

Модифікована методика виділення ДНК з гербарних зразків

Андрій Сергійович Тарєєв
Андрій Іванович Гірін
Наталія Іванівна Карпенко
Оксана Василівна Тищенко
Ігор Юрійович Костіков

Тарєєв А.С., Гірін А.І., Карпенко Н.І., Тищенко О.В., Костіков І.Ю., 2011: **Модифікована методика виділення ДНК з гербарних зразків.** *Чорноморськ. бот. ж.*, Т. 7, № 4: 309-317.

Запропоновано модифікацію методики виділення ДНК з гербарного матеріалу покритонасінних та голонасінних рослин на основі СТАБ-методу. Три варіанти методики апробовані на прикладі 29-ти зразків гербаріїв KW та KWU. Визначення оптимального варіанту проведено шляхом візуальної оцінки отримання ДНК-вмісної пелети, ампліконів очікуваної довжини двох нуклеотидних послідовностей (ядерна послідовність ITS та послідовність пластидного гену *rbcL*) та секвенуванням ампліконів з подальшим порівнянням результатів з іншими послідовностями, депонованими у GenBank. За результатами апробації визначено оптимальний варіант методики виділення ДНК з гербарного матеріалу для рослинних об'єктів різних таксономічних груп.

Ключові слова: гербарні зразки, виділення ДНК, модифікація методики

TARIEIEV A.S., GIRIN A.I., KARPENKO N.I., TYSHCHENKO O.V., KOSTIKOV I.YU., 2011: **Modified method of DNA extraction from herbarium specimens.** *Chornomors'k. bot. z.*, Vol. 7, № 4: 309-317.

The DNA isolation CTAB-method modified for seed plants herbarium material is proposed. Three modifications were tested on 29 samples from KW and KWU herbaria. Visual evaluation of optimal method is done for DNA containing pellet, PCR products (nuclear ITS and plastid *rbcL* gene sequence), amplicon sequencing with further comparing results obtained using those deposited in GenBank. The optimal variant of DNA extraction from herbarium material for different taxonomical groups of plants is proposed.

Key words: herbarium specimens, DNA extraction, method modification

ТАРЕЕВ А.С., ГИРИН А.И., КАРПЕНКО Н.И., ТИЩЕНКО О.В., КОСТИКОВ И.Ю., 2011: **Модифицированная методика выделения ДНК из гербарных образцов.** *Черноморск. бот. ж.*, Т. 7, № 4: 309-317.

Предложено модификацию методики выделения ДНК из гербарного материала покрытосеменных и голосеменных растений на основе СТАБ-методу. Три варианта методики апробированы на примере 29-и образцов гербариев KW та KWU. Определение оптимального варианта проведено путем визуальной оценки получения ДНК-содержащей пелеты, ампликонов ожидаемой длины двух нуклеотидных последовательностей (ядерная последовательность ITS и последовательность пластидного гена (*rbcL*) и секвенированием ампликонов с дальнейшим сравнением результатов с другими последовательностями, депонированными в GenBank. По результатам апробации определено оптимальный вариант методики выделения ДНК с гербарного материала для растительных объектов разных таксономических групп.

Ключевые слова: гербарные образцы, выделение ДНК, модификация методики

Наразі розроблено досить багато методик виділення ДНК з великої кількості об'єктів, які можуть знаходитися у різних станах, в тому числі – у гербаризованому. При цьому для гербарних зразків різних таксономічних груп зазвичай використовуються дещо відмінні методи виділення тотальної ДНК [ROGERS, BENDICH, 1985; DOYLE, DOYLE, 1990; SAVOLAINEN et al., 1995; MOLECULAR ... , 1996; SOLTIS, SOLTIS, 2000; КУЗНЕЦОВА, ЩЕРБАКОВА, ГРАЧЕВ, 2004; GOES-NETO, LOGUERCIO-LEITE, GUERRERO, 2005; СOTA-SANCHEZ, REMARCHUK, UBAYASENA, 2006; LISTER et al., 2008]. В той же час універсалізація методики виділення ДНК з гербарного матеріалу може спростити як процедуру підготовки сучасних систематиків-ботаніків, так і роботу у галузі молекулярної таксономії рослин, що є особливо актуальним для України. Розширення спектру робіт, пов'язаних із застосуванням ДНК-технологій на основі гербарного матеріалу дають змогу залучати до досліджень рослини, які важко зібрати та зберегти у живому стані, а також рідкісні, зникаючі та зниклі види рослин.

