UNIVERSAL JOURNAL OF MEDICAL AND NATURAL SCIENCES
ISSN 2992-8826
https://sr-journals.org/index.php/UJMANS

UDK:577.2.01

Prunus cerasifera.l, Prunus domestica.l va Prunus armeniaca.l o‘simliklar uchun takomillashtirilgan va samarali yuqori sifatli genom DNK ajratish

Salomov Yodgor Muxsin o‘g‘li
Guliston Davlat Universiteti, Agrobiotexnologiyalar va biokimyo ilmiy tadqiqot instituti tayanch doktoranti
salomovyodgor02@gmail.com
Sultonova Nigoraxon Muxammadkodirovna
Guliston Davlat Universiteti, Agrobiotexnologiyalar va biokimyo ilmiy tadqiqot instituti dotsenti
nigorakhonsultonova@gmail.com

Annotatsiya. To‘qima va hujayralardan yuqori sifatli DNK olishda, ayniqsa o‘simliklardan xomashyo sifatida foydalanilganda, ko‘plab muammolar mavjud. Prunus turkumidagi turlar barglaridan yuqori sifatli genom DNK ajratish uchun to‘rt xil DNK ajratish protokoli qo‘llanildi. P. cerasifera.l, P.domestica.l va P armeniaca.l Rosaceae oilasiga mansub murakkab, ko‘p qirrali va doimiy yashil mevali daraxtli o‘simliklar bo‘lib, ekologik, iqtisodiy va madaniy jihatdan muhim hisoblanadi. Ushbu turlar DNK ajratishga xalaqit beruvchi qimmatli antioksidantlar, masalan polifenollar, polisaxaridlar va ikkilamchi metabolitlarni hosil qiladi, bu esa ushbu turlarda molekulyar markerlarga asoslangan tadqiqotlarni qiyinlashtiradi. Ushbu tadqiqotning maqsadi tuzlar va fenollarga boy P. cerasifera.l, P.domestica.l va P armeniaca.l barglari uchun oddiy, tez, va yuqori samarali protokollarni sinab ko‘rish edi. Natijalar shuni ko‘rsatdiki, Kit usuli protokoli keyingi avlod sekvenslash tahliliga to‘sqinlik qiluvchi muammolarni bartaraf etishda juda samarali hisoblanadi.

Kalit so‘zlar: DNK konsentratsiyasi, CTAB, Prunus, 2 x Easy Taq PCR Super Mix, primerlar.

Abstract. Obtaining high-quality DNA from tissues and cells presents numerous challenges, especially when plant materials are used as the source. Four different DNA extraction protocols were employed to isolate high-quality genomic DNA from the leaves of *Prunus* species. *Prunus cerasifera* L., *Prunus domestica* L., and *Prunus armeniaca* L. are complex, versatile, evergreen fruit tree species belonging to the Rosaceae family and are considered ecologically, economically, and culturally important. These species produce valuable antioxidants, such as polyphenols, polysaccharides, and secondary metabolites, which interfere with DNA extraction and make molecular marker-based studies difficult. The objective of this study was to evaluate simple, rapid, and highly efficient protocols for DNA extraction from the salt- and phenolic-rich leaves of *P. cerasifera* L., *P. domestica* L., and *P. armeniaca* L. The results demonstrated that the Kit method protocol was highly effective in overcoming problems that hinder next-generation sequencing analysis.

Keywords: DNA concentration, CTAB, *Prunus*, 2× Easy Taq PCR Super Mix, primers.

Аннотация. При получении высококачественной ДНК из тканей и клеток, особенно при использовании растений в качестве исходного материала, возникает множество проблем. Для выделения высококачественной геномной ДНК из листьев видов рода *Prunus* были использованы четыре различных протокола выделения ДНК. *Prunus cerasifera* L., *Prunus domestica* L. и *Prunus armeniaca* L. являются сложными, многофункциональными и вечнозелёными плодовыми древесными растениями семейства Rosaceae, имеющими важное

экологическое, экономическое и культурное значение. Эти виды продуцируют ценные антиоксиданты, такие как полифенолы, полисахариды и вторичные метаболиты, которые препятствуют выделению ДНК, что затрудняет проведение исследований на основе молекулярных маркеров у данных видов. Целью данного исследования было испытание простых, быстрых и высокоэффективных протоколов выделения ДНК из богатых солями и фенолами листьев *P. cerasifera* L., *P. domestica* L. и *P. armeniaca* L. Результаты показали, что протокол метода Kit является весьма эффективным для устранения проблем, препятствующих анализу секвенирования нового поколения.

Ключевые слова: концентрация ДНК, CTAB, *Prunus*, 2× Easy Taq PCR Super Mix, праймеры.

