem, polisacharydami), o czym świadczy wartość współczynnika  $A_{260/230}$ , wynosząca średnio 1,28. Niską wydajność izolacji dla bielu uzyskano, stosując metodę Deshmukha i in. [2002] – średnio 1,14  $\mu\text{g}$  DNA ze 100 mg tkanki. Preparaty te jednak były stosunkowo dobrze oczyszczone, na co wskazuje wartość obu współczynników absorpcji bliska zakresowi 1,8–2,0.

Na izolację niewielkiej ilości DNA z drewna twardego pozwoliły jedynie metody według Porebski i in. [1997] oraz Novaesa i in. [2009]. Przy zastosowaniu tych metod uzyskano odpowiednio 2,52  $\mu\text{g}$  i 1,54  $\mu\text{g}$  DNA ze 100 mg twardego. W przypadku obu tych metod wartości współczynników absorpcji były bardzo małe (średnie wartości w zakresie 0,09–0,99), co świadczy o dużym stopniu zanieczyszczenia preparatów DNA białkami oraz substancjami pochłaniającymi promieniowanie o długości fali 230 nm.

Dwie spośród testowanych metod, protokoły według Sharmy i in. (2002) oraz Ziegenhagena i in. (1993), nie pozwoliły na wyizolowanie DNA z żadnej z badanych tkanek.

#### DYSKUSJA

W zależności od terminu zbioru igieł protokoły izolacyjne mogą pozwalać na uzyskanie preparatów DNA o różnym stężeniu i czystości. Najlepsze wyniki izolacji DNA z drzew można uzyskać dla igieł młodych. Ekstrakty DNA z igieł zebranych na początku okresu wegetacyjnego zawierają najmniej niepożądanych substancji, które mogą być inhibitorami reakcji PCR. Termin zbioru igieł przekłada się bezpośrednio na wydajność izolacji DNA – ilość wyizolowanego DNA ze 100 mg tkanki igieł zebranych na początku sezonu wegetacyjnego jest większa niż igieł zebranych we wrześniu. Spośród testowanych metod najlepszą wydajność w przypadku igieł uzyskano metodą według Novaesa i in. [2009], otrzymując preparaty o bardzo wysokim stężeniu całościowego DNA. Jednocześnie ta metoda bardzo wyraźnie pokazuje różnice w koncentracji DNA w preparatach uzyskanych z igieł o różnych terminach zbioru – ilość DNA wyizolowanego z igieł młodych jest 3 razy większa niż z igieł zebranych pod koniec okresu wegetacyjnego.

Na izolację dobrze oczyszczonego DNA z drewna bielastego pozwalają metody według Porebski i in. [1997] oraz Deshmukha i in. [2007].) Protokół wg Porebski i in. [1997] w porównaniu z metodą Deshmukha i in. [2007] jest bardziej czasochłonny (czas trwania izolacji wynosi odpowiednio 3 dni oraz 1 dzień), pozwala jednak na izolację średnio trzykrotnie większej ilości DNA z bielu. Niska w porównaniu z innymi metodami wydajność protokołu według Deshmukha i in. [2007] może być spowodowana kilkukrotnym przemywaniem roztartej tkanki buforem płuczającym. Ten etap prowadzi do znacznych strat w koncentracji DNA, jednak pozwala na bardzo dobre usunięcie lepkich zanieczyszczeń, dzięki czemu wyizolowane DNA ma współczynnik  $A_{260/230}$ , bliski wartościom z zakresu 1,8–2,0 zarówno dla igieł jak i dla drewna bielastego.



Twardziel jest tkanką, w której ściany zaimpregnowane są substancjami twardzielowymi, tj. żywicami, gumami i garbnikami. Ponadto zawiera alkaloidy oraz barwniki kwercetynowe – taksyfolinę i aromadendrynę. Zbudowana jest z komórek martwych, niepełniących funkcji przewodzących [Krzysik 1974, Surmiński 1986, Tomanek 1997]. Niewielkie ilości bardzo silnie zanieczyszczonego DNA udało się wyizolować z twardej tkanki za pomocą metod według Novaesa i in. [2009] oraz Porebski i in. [1997]. Ta tkanka nie jest odpowiednia do izolacji DNA testowanymi metodami.