Україна має давні флористичні традиції, і гербарні зразки видів її флори різних періодів збору, у тому числі – раритетні таксони та зразки номенклатурних типів, добре представлені у вітчизняних гербарних установах. Проте, роботи молекулярно-філогенетичного спрямування з гербарними зразками вищих рослин на території України не виконувались не лише на рівні конкретних молекулярно-філогенетичних аналізів, але навіть на рівні підбору та апробації методик виділення, ампліфікації та секвенування нуклеотидних послідовностей.

Тому метою нашої роботи був пошук якомога більш універсальної методики, яку можна застосовувати для роботи з гербарним матеріалом за стандартних умов його зберігання.

Матеріал та методи

Матеріалом стали 29 гербарних зразків (9 – із гербарію Київського національного університету імені Тараса Шевченка (KWU) та 20 – з Національного гербарію Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України (KW), що мали термін зберігання від 2-х до 85-и років. Об'єкти дослідження представлені 27 видами з 6 родин покритонасінних та голонасінних рослин, що включають критичні таксони. Таксономічний об'єм видів прийнятий за зведенням С. Л. Мосякіна та М.М. Федорончука [MOSYAKIN, FEDORONCHUK, 1999].

У проведеному дослідженні застосовувалися три варіанти методики екстракції тотальної ДНК (див. нижче). З метою пошуку оптимальної, дослідження проводили у три етапи. На першому етапі на прикладі 7-и гербарних зразків, що представляли види родів *Betula* L., *Centaurea* L. та *Crataegus* L., визначали варіант, при якому візуально спостерігалось утворення найбільшої кількості ДНК-вмісних пелет. Далі цей варіант апробували на розширеній вибірці гербарних зразків (22 додаткових гербарних зразки, що представляли види родів *Allium* L., *Astragalus* L., *Betula*, *Centaurea* L., *Crataegus* L. та *Juniperus* L.). На другому етапі частину зразків варіанту, по якому було отримано найбільшу кількість ДНК-вмісних пелет, перевіряли на якість екстракції шляхом ампліфікації двох маркерних послідовностей (ядерної та пластидної). Загалом цим способом було перевірено успішність екстракції ДНК із 13-и зразків. На третьому етапі на прикладі 6-и гербарних зразків, з яких було успішно отримано амплікони очікуваної довжини, якість екстракції перевіряли шляхом секвенування цих ампліконів з подальшим порівнянням отриманих послідовностей з тими, що депоновані у GenBank, за допомогою пошукової системи BLAST.

Для проведення екстракції ДНК з кожного зразка відбирали приблизно 0,5 см² листової пластинки. Відібраний матеріал заморожували у рідкому азоті і розтирали до стану світло-зеленої пудри.

Екстракцію проводили за СТАБ-методом у трьох варіантах, які відрізнялися концентрацією СТАБ (цетилтриметиламонію бромід) у буфері, температурою та часом інкубації розтертого матеріалу у екстрагуючому СТАБ-буфері, а також кількістю цього буферу на один зразок (табл. 1). Перший варіант відповідав методиці, раніше використаній для екстракції ДНК із 17-и гербарних зразків покритонасінних рослин [SAVOLAINEN et al., 1995], другий – методиці виділення ДНК з діатомових водоростей [КУЗНЕЦОВА, ЩЕРБАКОВА, ГРАЧЕВ, 2004], третій варіант представляв оригінальну модифікацію на основі комбінації двох попередніх варіантів. Перед екстракцією у кожному варіанті до нагрітого СТАБ-буферу додавали 0,2% 2β-меркаптоетанолу. Далі протягом часу, обраного для кожного варіанту (30 та 60 хв, залежно від варіанту), проводили інкубацію матеріалу у цьому розчині. Решта операцій для всіх варіантів методики не відрізнялися і наведені у протоколі екстракції (див. нижче).

Таблиця 1

Варіанти використаних методик екстракції тотальної ДНК

Table 1

Variants of total DNA extraction methods used

Параметр	Варіант модифікації методики екстракції ДНК		
	1	2	3
Концентрація СТАБ, %	2	3	3
Температура інкубації у СТАБ-буфері, С°	60	65	60
Час інкубування, хв	30	60	60
Кількість екстрагуючого буферу на 1 зразок, мкл	700	300	700

Умовні позначення: 1 – модифікація СТАБ-методу для виділення ДНК із гербарних зразків [SAVOLAINEN et al., 1995], 2 – методика виділення ДНК із діатомових водоростей [КУЗНЕЦОВА, ЩЕРБАКОВА, ГРАЧЕВ, 2004], 3 – оригінальна модифікація СТАБ-методу для виділення ДНК із гербарних зразків.