Kirish

DNKni ajratish va tozalash molekulyar tadqiqotlarning muhim bosqichlaridan biri bo‘lib, o‘simliklarda mavjud ikkilamchi metabolitlar bu jarayonga sezilarli darajada to‘sqinlik qiladi. Ushbu komponentlar nuklein kislotalarga o‘xshash tuzilishga ega bo‘lgani sababli, ular umumiy DNK ajratilishiga xalaqit beradi. DNK ajratish vaqtida ular nuklein kislotalar bilan kuchli bog‘lanib, yuqori o‘simliklardan olingan DNK sifatiga ta’sir qiladi. Shuningdek, bu metabolitlar ajratilgan nuklein kislotalarning miqdori va tozaligini ham pasaytiradi. Bunday ifloslantiruvchi moddalarni yo‘qotish murakkab va ko‘p vaqt talab qiluvchi protokollarni talab etadi. Yagona DNK ajratish usuli barcha o‘simlik to‘qimalari uchun universal bo‘la olmaydi. Ko‘pchilik CTAB asosidagi protokollar alohida o‘simlik turlarining ichki tarkibiga moslashtirilgan.

DNK sekvenslash va genotiplashga asoslangan molekulyar yondashuvlar turni molekulyar tavsiflash va uning populyatsion genetikasini tushunish uchun zarur bo‘lib, bu esa seleksiya va saqlash dasturlariga yordam beradi. Ushbu tadqiqotlarda eng muhim talab - maqsadli turdan yuqori sifatli DNK olishdir. O‘simlik genetik resurslarini o‘rganish va molekulyar tahlil qilish o‘simlik molekulyar biologiyasi sohasida doimiy ravishda rivojlanib bormoqda. Har bir yangi kashfiyot bilim chegaralarini kengaytiradi va sekvenslash eng so‘nggi yirik yutuqlardan biridir. Biroq ko‘plab molekulyar genetik tadqiqotlar uchun zarur bo‘lgan tozalangan genom DNKni olish daraxtlarda boshqa o‘simliklarga qaraganda ancha qiyin [1]. Chunki daraxtlarning barglari va boshqa to‘qimalari ko‘pincha turli miqdordagi taninlar, polifenollar va polisaxaridlarni o‘z ichiga oladi, bu ifloslantiruvchi moddalar DNK bilan birga ajralib chiqadi va genom DNKni olishda jiddiy muammolarni keltirib chiqaradi. Bunday aralashmalar keyingi DNK tahlillariga ham xalaqit beradi [2].

O‘simliklardan yuqori sifatli DNK olish murakkab, chunki hujayra devori qattiq polisaxaridlardan iborat bo‘lib, shuningdek polisaxaridlar, polifenollar, alkaloidlar va oqsillar kabi ikkilamchi metabolitlar mavjud [3]. Bu moddalar DNK bilan birga cho‘kib qolishi va polisaxaridlar restriksion fermentlar parchalanishini va Taq DNK polimeraza faoliyatini ingibitsiya qiladi. Polisaxaridlar ko‘pincha ajratilgan DNK bilan birga cho‘kadi va natijada yuqori yopishqoq eritma hosil qiladi [4].

DNK ajratish jarayoni avvalo hujayra devorini buzish yoki parchalash orqali hujayra tarkibini ajratib olishni o‘z ichiga oladi. Shundan so‘ng hujayra membranalari buzilib, DNK ekstraksiya buferiga chiqariladi. Bu odatda natriy dodesil sulfat (SDS) yoki setiltrimetilammoniy bromid (CTAB) kabi detergentlar yordamida amalga oshiriladi.

DNKni butun o‘simlikdan ajratishning bir nechta usullari mavjud. Ba’zi usullar yuqori sifatli DNK beradi, boshqalari esa ko‘proq miqdorda DNK ajratadi. Shuning uchun DNK ajratish uchun mos usulni tanlash muhim hisoblanadi. Shu asosda ushbu tadqiqotning maqsadi Prunus cerasifera.l, Prunus domestica.l va Prunus armeniaca.l o‘simliklaridan olingan umumiy DNK (tDNK) sifatini 4 xil ekstraksiya usuli orqali taqqoslashdan iborat: asosiy CTAB usuli, SDS usuli, modifikatsiyalangan ko‘mir va kit usuli.

Materiallar va usullar

Tadqiqot hududi va namuna yig‘ish. P. cerasifera.l (myrobaland 29C), P. domestica.l (Tetra) va P. armeniaca.l ning yosh barglari (2026 yil may) in vitro labaratoriyasidan chiqqan o‘simliklardan yig‘ib olindi. Barg namunalar yig‘ilgach keyingi foydalanishgacha chuqur muzlatkichda (-20°C) saqlandi. Tajriba Guliston davlat universiteti Agrobiotexnologiyalar va biokimyo ilmiy tadqiqot institutining labaratoriyalarida o‘tkazildi.

Genom DNK ajratish

Dastlab, P. cerasifera.l, P.domestica.l va P armeniaca.l dan DNK ajratish uchun Doyle va Doyle (1987) tomonidan ishlab chiqilgan an’anaviy CTAB protokoli (CCP) qo‘llanildi [5]. SDS-Natriy dodesil sulfat metod [6]. Shuningdek, Krizman tomonidan tavsiflangan modifikatsiya qilingan aktiv ko‘mir protokoli (ACP) [7] va kit (ikki buferli protokol) sinab ko‘rildi [8]. Asosiy modifikatsiyalar CTAB, SDS, aktiv ko‘mir va ikki buferli (kit usuli) protokollarda qo‘llanildi (1-jadval).

