



DOI: 10.22363/2312-797X-2025-20-2-274-286

EDN NUKWDH

УДК 577.21:635.655:632.651

Научная статья / Research article

Подбор оптимального метода подготовки проб *Heterodera glycines* для проведения молекулярной диагностики

А.В. Иванов  , Г.Н. Бондаренко Всероссийский центр карантина растений, р.п. Быково, Московская обл., Российская
Федерация tonijons8@mail.ru

Аннотация. Проведена оптимизация методов подготовки образцов (проб) для выделения генетического материала (ДНК) из цист соевой цистообразующей нематоды *Heterodera glycines*, что необходимо для точной идентификации. Были апробированы различные модификации готовых наборов реагентов российских и зарубежных производителей: ДНК-Экстран-2, ФитоСорб, ЦитоСорб, ОРБ-ГМО-А» компании ООО «Синтол» (Россия), Проба-ГС, Проба-НК компании ООО «АгроДиагностика» и QIAamp DNA Mini Kit компании Qiagen (Германия). Путем тестирования методом ПЦР в реальном времени проверена чувствительность выделения тотальной ДНК *Heterodera glycines* с использованием тест-системы, состоящей из прямого и обратного праймеров и модифицированного зонда: SCNrtF (5'-AAATTCCAGGCCGCTATCTC-3'), SCNrtR (5'-CGTGGACTGAACTGGACAAAG-3'), SCNrtP (5'-FAM/-TGGGCTGGGTGCTTCTAGAACTTTT/-BHQ-1/-3').

Ключевые слова: соевая цистообразующая нематода, идентификация, наборы реагентов, экстракция ДНК, ПЦР в реальном времени

Вклад авторов: Иванов А.В. — проведение экспериментов, анализ и интерпретация полученных данных; Бондаренко Г.Н. — научное руководство и консультирование. Все авторы ознакомлены с окончательным вариантом статьи и одобрили его.

Заявление о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Авторы заявляют об отсутствии финансовой заинтересованности или интереса со стороны компаний, производящих оборудование или реагенты, использованные в настоящем исследовании. Результаты публикуются исключительно на основании научной достоверности и независимости выводов.

История статьи: поступила в редакцию 28 ноября 2024 г., принята к публикации 5 марта 2025 г.

Для цитирования: Иванов А.В., Бондаренко Г.Н. Подбор оптимального метода подготовки проб *Heterodera glycines* для проведения молекулярной диагностики // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2025. Т. 20. № 2. С. 274–286. doi: 10.22363/2312-797X-2025-20-2-274-286 EDN: NUKWDH

Study of optimal method of *Heterodera glycines* sample preparation for molecular diagnostics

Anton V. Ivanov  , Galina N. Bondarenko 

All-Russian Plant Quarantine Center, Bykovo, Moscow region, Russian Federation
 tonijons8@mail.ru

Abstract. In this study, it is optimized by the methods of preparing samples for the release of genetic material (DNA) from soybean cyst-forming nematode *Heterodera glycines*, which is necessary for accurate identification. Various modifications of ready-made reagent kits from Russian and foreign manufacturers were tested: DNA-Extrane-2, FitoSorb, TsytoSorb, ORB-GMO-A by Sintol LLC (Russia), Proba-GS, Proba-NK by AgroDiagnostika LLC, and QIAamp DNA Mini Kit by Qiagen (Germany). By testing the PCR method «In real time», the sensitivity of *Heterodera glycines* total DNA release was tested using a test system consisting of forward and reverse primers and a modified probe: SCNrtF (5'-AAATTCCAGGCCGCTATCTC-3'), SCNrtR (5'-CGTGGACTGAACTGAACTGGACAAAG-3'), SCNrtP (5'-FAM/-TGGGCTGGGTGCTTCTAGAACTTTT/-BHQ-1/-3').

Key words: soybean cyst nematode, identification, reagent kits, DNA extraction, real-time PCR (RT-PCR)

Authors' contribution. Ivanov A.V. — conducting experiments, analysis and interpretation of the data obtained; Bondarenko G.N. — scientific supervision and consulting. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest. The authors declare no financial interest or interest from companies manufacturing equipment or reagents used in the study. The results are published solely on the basis of scientific reliability and independence of the conclusions.

Article history: received 28 November 2024; accepted 5 March 2025.