Первинну успішність виділення тотальної ДНК зі зразків оцінювали візуально за утворенням пелети на кінцевому етапі екстракції.

Оцінку якості екстракції за допомогою ПЛР проводили на основі ампліфікації 2-х маркерних послідовностей: по-перше, послідовності ITS кластеру ядерних генів рибосомальної РНК, по-друге, фрагменту пластидного гену *rbcL*. Для ампліфікації ITS були використані універсальні прямий (P1) та зворотній (P2) праймери [TAKAIWA, OONO, SUGIURA, 1985; WANG, LI, 1998], для яких довжина очікуваних ампліконів становила біля 300 п.н. Ампліфікацію *rbcL* проводили з прямим (*rbcLa_f*) та зворотнім (*rbcLa_r*) праймерами, рекомендованими для ДНК-штрих-кодування [KRESS, ERIKSON, 2007]; очікувана довжина ампліконів становила 620-650 п.н. Послідовності праймерів наведені у табл. 2.

Таблиця 2

Послідовності праймерів, використаних для ампліфікації та секвенування

Table 2

Nucleotide primer sequences used for amplification and sequencing

Назва праймера	Послідовність
P1	5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3'
P2	5'-GATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTG-3'
<i>rbcLa_f</i>	5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'
<i>rbcLa_r</i>	5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3'

Ампліфікацію проводили на термоциклері Techne. При ампліфікації послідовності ITS здійснювали початкову денатурацію ДНК при 95°C протягом 5 хв. Надалі проводили 35 циклів за наступним режимом: денатурація – 30 с при 95°C, віджиг праймерів – 30 сек при 55°C, елонгація – 1,5 хв при 72°C. Фінальну елонгацію

здійснювали за температури 72°C протягом 5 хв. По закінченні процесу ампліфікації встановлювали температуру 4°C.

При ампліфікації *rbcL* початкову денатурацію здійснювали при 95°C протягом 4 хв. Надалі проводили 5 циклів за наступною схемою: денатурація при 94°C – 30 сек; віджиг праймерів при 55°C – 1 хв, елонгація ДНК при 72°C – 1 хв. Потім ампліфікацію проводили протягом ще 30-и циклів за такою ж схемою, але температура віджигу праймерів була знижена на 1°C. Фінальна елонгація відбувалась за температури 72°C протягом 10 хв. Термінальна температура ампліфікації становила 10°C.

Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 1% агарозному гелі при 100В упродовж 1 год. Візуалізацію проводили за допомогою бромистого етидію. Гель фотографували на транслюмінаторі Biometra з цифровою камерою Canon Power Shot A640.

Секвенування ампліфікованих послідовностей здійснювали з прямими та зворотніми праймерами, використаними для отримання ампліконів, на комерційній основі у компанії MacroGen Inc. (Південна Корея, www.macrogen.com).

Результати та обговорення

Візуальна оцінка наявності ДНК-вмісної пелети при застосуванні певного варіанту екстракції показала, що 3-й варіант забезпечує утворення візуально помітної пелети у 100% гербарних зразків. У другому варіанті пелета спостерігалась у 86% зразків. За першим варіантом пелету не вдалось отримати жодного разу. При розширенні вибірки за рахунок додаткових таксонів (загалом 29 таксонів) за третім варіантом в усіх випадках для кожного зразка були успішно отримані пелети (табл. 3), незалежно від терміну зберігання зразків у гербарних установах (від 2-х до 85-и років). Таким чином, варіант 3 показав найкращі результати.

Якість виділення ДНК за варіантом 3 була перевірена шляхом ампліфікації маркерних послідовностей ITS та *rbcL* на прикладі 13-и гербарних зразків, з яких 10 зразків тестували на успішну ампліфікацію обох послідовностей (як ITS, так і *rbcL*), 3 зразки – лише на послідовність *rbcL*. За послідовністю ITS амплікони очікуваної довжини (біля 300 п.н.) були отримані для 9-и гербарних зразків – *Betula klokovii* Zaverucha (2 зразки), *Betula polessica* Ivczenko, *B. pubescens* Ehrh var. *pubescens*, *B. obscura* A. Kotula, *Crataegus alutacea* Klokov, *C. calycina* Peterm., *C. laevigata* (Poir.) DC та *C. ucrainica* Rojark., тобто для 90% зразків (табл. 3; рис.1).