1-jadval

Turli protokollarda qo‘llanilgan ekstraksiya buferlarining kimyoviy tarkibi (pH = 8.0).

CCP	SDS	ACP	Kit	
			FP1 Lizis Bufer (LB)	FP2 Extraction (cho‘ktirish) Buffer (EB)
100 mM Tris-HCl	100 mM Tris-HCl	100 mM Tris-HCl	100 mM Tris-HCl	100 mM Tris- HCl
20 mM EDTA	50 mM EDTA	20 mM EDTA	20 mM EDTA	20 mM EDTA
1.4 M NaCl	5 M NaCl	2 M NaCl	1.4 M NaCl	1.4 M NaCl
2 % PVP-40 (w/v)	2 % PVP-40 (w/v)	2 % PVP-40 (w/v)	3 % PVP-40 (w/v)	3 % PVP-40 (w/v)
2 % CTAB (w/v)	-	2 % CTAB (w/v)	-	3 % CTAB (w/v)
-	-	0.5 %Activated Charcoal (w/v)	-	-
-	1 % SDS (w/v)	-	-	-
0.2 % β-ME (v/v)	0.5 % β-ME (v/v)	-	0.5 % β-ME (v/v)	0.5 % β-ME (v/v)

Asosiy CTAB protokoli (CCP)

Sterillangan yangi barg namunasi (0.25 gr) suyuq azotga muzlatilib mayda kukunga (gomogenizatsi) aylantirildi. 600 mkl 60ºC da qizdirilgan CTAB buferi solib probirkalarga solindi va 60ºC da yana suv hammomida (AUTOBLOT) 20 daqiqa quyildi. Yuqori qatlam teng hajmdagi xloroforum:izoamil spirit (24:1) solinib, 2 daqiqa vorteks qilindi va 13000 rpm da 3 daqiqa sentrifugatsiya qilindi. Ustki qatlamdan 600 mkl ajratib olindi va 0.1 hajmda 3M natriy atsetat (pH-5.5) qo‘shildi, vorteks qilindi. Muzdek 100 % izopropanol qo‘shilib, 2 daqiqa sekin aralashtirildi va 13000 rpm da 10 daqiqa sentrifugatsiya qilindi, DNK cho‘ktirildi supernatant to‘kildi. Cho‘kma ustiga 600 mkl 70 % etanol qo‘shildi va 13000 rpm da 3 daqiqa sentrifugatsiya qilindi va etanol to‘kildi. Quritilib 10 daqiqa 45ºC TE buferda eritildi va -20°C da saqlandi.

Natriy dodesil sulfat metodi (SDS) protokoli

Sterillangan yangi barg namunasi (0.25 gr) suyuq azotga muzlatilib mayda kukunga aylantirildi. alohida-alohida parafilm ustida steril PCR naychasi yordamida 20 mkl DNK ekstraksiya buferi (5 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 1% SDS, 0.5% β-merkaptopetanol, pH 8.0) bilan gomogenizatsiya qilindi. Olingan gomogenat steril 1.5 ml sentrifuga probirkasiga o‘tkazildi. 180 mkl DNK ekstraksiya buferi bilan yuvildi va shu eppendorf probirkasi (tube)ga qo‘shildi. Probirkaga 5 mkl proteinaza K qo‘shildi, qisqa vortex qilindi va 65°C da 40 daqiqa inkubatsiya qilindi. Inkubatsiya davomida vaqti-vaqti bilan aralashtirildi. 7500 rpm da 10 daqiqa

sentrifugadan o‘tkazildi. Supernatant yangi 1.5 ml sentrifuga probirkasiga ko‘chirildi. 150 mkl muzdek 5 M NaCl qo‘shildi va yaxshilab aralashtirildi. 12000 rpm da 15 daqiqa sentrifugadan o‘tkazildi. Supernatant yangi 1.5 ml probirkasiga ko‘chirildi va teng hajmda muzdek izopropanol bilan aralashtirildi. Aralashma -20°C da 30 daqiqa saqlandi. 12000 rpm da 15 daqiqa sentrifugadan o‘tkazildi. Supernatant tashlab yuborildi. DNK pellet muzdek 75% etanol bilan yuvildi. 10000 rpm da 10 daqiqa sentrifugadan o‘tkazildi. Supernatant tashlab yuborildi. Havoda quritildi. DNKni eritish uchun 40 mkl ultra toza suv qo‘shildi va foydalanish uchun -20°C da saqlandi.