For citation: Ivanov AV, Bondarenko GN. Study of optimal method of *Heterodera glycines* sample preparation for molecular diagnostics. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2025;20(2):274–286. (In Russ.). doi: 10.22363/2312-797X-2025-20-2-274-286 EDN: NUKWDH

Введение

Во многих странах, где производство сои является основой сельскохозяйственной деятельности, распространена соевая цистообразующая нематода, наносящая значительный экономический ущерб урожаю сои и другим бобовым культурам [1]. В 1915 г. впервые отмечена в Японии и зарегистрирована как новый вид *Heterodera glycines* [2]. Род *Heterodera*, к которому относится соевая цистообразующая нематода *Heterodera glycines*, — самый многочисленный среди цистообразующих нематод. Существуют трудности морфологической идентификации из-за большого количества зарегистрированных видов цистообразующих нематод сильно различающейся морфологии, например, внутри группы Schachtii рода *Heterodera*, в которую входят *H. glycines*, *H. schachtii*, *H. trifolii* [3, 4]. Для профилактических способов борьбы и введения карантинных правил необходимо четкое определение

нематод. Поэтому разработаны методы экспресс-диагностики с использованием ПЦР с видоспецифичными праймерами для идентификации *Heterodera glycines*, *H. schachtii*, и эти результаты опубликованы в [5–7], метод RFLP [8–11] и метод секвенирования ДНК [9, 11].

Один из наиболее широко применяемых методов идентификации — метод ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) — позволяет отслеживать процесс накопления продуктов реакции во время амплификации, в отличие от обычной ПЦР, где контроль проводится в конце реакции. Экономически целесообразным для этих целей может считаться ПЦР-тест, который точно анализирует множественные цисты или ювенильные особи за реакцию и достаточно чувствителен, чтобы обнаруживать даже один образец *Heterodera glycines* из общей массы, смешанной, возможно, с другими видами нематод, находящимися в почве.

Приготовление проб, экстракция ДНК, амплификация ДНК и анализ полученных данных составляют ключевые позиции метода ПЦР в режиме реального времени. Создание и совершенствование ПЦР, разработка метода расшифровки нуклеотидных последовательностей (метод секвенирования) и других методов работы с нуклеиновыми кислотами, благодаря новаторским взглядам ряда ученых, в смелых экспериментах которых стала появляться упорядоченность, привело к закономерной эволюции и новым подходам к выделению. Любые методы экстракции, основными составляющими которых являются эффективное разрушение цитоплазматических и ядерных мембран, распад белков и очистка нуклеиновых кислот от побочных продуктов экстракции, направлены на минимизацию затрат и ускоренный режим выделения. Поскольку для повышения достоверности исследования необходим чистый исходный материал, оптимально использовать нетоксичные реагенты, способствующие увеличению выхода и качеству нуклеиновых кислот.

Используемые подходы к выделению нуклеиновых кислот претерпели значительные изменения, что неизбежно способствовало развитию как традиционных, так и современных методов. Среди них можно выделить несорбционные и сорбционные методы, использующие наборы на основе силикатных частиц и анионообменных сорбентов. Продолжают применяться и более простые методы, такие как экстракция на основе органических растворителей, а также высаливание и спиртовой осадок этанолом.

При выделении ДНК на спин-колонках применяется метод твердофазной экстракции, при котором для связывания определенных молекул используется твердый материал (фильтр из силиката), позволяющий получать на выходе продукт высокого качества.

Метод выделения ДНК на магнитных частицах базируется на специфическом взаимодействии нуклеиновых кислот с магнитными частицами, модифицированными оксидами железа и кремния, что позволяет осуществить их иммобилизацию из лизата биологического материала. Последующая серия промывок обеспечивает удаление примесей, после чего очищенная ДНК элюируется для дальнейшего анализа.

Метод выделения ДНК с использованием различных лизирующих буферов, протеиназы К и органических растворителей. Данный метод, существующий в ряде модификаций, прост и надежен, но и наиболее трудоемкий.

Для успешного выделения ДНК необходимы качественные наборы реагентов, обеспечивающие максимальную эффективность процесса и минимальные потери целевого продукта. **Целью исследования** были выявление и апробация передовых и более современных методов экстракции ДНК для повышения эффективности производственного процесса во время диагностики тестируемых образцов нематод с применением реактивов российского и импортного производства. Осуществлен сопоставительный анализ коммерческих наборов российского и импортного производства с целью оценки их эффективности при выделении нуклеиновых кислот из тканей соевой нематоды *Heterodera glycines* для постановки ПЦР в реальном времени.

Материалы и методы исследования

Осуществляли тестирование наборов для экстракции ДНК, чтобы определить, какой из них может давать результат наилучшего качества для дальнейшей диагностики.