За послідовністю *rbcL* амплікони очікуваної довжини (620-650 п.н.) були успішно отримані для 31% гербарних зразків (*Betula kotulae* Zaverucha, *Astragalus onobrychis* L. (2 зразки) та *A. borysthenticus* Klokov.). Максимальний вік гербарних зразків, з яких вдалося отримати амплікони маркерних послідовностей очікуваної довжини, становив 56 років. Зі старіших зразків (*Betula borysthentica*, 85 років), незважаючи на успішне отримання пелети, провести ампліфікацію маркерних послідовностей не вдалося. На нашу думку, це може бути пов'язано із застосуванням до середини ХХ ст. термічної обробки гербарних зразків як засобу боротьби з комахами-шкідниками.

З метою оцінки придатності успішно ампліфікованих фрагментів для філогенетичного аналізу сім випадково обраних ампліконів, з яких чотири представляли *rbcL* (*Astragalus borysthenticus*, *A. onobrychis* (2 зразки), *B. kotulae*), а три – ITS (*B. klokovii*, *B. kotulae*, *B. polessica*), були секвеновані як з прямими, так і зі зворотніми праймерами.

Таблиця 3

Результати за варіантами дослідів

Table 3

Results of the experiment variants

Вид	Акронім гербарію та № зразка	Вік зразку, років	Варіант методики екстракції ДНК ¹	Утворення пелети ²	Амплікони ³	
					<i>rbcL</i>	ITS
<i>Betula klokovii</i> Zaverucha	KWU, №031471	34	1	-		
			2	+/-		
			3	+	-	+
<i>Betula obscura</i> A. Kotula	KWU, №031473	26	1	-		
			2	+/-		
			3	+	-	+
<i>Betula pubescens</i> Ehrh	KWU, №031491	49	1	-		
			2	+/-		
			3	+	-	+
<i>Crataegus alutacea</i> Klokov	KW, №080791	8	1	-		
			2	+/-		
			3	+	+	
<i>Crataegus calycina</i> Peterm.	KW, б/н	27	1	-		
			2	+/-		
			3	+	+	
<i>Crataegus laevigata</i> (Poir.)DC	KW, №074818	6	1	-		
			2	-		
			3	+	+	
<i>Crataegus ucrainica</i> Pojark.	KW, №073897	6	1	-		
			2	+/-		
			3	+	+	
<i>Astragalus borysthenticus</i> Klok.	KWU, №4461	12	3	+	+	
<i>Astragalus onobrychis</i> L.	KWU, №031491	2	3	+	+	
<i>Astragalus onobrychis</i> L.	KWU, №004284	55	3	+	+	
<i>Betula borysthentica</i> Klokov	KW, №006414	85	3	+	-	-
<i>Betula klokovii</i> Zaverucha	KW, №006472	55	3	+	-	+
<i>Betula kotulae</i> Zaverucha	KW, №006426	52	3	+	+	+
<i>Betula polessica</i> Ivchenko	KW, №006430	34	3	+	-	+
<i>Allium rotundum</i> L.	KWU, №000750	58	3	+		
<i>Astragalus australis</i> (L.) Lam.	KW, №006709	12	3	+		
<i>Astragalus borysthenticus</i> Klokov	KW, №085822	3	3	+		
<i>Astragalus dealbatus</i> Pall.	KW, б/н	35	3	+		
<i>Astragalus cretophilus</i> Klokov	KW, №028416	8	3	+		
<i>Astragalus glaucus</i> M.Bieb.	KW, б/н	56	3	+		
<i>Astragalus krajinae</i> Domin	KW, б/н	41	3	+		
<i>Astragalus odessanus</i> Besser	KW, б/н	58	3	+		
<i>Astragalus onobrychis</i> L.	KW, №001968	25	3	+		
<i>Astragalus setosulus</i> Gontsch	KW, б/н	41	3	+		
<i>Astragalus similis</i> Boiss	KW, б/н	31	3	+		
<i>Astragalus tanaiticus</i> C.Koch	KW, б/н	82	3	+		
<i>Astragalus tarchankuticus</i> Boriss.	KW, б/н	38	3	+		
<i>Centaurea borysthentica</i> Grun.	KWU, №49334	65	3	+		
<i>Juniperus foetidissima</i> Willd.	KWU, №56273	32	3	+		

Умовні позначення: ¹ наведений у відповідності до табл.1; ² утворення пелети: + – добре сформована, +/- – нечітка, - - відсутня; ³ амплікони: + – успішно отримані, - - відсутні.