Modifikatsiya qilingan aktiv ko‘mir (ACP) protokoli

Sterillangan barg namunasi (0.25 g) suyuq azotda mayda kukunga aylantirildi va oldindan isitilgan (60°C) ko‘mirli bufer (1 ml) saqlovchi 2 ml sentrifuga (tube) probirkasiga o‘tkazildi hamda 60°C suv hammomida 1 soat davomida vaqti-vaqti bilan sekin aralashtirib inkubatsiya qilindi. Tube ga 500 µl xloroform:izoamil spirt (24:1) qo‘shildi va bir jinsli emulsiyaga kelguncha ehtiyotkorlik bilan ag‘darildi. So‘ng naychalar xona haroratida 6 daqiqa sentrifugadan o‘tkazildi. Yuqori suvli faza 1.5 ml sentrifuga (tube) probirkasiga ko‘chirildi va supernatantga teng hajmda (1:1) sovutilgan izopropanol (-20°C) qo‘shildi. Probirkalar DNK filamentlari ko‘ringuncha ehtiyotkorlik bilan ag‘darildi va cho‘kmani kuchaytirish uchun -20°C da bir kecha davomida inkubatsiya qilindi. Tube lar 4°C da 15 daqiqa sentrifugadan o‘tkazildi va supernatant to‘kib tashlandi. Pellet 96% etanol (995 µl) va 3 M natriy asetat (5 µl) bilan 45 daqiqa davomida yuvildi. Tube lar 4°C da yana qayta 5 daqiqa sentrifugadan o‘tkazildi va supernatant to‘kib tashlandi. Pellet yana 70% etanol (500 µl) bilan yuvildi va 4°C da 5 daqiqa sentrifugadan o‘tkazildi. Supernatant to‘kib tashlandi va pellet vakuum quritgichda quritildi. Pellet yuqori tuzli TE-buferda (100 µl) qayta eritildi va xona haroratida erishi uchun qoldirildi, so‘ngra keyingi foydalanish uchun -20°C da saqlandi.

Kit yordamida DNK ajratish

Sterillangan yangi barg namunalari (0.25 gr) suyuq azotga muzlatilib mayda kukunga aylantirildi va kukunlar (0.15 gr) sentrifuga (tube) probirkasiga solib olindi. Dastlab 400 mkl FP1buferi, keyin esa RNaza fermenti 6 mkl qo‘shildi va 3 daqiqa vortex qilindi so‘ng 10 daqiqa xona xaroratida saqlandi. FP2 dan 130 ml qo‘shilib, 3 daqiqa vortex qilindi va 5 daqiqa 12000 prm sentrifuga qilindi. Yuqori qismi ajratib olindi. Xloroforum 500 mkl solindi va yana 2 daqiqa 12000 prmda sentrifuga qilindi. Yuqori qismi ajratib olinib 350 mkl izoprapanol qo‘shildi va -20ºC 1 soatga quyildi. Keyin 5 daqiqa 12000 prmda sentrifuga qilindi va to‘kilib 70 % etanol bilan yuvildi. Sentrifuga qilindi, supernatant tukildi va quritildi. 50 mkl TE buffer solib vortex qilib yaxshilab eritildi va foydalanish uchun -20°C da saqlandi

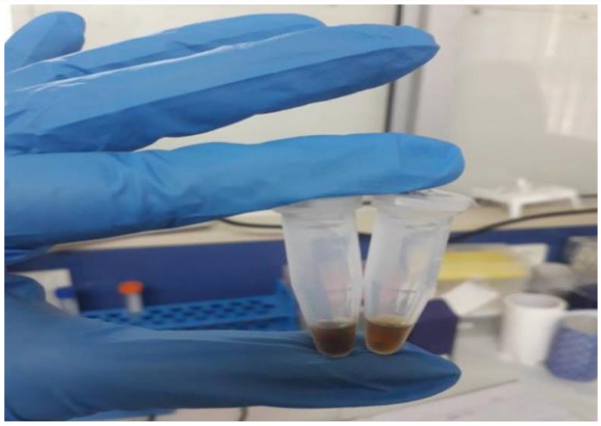
Sifat va miqdoriy tahlil

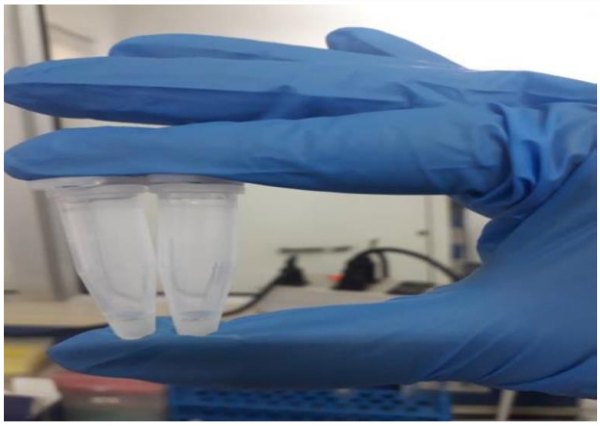
Barcha protokollar orqali ajratilgan genom DNK sifati 0.9% (w/v) agaroz gelda 1X Tris-borik kislota EDTA (TBE) buferi yordamida tahlil qilindi, miqdori esa A260/A280 nm da elektroforez (C.B.S. Scientific) va NanoDrop Eight (thermo scientific) yordamida aniqlanildi. Agaroz gel 3 mkl etidiy bromid bilan bo‘yaldi va gel-dokumentatsiya tizimi (GelDoc-It Imaging system, UVP model LMS-20E, Upland, AQSh) ostida ko‘rildi.