При проведении экспериментов ДНК из образцов соевой цистообразующей нематоды *Heterodera glycines* коллекции лаборатории гельминтологии ФГБУ «ВНИИКР» экстрагировали ДНК с использованием следующих 7 готовых наборов реагентов (НР) российского и импортного производства:

– НР «*CytoSorb*/CytoSorb», принцип действия которого основан на лизисе супернатанта в присутствии гидрохлорида гуанидина (GuHCl), с последующей сорбцией нуклеиновых кислот на кремниевых частицах в присутствии высокой концентрации солей натрия (Каталог № EW-001 компании ООО «Синтол», Россия; <https://www.syntol.ru/>);

– НР «*СОРБ-ГМО-А*», принцип действия которого состоит в лизисе надосадочной жидкости в присутствии ионного детергента ЦТАБ (цетил-триметиламмония бромид) и в дальнейшей депротеинизации хлороформом (CHCl) с последующим осаждением нуклеиновых кислот на кремниевый сорбент в присутствии солей гуанидина (Каталог № GM-502-50 компании ООО «Синтол», Россия; <https://www.syntol.ru/>);

– НР «*ФитоСорб*» для выделения ДНК и РНК из растительного материала. Метод выделения основан на сорбции ДНК и РНК на покрытых силикагелем магнитных частицах с последующим осаждением преципитирующим реагентом (Каталог № PH-520 компании ООО «Синтол», Россия; <https://www.syntol.ru/>);

– НР «*ДНК-Экстран-2*» предназначен для выделения ДНК с использованием лизирующего буфера и протеиназы К, которая способствует разрушению белковых компонентов. Очистка от белков осуществляется без применения органических растворителей. Извлечение ДНК из очищенного раствора производится с помощью изопропилового спирта, где гликоген используется как соосадитель,

согласно инструкции производителя. Данный метод представляется наиболее оптимальным, так как позволяет использовать уже готовый набор, с успехом применяемый в других областях, в т.ч. в медицине. Производитель рекомендует выделять ДНК с биомассы 5...10 мг замороженной ткани, поскольку биомасса нематод значительно меньше, есть возможность сократить объем реактивов, рекомендуемый производителем. Эта модификация выделения ДНК была успешно применена в нашем исследовании (Каталог № EX-511 компании ООО «Синтол», Россия; <https://www.syntol.ru/>);

– НР «Проба-ГС»: метод основан на использовании для лизиса клеток сильного хаотропного агента — гуанидина тиоционата (GuSCN) и последующей сорбции ДНК на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля и т.д.). После отмывок в пробе остается ДНК, сорбированная на носителе, с которого она легко снимается с помощью элюирующего раствора (Каталог № P-091/2 компании ООО «АгроДиагностика», Россия; <https://www.agrodiagnostica.com/>);

– комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот из растительной ткани «Проба-НК» основан на лизисе супернатанта с последующим тотальным осаждением нуклеиновых кислот спиртами (Каталог № P-090/2 компании ООО «АгроДиагностика», Россия; <https://www.agrodiagnostica.com/>);

– зарубежный НР QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия). Удобный формат набора обеспечивает выделение высококачественной, готовой к использованию ДНК и сочетает в себе селективные связывающие свойства мембраны на основе диоксида кремния с гибкими объемами элюирования от 20 до 100 мкл. Технология QIAamp DNA Micro позволяет с помощью быстрых спин-колоночных или вакуумных процедур получать геномную и митохондриальную, бактериальную, паразитарную или вирусную ДНК из небольших образцов, готовых к использованию в процедурах ПЦР (<https://qiagen.com>).

Для точного анализа методом ПЦР в реальном времени крайне важно использовать образец высокого качества ввиду того, что его чистота и концентрация напрямую влияют на надежность полученных данных, а используемый метод выделения должен минимизировать потери нуклеиновых кислот и обеспечивать высокую чувствительность анализа.

Выделение ДНК нематод проводили с использованием разных наборов реагентов, каждый из которых был протестирован в пяти повторностях. Эффективность извлечения и качество полученной ДНК проверяли методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) и учитывали уровень флуоресценции тестируемых образцов.

В тестировании использовали тест-систему, состоящую из праймеров и зонда длиной 83 п.н., основанных на геномной последовательности SCN-SCAR-маркера длиной 477 п.н., включая прямой праймер SCNFI и обратный праймер SCNRI [12]. Прямой праймер SCNrtF (5'-AAATTCAGGCCGCTATCTC-3': содержание GC: 50,0 %, температура плавления: 54,9 °C) и обратный праймер SCNrtR (5'-CGTGGACTGAACTGGACAAAG-3': содержание GC: 52,4 %, температура плавления: 55,9 °C). Зонд с двойным гашением SCNrtP (5'-/-FAM/TGGGCTGGG/

ZEN/TGCTTCTAGAACTTTT/3IABkFQ/-3': содержание GC: 48,0 %, температура плавления: 60,5 °C) [13].

Зонд был модифицирован на 5' конце флуоресцентным красителем FAM, а на 3'конце гасителем флуоресценции BHQ-1.

Набор из видоспецифичных олигонуклеотидных праймеров и зонда был синтезирован в компании ЗАО «Евроген» (Россия) и получен в лиофилизированном виде. Согласно рекомендациям производителя, он был ресуспендирован до конечной концентрации 100 пикомолей на микролитр (pmol/μl).