Аналіз отриманих хроматограм показав високу якість та чистоту сигналу для *Astragalus borysthenticus*, *A. onobrychis* (2 зразки) для фрагменту гена *rbcL*, та *B. klokovii*, *B. kotulae*, *B. polessica* для ITS (рис. 2).

Пошук схожих послідовностей серед депонованих у базі даних NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) за допомогою BLAST, показав, що найбільшу схожість з отриманими послідовностями демонструють гомологічні послідовності близько споріднених таксонів. Наприклад, послідовність ITS у *Betula klokovii* була на 100% схожа з ITS *B. populifolia* (AJ783644.1) та на 99% – з гомологічною послідовністю *B. alnoides* (AJ783641.1). У *B. kotulae* послідовність ITS була на 99% схожа з ITS двох видів берез - *B. populifolia* (AJ783644.1) та *B. alnoides* (AJ783641.1). Послідовність ITS у *B. polessica* була на 89% схожа з ITS шести видів роду *Betula* – *B. platyphylla* (FJ011778.1), *B. pendula* (JN247411.1), *B. humilis* (AY761114.1), *B. pubescens* (AY761130.1), *B. populifolia* (AJ783644.1) та *B. pumila* (AY761131.1). Секвенована послідовність фрагменту пластидного гену *rbcL* у *Astragalus borysthenticus* була найбільш схожою з *rbcL* *A. uliginosus* (HM142225.1) – 99%, і у дещо меншому ступені (98%) – з трьома іншими видами (*A. mongholicus* (HM142223.1), *A. membranaceus* (HM142221.1) та *A. borealimongolicus* (HM142220.1)). За цим же геном *A. onobrychis* був найбільш схожим з *A. uliginosus* (HM142225.1) – 99%; схожість цього виду з іншими астрагалами (*A. mongholicus* (HM142223.1), *A. membranaceus* (HM142221.1) та *A. borealimongolicus* (HM142220.1)) була помітно меншою (95%).

Зауважимо, що *Betula klokovii*, *B. kotulae*, *B. polessica* та *Astragalus borysthenticus*, які у вітчизняній літературі вважаються ендемічними для флори України, до молекулярно-філогенетичних досліджень раніше не залучались.

Максимальний вік зразків, які у наших дослідженнях були успішно секвеновані, становив 55 років (*Betula klokovii* та *Astragalus onobrychis*).

Таким чином, результати оцінки наведених вище методик ізоляції ДНК з гербарного матеріалу дозволяють рекомендувати варіант №3 як найкращий. Протокол виділення ДНК за даною модифікацією наступний:

1. Пробу гербарного зразка листової пластинки (площа біля 0,5 см²) заморозити у рідкому азоті та розтерти до стану світло-зеленої пудри;
2. Приготувати 3% СТАБ-буфер (3% СТАБ, 1,4 М NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0)), нагріти його до 60°C та додати 0,2% 2β-меркаптоетанолу;
3. Додати до проби 700 мкл 3% СТАБ-буферу;
4. Інкубувати пробу протягом однієї години при 60°C;
5. Додати до проби 700 мкл суміші хлороформу та ізоамілового спирту (об'ємне співвідношення 24:1);
6. Центрифугувати суміш 10 хв при 18 kg;
7. Відібрати верхню прозору фазу у чисту пробірку;
8. Додати ізопропанол в об'ємі 2/3 від об'єму відібраного супернатанту;
9. Інкубувати суміш при -20°C протягом 2 годин або більше;
10. Центрифугувати 20 хв при 18 kg;
11. Супернатант обережно видалити, а до пелети, що залишилась на дні, додати 2 об'єми 80% етанолу;
12. Інкубувати 10 хв за кімнатної температури;
13. Центрифугувати 2 хв при 18 kg; супернатант обережно видалити, пелету підсушити на повітрі;
14. Отриману ДНК-вмісну пелету розчинити у TE(Tris-EDTA)-буфері (pH 8.0).