Natijalar

An’anaviy CTAB, SDS va modifikatsiya qilingan aktiv ko‘mir usullari P. cerasifera, P. domestica va P. armeniaca uchun ijobiy natija bermadi va polisaxaridlar hamda polifenollar bilan ifloslanish sababli yopishqoq pellet hosil qildi. DNK ajratish jarayonida bir qator qiyinchiliklarga duch kelindi. Ajratish bosqichida supernatant juda yopishqoq bo‘lib, pipetka bilan olish qiyin edi va izopropanol bilan deyarli yaxshi aralashmadi. CTAB usulida hosil bo‘lgan pellet oq rangda bo‘lsa-da juda yopishqoq va viskoz edi, SDS va modifikatsiya qilingan aktiv ko‘mir usullarida esa jigarrang va yopishqoq pellet hosil bo‘ldi (1-rasm).

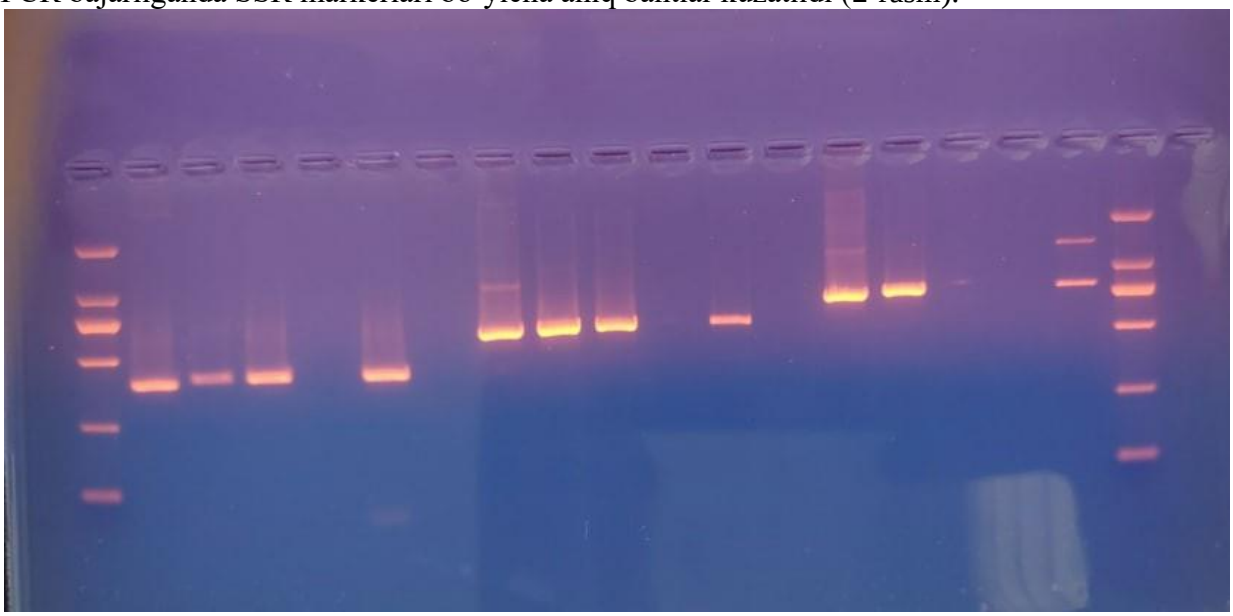
UNIVERSAL JOURNAL OF MEDICAL AND NATURAL SCIENCES
ISSN 2992-8826
https://sr-journals.org/index.php/UJMANS





1-rasm. DNK ajratish protokollarining qiyosiy baholanishi: (a) ACP protokoli orqali ajratilgan DNK jigarrang rangga ega ekanligini ko‘rsatadi, (b) esa kit buferi protokol orqali olingan DNK aniq, yopishqoq bo‘lmagan va shaffof yuqori sifatli DNK ekanligini ko‘rsatadi.

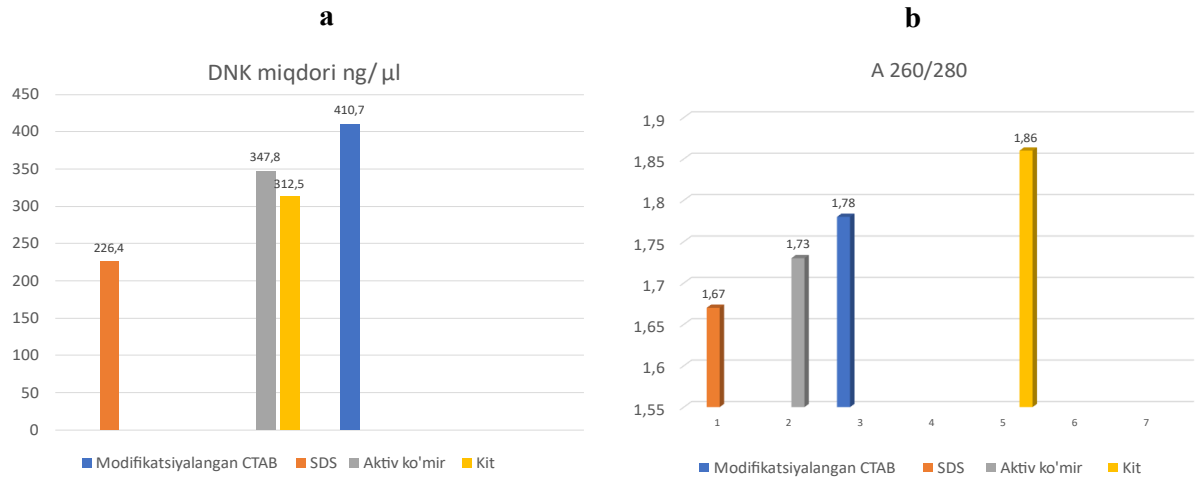
Agaroz gelda parchalanib ketgan bantlar kuzatildi hamda namunalar quduqlarda qolib ketdi. An’anaviy CTAB, SDS va modifikatsiya qilingan aktiv ko‘mir protokollarida PCR amplifikatsiyasi kuzatilmadi (gel tasviri keltirilmagan), biroq kit usuli (ikki buferli protocol) orqali ajratilgan DNK bilan PCR bajarilganda SSR markerlari bo‘yicha aniq bantlar kuzatildi (2-rasm).