Testowane metody izolacji różniły się między sobą pod względem użytych odczynników, zastosowanych warunków i etapów izolacji, dając preparaty DNA o różnym stężeniu i czystości. Wszystkie protokoły rozpoczynają się etapem rozcierania tkanki w obecności ciekłego azotu. W większości testowanych metod roztarta tkanka poddawana jest następnie inkubacji w buforze ekstrakcyjnym, w podwyższonej temperaturze (od 60°C do 70°C), podczas której dochodzi do degradacji błon komórkowych i uwolnienia DNA do roztworu. Wydłużenie czasu inkubacji roztartej tkanki z buforem ekstrakcyjnym w podwyższonej temperaturze prowadzi do zwiększenia wydajności izolacji (metody według Novaesa i in. [2009] oraz Porebski i in. [1997]).

W przypadku metody Sharmy i in. [2002] roztarta tkanka początkowo zawieszana jest w roztworze do homogenizacji, który zawiera 2% sarkozyłu, jednak nie podlega inkubacji w podwyższonej temperaturze. Inkubacja w temperaturze 60°C z buforem zawierającym CTAB następuje dopiero po odwirowaniu homogenatu, usunięciu szczątek roztartej tkanki i ekstrakcji mieszaniną chloroformu z alkoholem izoamylovym, przez co nie spełnia swojej roli. Taka kolejność etapów w protokole mogła być jednym z powodów braku uzyskania DNA w preparatach izolowanych tą metodą.

Etap ekstrakcji przy użyciu mieszaniny chloroformu z alkoholem izoamylovym (24 : 1) oraz fenolu z chloroformem i alkoholem izoamylovym (25 : 24 : 1) pozwala na usunięcie zanieczyszczeń białkowych z preparatów. Zastosowanie kilkukrotnej ekstrakcji prowadzi do zwiększenia wartości współczynnika  $A_{260/280}$ , jednocześnie obserwuje się jednak obniżenie wydajności izolacji (Somma 2006). Zastosowanie kilkukrotnej ekstrakcji (odpowiednio trzy- i czterokrotnej) za pomocą wyżej wymienionych mieszanin mogło przyczynić się do niepowodzenia w wyizolowaniu DNA z badanych tkanek modrzewia metodami według Sharmy i in. [2002] oraz Ziegenhagena i in. [1993]. Kolejnym czynnikiem wyjaśniającym niepowodzenie zastosowania tych metod mógł być brak użycia  $\beta$ -merkaptoetanolu, który hamuje aktywność enzymów nukleolitycznych.

#### WNIOSKI

1. Spośród testowanych metod najlepszą metodą izolacji DNA z igieł modrzewia jest metoda według Novaesa i in. [2009].
2. Spośród testowanych metod najlepszą metodą izolacji DNA z drewna bielastego jest metoda opracowana przez Porebski i in. [1997].
3. Twardziel jest tkanką nieodpowiednią do izolacji DNA testowanymi metodami.