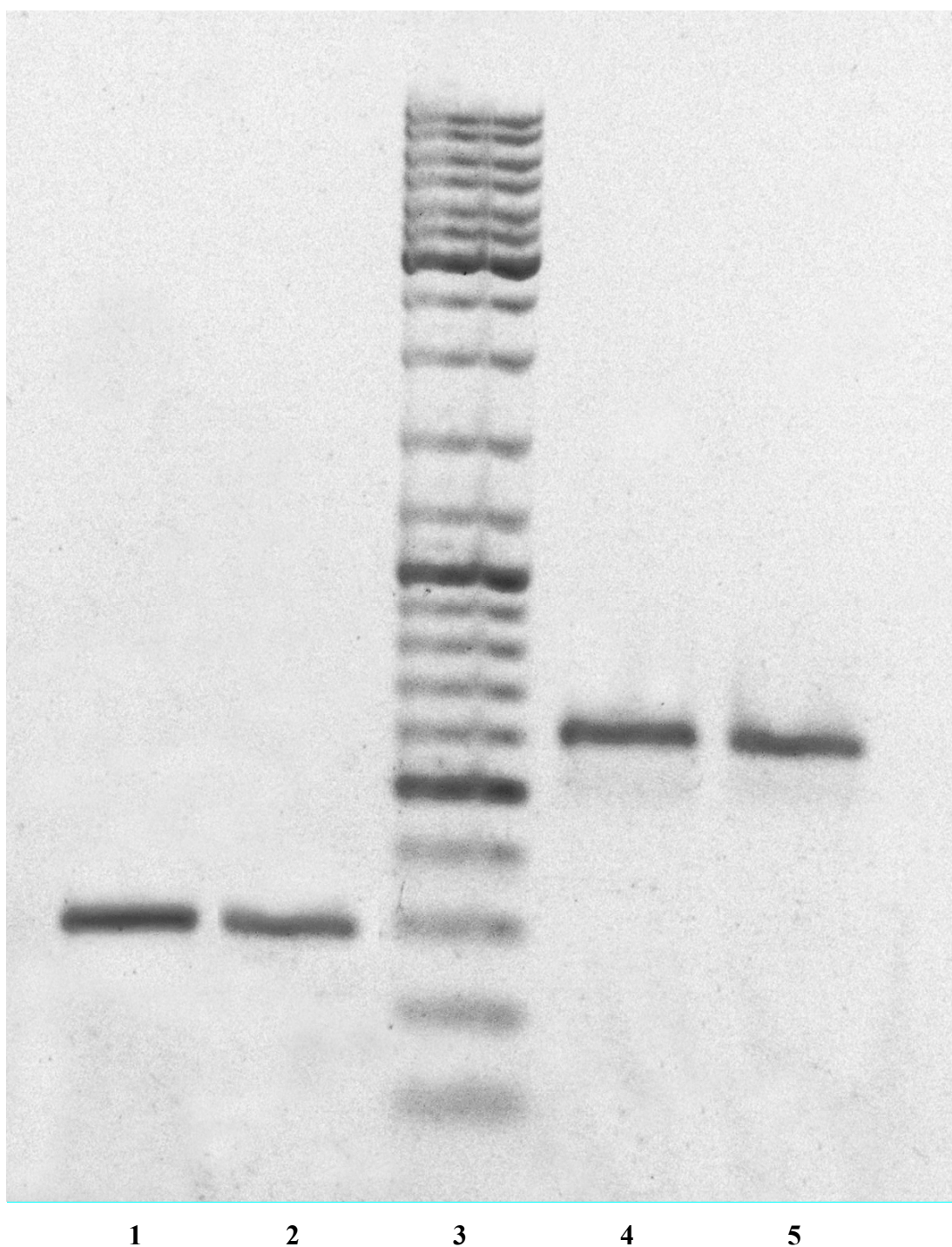


Рис. 1. Приклад успішно ампліфікованих фрагментів нуклеотидних послідовностей: 1, 2 – послідовність ITS (1 – *Betula klokovii* (біля 300 п.н.), 2 – *B. kotulae* (біля 300 п.н.)), 3 – DNA LadderMix (100-10000 п.н., Fermentas), 4, 5 – фрагмент пластидного гену *rbcL* (4 – *Astragalus borysthenicus*; (620-650 п.н.), 5 – *B. kotulae* (620-650 п.н.)).

Fig. 1. Example of successfully amplified nucleotide sequences fragments: 1, 2 – ITS sequence (1 – *Betula klokovii* (ca. 300 bp.), 2 – *B. kotulae* (ca.300 bp.)), 3 – DNA LadderMix (100-10000 bp., Fermentas), 4, 5 – fragment of plastid gene *rbcL* (4 – *Astragalus borysthenicus* (620-650 bp.), 5 – *B. kotulae* (620-650 bp.)).