2-rasm. Kit usulida ajratilgan Prunus turlarining PZR natijalari

An’anaviy CTAB, SDS va aktiv ko‘mir protokollarida hosil bo‘lgan yopishqoq va viskoz pellet Taq polimeraza fermentiga xalaqit beruvchi aralashmalar mavjudligini ko‘rsatadi, natijada amplifikatsiya kuzatilmadi. Kit (ikki buferli pratokol) da esa qo‘shimcha bufer dastlabki bosqichda aralashmalarni olib tashlab, muvaffaqiyatli PCR amplifikatsiyasiga yordam berdi. Natijalar umumlashtirilgan holda grafik ko‘rinishda berilgan bo‘lib, barcha protokollarda DNK konsentratsiyasi va tozaligi aniq ko‘rsatilgan (3-rasm).

UNIVERSAL JOURNAL OF MEDICAL AND NATURAL SCIENCES
ISSN 2992-8826
https://sr-journals.org/index.php/UJMANS



3-rasm. DNKning miqdoriy tahlili bo‘yicha umumlashtirilgan natijalar: (a) to‘rtta protokol orqali olingan DNK konsentratsiyasi (ng/µl); (b) to‘rtta protokol orqali olingan DNKning tozaligini ifodalovchi A260/280 nisbati.

Muhokama

DNK ajratishning asosiy prinsipi hujayra devori, hujayra membranasi va yadroni buzib, butun DNKni eritmaga chiqarish hamda keyinchalik DNKni cho‘ktirish va oqsillar, polisaxaridlar, lipidlar, fenollar va boshqa ikkilamchi metabolitlar kabi ifloslantiruvchi biomolekulalarni fermentativ yoki kimyoviy usullar bilan olib tashlashdan iborat [9]. Biz P. cerasifera, P. domestica va P. armeniaca barglaridan yuqori sifatli DNK olish uchun to‘rtta protokoldan foydalandik. SDS va modifikatsiya qilingan aktiv ko‘mir protokollarida yopishqoq va jigarrang pelletlar hosil bo‘ldi. Juda viskoz, yopishqoq va jigarrang pelletlar bilan ishlash qiyin bo‘lib, bu fenolik ifloslanishni bildiradi va PCR reaksiyalarida Taq polimeraza fermentining faoliyatini ingibitsiya qiladi [10]. Ushbu usullarda olingan DNKning sifati va miqdori juda past bo‘ldi. Ushbu DNK molekulyar markerlarga asoslangan tadqiqotlar uchun mos emas edi.