## PIŚMIENNICTWO

- Chałupka W., Barzdajn W., Blonkowski S., Burczyk J., Wojciech F., Grądzki T., Gryzlo Z., Kacprzak P., Kowalczyk J., Kozioł C., Matras J., Pytko T., Rzońca Z., Sabor J., Szelaż Z., Tarsiuk S., 2011. Program zachowania leśnych zasobów genowych i hodowli selekcyjnej drzew w Polsce na lata 2011–2035. CILP, Warszawa, 24–70.
- Deshmukh V. P., Thakare P. V., Chaudhari U. S., Gawande P. A., 2007. A simple method for isolation of genomic DNA from fresh and dry leaves of *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wight and Arnot. *Electron. J. Biotechn.* 10(3), 468–472.
- Gryzińska M., Strachecka A., Borsuk G., 2013. Porównanie parametrów DNA określanych metodą spektrometrii UV-Vis przy 2 mm i 10 mm drodze przechodzenia wiązki światła przez kuetę. *ABiD* 18, 55–59.
- Jagielska A., 2008. Zastosowanie markerów genetycznych w identyfikacji gatunkowej modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.) i japońskiego (*Larix kaempferi* Sorg.) oraz ich mieszańców. *Leś. Pr. Bad.* 69(1), 21–25.
- Keb-Llanes M., González G., Chi-Manzanero B., Infante D., 2002. A rapid and simple method for small-scale DNA extraction in *Agavaceae* and other tropical plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20(3), 299–300.
- Krzysik F., 1974. *Nauka o drewnie*. PWN, Warszawa, 41–94.
- Novaes R. M. L., Rodrigues J. G., Lovato M. B., 2009. An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. *Genet. Mol. Res.* 8(1), 86–96.
- Nowakowska J. A., Aniśko A., Bieniek J., Bodył M., Kantorowicz W., Klisz M., Kowalczyk J., Michalska Przyborowski J., Przybylski P., 2010. Metody identyfikacji drewna na podstawie analizy DNA dla potrzeb procesowych Straży Leśnej. Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych, Sękocin Stary, 4–7.
- Nowakowska J.A., Pasternak T., 2014. Zastosowanie analiz DNA drewna w postępowaniu karnym. CILP. Publ. ORWLP w Bedoniu, 49–116.
- Ostrowska E., Muralitharan M., Chandler S., Volker P., Hetherington S., Dunshea F., 1998. Optimizing conditions for DNA isolation from *Pinus radiata*. *In Vitro Cell. Dev.-Pl.* 34(2), 108–111.
- Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R., 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15(1), 8–15.
- Sharma A.D., Gill P.K., Singh P., 2002. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20(4), 415a–415f.
- Słomski R., Jura J., Kalak R., Szlata M., Wolko Ł., Wolko B., Wielgus K., Kowalska K., 2004. Izolacja DNA. W: Przykłady analiz DNA. R. Słomski (red.). AR w Poznaniu, Poznań, 21–31.
- Somma M., 2006. Extraction and purification of DNA. W: The Analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. M. Querci, M. Jermini, G.V.D. Eede (red.). European Commission Joint Research Centre, Luxemburg, 1–18.
- Surmiński J., 1986. Właściwości techniczne i możliwości użytkowania drewna modrzewia. W: *Modrzewie Larix* Mill. S. Białobok (red.). PWN, Warszawa, 563–567.
- Tibbits J. F., McManus L. J., Spokevicius A. V., Bossinger G., 2006. A rapid method for tissue collection and high-throughput isolation of genomic DNA from mature trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 24(1), 81–91.
- Tomanek J., 1997. *Botanika leśna*. PWRiL, Warszawa, 31–49.

- Warner S.A.J., 1996. Genomic DNA isolation and lambda library construction. W: Plant gene isolation: principles and practice. G. Foster, D. Twell (red.). John Wiley & Sons Ltd, 56–62.
- Wilkie S., 1997. Isolation of total genomic DNA. W: Plant. A Laboratory Manual, M.S. Clark (red.). Springer, Berlin, 3–14.
- Ziegenhagen B., Guillemaut P., Scholz F., 1993. A procedure for mini-preparations of genomic DNA from needles of silver fir (*Abies alba* Mill.). Plant Mol. Biol. Rep. 11(2), 117–121.

**Summary.** As DNA extraction is often the first step in molecular analyses of forest trees, the aim of this study was to assess the efficiency of six DNA isolation protocols. The research material consisted of European larch (*Larix decidua* Mill.) needles (collected in April and September) and wood (whitewood and heartwood separately). Analyses of DNA quantity and purity were conducted spectrophotometrically. Results of the analysis allowed to identify the best (out of all methods tested) DNA extraction protocols for larch needles and whitewood. DNA isolation methods used in this study were proved to be unsuitable for good quality DNA extraction from heartwood.

**Key words:** *Larix decidua*, DNA extraction, wood, needles

Otrzymano/ Received: 26.10.2017  
Zaakceptowano/ Accepted: 1.07.2018