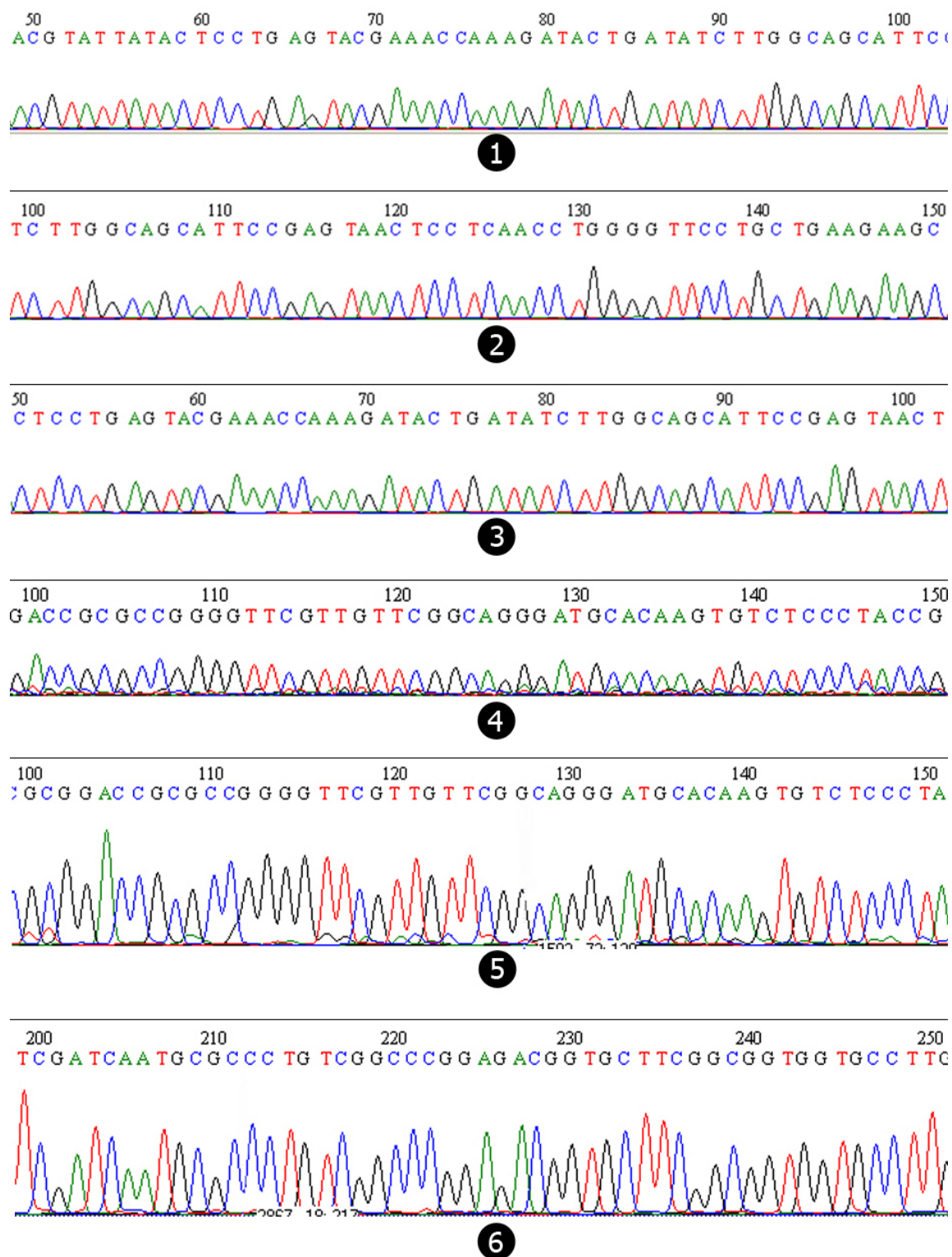


Рис. 2. Приклади фрагментів хроматограм успішно ампліфікованих маркерних послідовностей: 1-3 – пластидного гену *rbcL* (1 - *Astragalus borysthenticus*, 2, 3 – *A. onobrychis*), 4-6 – послідовності ITS (4 – *Betula klokovii*, 5 – *B. kotulae*, 6 – *B. polessica*).

Fig. 2. Examples of successfully amplified marker sequences chromatogram fragments: 1-3 – plastid gene *rbcL* (1 - *Astragalus borysthenticus rbcL*, 2, 3 – *A. onobrychis*), 4-6 – ITS sequence (4 – *Betula klokovii*, 5 – *B. kotulae*, 6 – *B. polessica*).