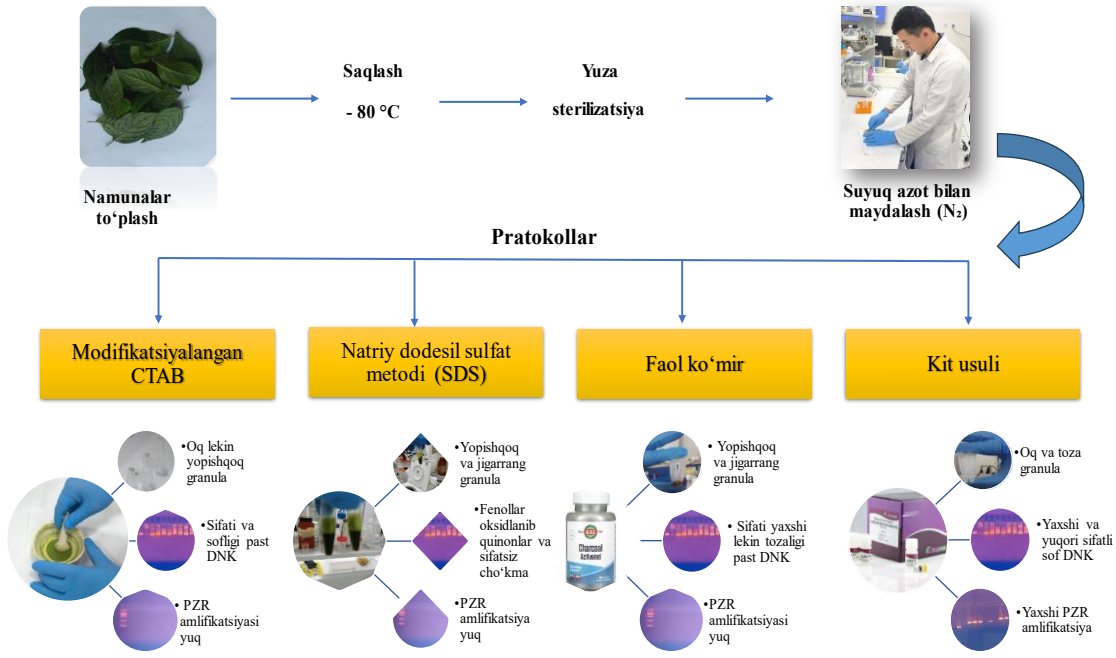
An’anaviy CTAB protokolida suyuq azot bilan maydalash paytida hosil bo‘lgan mexanik kuch murakkab polisaxaridli hujayra devorini buzadi va bu hujayra lizati CTAB bufer bilan inkubatsiya qilinganda hujayra membranasi CTAB ta’sirida buzilib, yadro ajralib chiqadi. Polisaxaridlar va ikkilamchi metabolitlarga boy o‘simlik to‘qimalari DNK bilan birga cho‘kib, pelletni yopishqoq va viskoz holatga keltiradi.

Aktiv ko‘mir - adsorbsiya xususiyatiga ega bo‘lgan uglerod shakli bo‘lib, suv, tuproq va havodan ifloslantiruvchi moddalarni olib tashlashda keng qo‘llaniladi hamda farmatsevtika, sanoat va mikrobiologiyada foydali ekanligi isbotlangan. U o‘simlik to‘qima kulturasi jarayonida ortiqcha polifenollar tufayli o‘sishning ingibir bo‘lishini oldini olishda, PCR ingibitorlarini yo‘qotishda va real-time PCR sezgirligini oshirishda ham muvaffaqiyatli qo‘llanilgan. Aktiv ko‘mir protokolida biz P. cerasifera, P. domestica va P. armeniacadan ajratilgan DNK preparatlaridan polifenollar va boshqa murakkab ikkilamchi metabolitlarni olib tashlash uchun ekstraksiya buferida PVP bilan birga aktiv ko‘mirning adsorbsiya xususiyatidan foydalandik. Aktiv ko‘mir qo‘shilishi DNK hosilini oshirdi, biroq PCR amplifikatsiyasiga imkon beradigan darajada aralashmalarni to‘liq olib tashlay olmadi [11].

Oxirida genom DNK ajratish uchun kit usuli qo‘llanildi. Barcha protokollar ichida aynan ikki buferli protokol hosil miqdori va tozaligi bo‘yicha eng yaxshi natija berdi. Ushbu protokolda CTAB buferidan oldin qo‘shimcha bufer (CTABsiz lizis buferi) ishlatildi. Lizis buferi hujayra membranasi buzilishidan oldin hujayra lizatidan polisaxaridlar va polifenollarni olib tashlashga yordam berdi va bu aralashmalarning DNK bilan birga cho‘kishini oldini oldi. Hujayra devoridagi polisaxaridlar CTAB bufer qo‘shilishidan oldin supernatant bilan birga olib tashlandi.

CTABsiz lizis buferi hujayra devorini buzishga va xom DNK ekstraktidan polifenollarni olib tashlashga yordam berdi. PVP fenolik birikmalarni olib tashlashda muhim rol o‘ynaganligi sababli, uning miqdori oshirilganligidadir, bu esa DNK ekstraktlaridan fenollarni olib tashlab, polifenollarning oksidlanishi tufayli pellet rangining o‘zgarishini oldini oldi. β-merkaptopetanolning yuqori miqdori o‘simlik DNK ekstraktlaridagi oqsillar disulfid bog‘larini uzib, polifenollarni yo‘qotishda samarali ekanligi aniqlangan [12].

CTAB saqlovchi ekstraksiya buferi hujayra membranasini buzishga xizmat qildi. CTAB va PVP birgalikda ikkilamchi metabolitlar va polisaxaridlar ta’sirini kamaytirdi. 3% CTAB va 3% PVP hamda 0.5% β-ME DNK ekstraktlaridan barcha qolgan fenollar, polisaxaridlar va ikkilamchi metabolitlarni olib tashlashga yordam berdi. Kit buferlari orqali ajratilgan DNKning miqdori va tozaligi juda yaxshi bo‘lib, mos ravishda 312.5 ng/µl va 1.86 oralig‘ida bo‘ldi, A260 qiymatlari ham bu natijalarni tasdiqladi (3-rasm). 1.8 qiymati yuqori tozalikni bildiradi, undan past va yuqori qiymatlar esa mos ravishda oqsil va RNK ifloslanishini ko‘rsatadi [13]. Kit usuli orqali olingan genom DNKning samaradorligini tekshirish uchun PCR amplifikatsiyasi amalga oshirildi va primerlar aniq hamda kuchli bantlar berdi, bu protokolning standartlashtirilganligini tasdiqladi. Natijalar shuni ko‘rsatdiki, ikki buferli kit usuli namunadan polisaxaridlar, polifenollar va ikkilamchi metabolitlarni muvaffaqiyatli olib tashlab, yuqori sifatli genom DNK olish imkonini berdi va u DNK asosidagi molekulyar marker tadqiqotlari uchun mos hisoblanadi. Ushbu yondashuv polifenollar, ikkilamchi metabolitlar va polisaxaridlarga boy yetilgan barglardan DNK ajratishda ham foydali bo‘lishi mumkin, chunki ayrim turlarda yosh barglarni yig‘ish qiyin bo‘ladi. Qabul qilingan metodologiya oqim sxemasi shaklida tasvirlangan (4-rasm)



4-rasm. Tadqiqotlarda qo‘llanilgan metodologiyaning oqim sxemasi.

Xulosa

Genetik tadqiqotlarni amalga oshirishda DNK ajratish muhim bosqich hisoblanadi. Fenolik birikmalar, polisaxaridlar va ikkilamchi metabolitlarga boy o‘simliklarda DNK ajratish murakkab bo‘lib, Prunus turkumi shundaylardan biridir. Natijalar shuni ko‘rsatdiki, to‘rta protokol ichida kit usuli yuqori va yaxshi DNK konsentratsiyasini berdi hamda o‘simlik to‘qimalaridan polifenollar, polisaxaridlar va ikkilamchi metabolitlarni muvaffaqiyatli olib tashladi, CTAB, SDS va modifikatsiya qilingan aktiv ko‘mir protokollari esa qoniqarli natija bermadi. Ushbu tadqiqotda ishlab chiqilgan tez, oddiy, samarali va ishonchli DNK ajratish usuli Rosaceae oilasining boshqa

turlarida ham qo‘llanishi mumkin. Shuning uchun ushbu usul keyingi avlod sekvenslash tahlillari kabi turli molekulyar tahlillar uchun tavsiya etiladi.

Foydalanilgan adabiyotlar

1. Shepherd M, Cross M, Stokoe RL, Scott LJ, Jones ME (2002) High-throughput DNA extraction from forest trees. Plant Molecular Biology Reporter 20:425- 425. https://doi.org/10.1007/BF02772134
2. Sharma S, Kumar A, Dobhal S, Rawat A (2018) Standardization of protocol for genomic DNA isolation in *Melia composita* Benth. (SM dubia Cav.). Indian Journal of Biotechnology 17(1):185-188
3. Lucas MS, Carvalho CD, Hypolito GB, Cortes MC. Optimized protocol to isolate high quality genomic DNA from different tissues of a palm species. Hoehnea 2019;46: e942018
4. Zahra Salehi et al. Comparison of five DNA extraction methods in three medicinal plants: *Peganum harmala* L., *Tamarix ramosissima* Ledeb., and *Potentilla reptans* L. Molecular Biology Research Communications 2023;12(1):1-16 DOI:10.22099/mbrc.2023.45131.1798
5. Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19(1):11-15
6. Joseph Sambrook va David W. Russell. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 1982
7. Križman M, Jakse J, Baricevic D, Javornik B, Prosek M (2006) Robust CTAB-activated charcoal protocol for plant DNA extraction. Acta Agriculturae Slovenica 87(2):427-433. https://doi.org/10.14720/aas.2006.87.2.15122
8. Sana Khalid et al. Extraction and comparison of quality and purity of DNA of medicinal plants by CTAB and KIT method. JOURNAL OF CONTEMPORARY PHARMACY. Volume 6: Issue 1: 2022. doi.org/10.56770/jcp2022613
9. Sika KC, Kefela T, Adoukonou-Sagbadja H, Ahoton L, Saidou A, Baba-Moussa L, Baptiste LJ, Kotconi SO, Gachomo EW (2015) A simple and efficient genomic DNA extraction protocol for large scale genetic analyses of plant biological systems. Plant Genetics 1:43-45. https://doi.org/10.1016/j.plgene.2015.03.001
10. Moreira PA, Oliveira DA (2011) Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil. Genetics and Molecular Research 10(1):353–358. https:// doi.org/10.4238/vol10-1gmr1030
11. Kavidayal et al. An improved and effective DNA extraction protocol for *Pyracantha crenulata* with optimal PCR reliability. Silvae Genetica (2024) 73, 110 – 119
12. Deng Q, Deng Q, Liu L, Tao L (2019) DNA extraction and optimization of ISSR-PCR reaction system for *Pyracantha*. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Sciences (Vol. 237, No. 5, p. 052025) IOP Publishing. https://doi.org/10.1088/1755-1315/237/5/052025
13. Rawat A, Barthwal S, Ginwal HS (2013) Genomic DNA extraction from sapwood of *Pinus roxburghii* for polymerase chain reaction studies. African Journal of Biotechnology 12(15):1732-1735. https://doi.org/10.5897/AJB12.2733