Висновок

Модифікований протокол екстракції (№3) дозволяє успішно виділяти ДНК з гербарних зразків голонасінних та покритонасінних рослин у випадках, коли такі зразки зберігаються згідно до методики, що протягом останнього півсторіччя застосовується у Національному гербарії України (KW) і прийнята в інших гербаріях (зокрема, у KWU).

Подяки

Автори щиро вдячні проф. А.В. Сиволобу (Київський національний університет імені Тараса Шевченка, кафедра загальної та молекулярної генетики) за критичні зауваження, поради та рекомендації при підготовці даної статті.

Список літератури:

- КУЗНЕЦОВА С.Ю., ЩЕРБАКОВА Т.А., ГРАЧЕВ М.А. Новый метод выделения ДНК из диатомовых водорослей, основанный на растворимости комплекса ЦТАБ-ДНК в этаноле // Тезисы международного симпозиума «Живые клетки диатомей», посвященного 100-летию со дня рождения А.П. Скабичевского. – 2004. – С. 56-57.
- COTA-SANCHEZ H.J., REMARCHUK K., UBAYASENA K. Ready-to-Use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue // Plant Molecular Biology Reporter. – 2006. – Vol. 24. – P. 161-167.
- DOYLE J. J., DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. – 1990. – Vol. 12. – P. 13-15.
- GOES-NETO A., LOGUERCI-LEITE C., GUERRERO R.T. DNA extraction from frozen field collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods // Biotemas. – 2005. – Vol. 18, N 2. – P. 19-32.
- KRESS W. J., ERICKSON D. L. A Two-locus global DNA barcode for land plants: the coding rbcL gene complements the non-coding trnH-psbA spacer region // PLoS ONE. – 2007. – Issue 6. – P. 1-10.
- LISTER D.L., BOWER M.A., HOWER CH.J., JONES M.K. Extraction and amplification of nuclear DNA from herbarium specimens of emmer wheat: a method for assessing DNA preservation by maximum amplicon length recovery // Taxon. – 2008. – Vol. 57, N 1. – P. 254-258
- MOLECULAR Systematics / edited by D. M. Hillis, C. Mortiz, B. K. Mable., 2-nd ed. – 1996. – 665 p.
- MOSYAKIN S.L., FEDORONCHUK M.M. Vascular plants of Ukraine. A nomenclatural checklist. – Kiev, 1999. – 345 p.
- ROGERS S.O., BENDICH A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium, and mummified plant tissues // Plant Molecular Biology. – 1985. – Vol. 5. – P. 69-76.
- SAVOLAINEN V., CUÉNOUD P., SPICHIGER R., MARTINEZ MARIA D.P., CRÉVECOEUR M., MANEN J.-F. The use of herbarium specimens in DNA phylogenetics: evaluation and improvement // Plant systematics and evolution. – 1995. – Vol. 197. – P. 87-98.
- SOLTIS E.D., SOLTIS P.S. Contributions of plant molecular systematics to studies of molecular evolution // Plant Molecular Biology. – 2000. – Vol. 42. – P. 45-75.
- TAKAIVA, F., OONO K., SUGIURA M. Nucleotide sequence of the 17–25s spacer region from rice rDNA // Plant Molecular Biology. – 1985. – Vol. 4. – P. 355-364.
- WANG, X.-Q., LI Z.-Y. The application of sequence analysis of rDNA fragment to the systematic study of the subfamily Cyrtandroideae (Gesneriaceae) // Acta Phytotaxonomica Sinica. – 1998. – Vol. 36. – P. 97-105.

Рекомендое до друку

О.Є. Ходосовцев

Отримано 29.12.2011 р.

Адреса авторів:

А.С. Тарєєв, А.І. Гірін, Н.І. Карпенко, О.В. Тищенко, І.Ю. Костіков

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Навчально-науковий центр "Інститут біології" кафедра ботаніки

вул. Володимирська, 64, Київ, 01601

Україна

andrey_tareev@univ.kiev.ua

andrey_tree@ukr.net

5635688@rambler.ru

oksana_t@ukr.net

kost@univ.kiev.ua

Author's address:

A.S. Tareev, A.I. Girin, N.I. Karpenko, O.V.

Tyshchenko, I.Yu. Kostikov

Taras Shevchenko National University of Kyiv

Educational and Scientific Centre "Institute of

Biology", Department of Botany

Volodymyrs'ka str., 64, Kyiv – 601, 01601

Ukraine

andrey_tareev@univ.kiev.ua

andrey_tree@ukr.net

5635688@rambler.ru

oksana_t@ukr.net

kost@univ.kiev.ua