Условия проведения ПЦР-РВ, необходимые для амплификации фрагментов ДНК с помощью специфичных праймеров и флуоресцентного зонда, и состав реакционной смеси приведены в табл. 1.

Таблица 1

Условия амплификации и состав реакционной смеси

Этап	Температура, °C	Время	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	2 мин	1
Денатурация	95	10 с	50
Отжиг праймеров (с детекцией флуоресценции по каналу FAM)	62	45 с	
Состав реакционной смеси		Объем компонентана 1 образец, мкл	
5X qPCRmix-HS ЗАО «Евроген»		5	
Прямой праймер SCNrtF (10 пикомоль/мкл)		1	
Обратный праймер SCNrtR (10 пикомоль/мкл)		1	
Зонд SCNrtP (5 пикомоль/мкл)		1	
Деионизированная вода		16	
ДНК-матрица		1	

Источник: выполнено А.В. Ивановым.

Table 1

Amplification conditions and the composition of the reaction mixture

Stage	Temperature, °C	Time	Cycles
Initial denaturation	95	2 min	1
Denaturation	95	10 secs	50
Anneal primers (with fluorescence detection in the FAM channel)	62	45 secs	
The composition of the reaction mixture		Volume of component per sample, µl	
5X qPCRmix-HS Evrogen		5	
Forward primer SCNrtF (10 µmol/µl)		1	
Reverse primer SCNrtR (10 µmol/µl)		1	
Probe SCNrtP (5 µmol/µl)		1	
Sterile dH2O		16	
DNA sample		1	

Source: compiled by A.V. Ivanov.

После окончания амплификации рассчитывали значение порогового цикла (Ct — threshold cycle). Определение величины порогового цикла основано на построении стандартного графика, отражающего прямую зависимость между значением Ct и первоначальной концентрацией ДНК. Установлено, что между количеством ДНК нематоды в образце и значением порогового цикла существует обратно-пропорциональная зависимость: чем выше значение Ct и дольше сигнал флуоресценции достигает пороговой отметки, тем меньше ДНК присутствует в пробе, тогда как низкое значение Ct указывает на большое количество ДНК в образце [14].

Определение количества нуклеиновых кислот в растворе осуществлялся методом, который основывается на их характерной особенности интенсивно поглощать ультрафиолетовый свет на длине волны 260 нм. Интенсивность поглощения прямо пропорциональна количеству присутствующей ДНК, позволяя точно оценить ее концентрацию. Показатель оптической плотности при 260/280 нм, являясь индикатором для высококачественной ДНК, должен находиться в диапазоне значений 1,8...2,2. Более низкий показатель может указывать на наличие значительных количеств белковых примесей, фенолов или других контаминантов, которые сильно поглощают свет при 280 нм, что говорит о возможном загрязнении образца остатками веществ после процесса экстракции.

Результаты исследования и обсуждение

Важнейшей целью экстрагирования высокоочищенной ДНК является получение препаратов требуемой чистоты с одновременной минимизацией потерь нуклеиновых кислот. Степень очистки выделенных препаратов ДНК и их концентрацию определяли спектрофотометрическим методом на анализаторе NanoDrop (фирмы Thermo Fisher Scientific, США). Для каждого тестируемого набора реагентов и образца измеряли количество очищенной ДНК (табл. 2).

Таблица 2

Определение концентрации ДНК, выделенной из *Heterodera glycines*

№ п/п	Набор реагентов	Образец	Концентрация, мкг/мкл	Отношение 260/280 нм
1	ДНК-Экстран-2 (Синтол)	<i>H. glycines</i> (1)	6,5	1,94
2		<i>H. glycines</i> (2)	3,1	1,88
3		<i>H. glycines</i> (3)	3,7	1,91
4		<i>H. glycines</i> (4)	5,6	1,87
5		<i>H. glycines</i> (5)	3,5	1,81
6	Сорб-ГМО-А (Синтол)	<i>H. glycines</i> (6)	2,5	1,59
7		<i>H. glycines</i> (7)	2,8	1,48
8		<i>H. glycines</i> (8)	2,4	1,49
9		<i>H. glycines</i> (9)	3,5	1,38
10		<i>H. glycines</i> (10)	1,6	1,59

Окончание табл. 2

№ п/п	Набор реагентов	Образец	Концентрация, мкг/мкл	Отношение 260/280 нм
11	Проба-ГС (Агро-Диагностика)	<i>H. glycines</i> (11)	11,1	6,26
12		<i>H. glycines</i> (12)	12,5	5,54
13		<i>H. glycines</i> (13)	10,5	5,87
14		<i>H. glycines</i> (14)	11,7	8,40
15		<i>H. glycines</i> (15)	10,7	7,74
16	ФитоСорб (Синтол)	<i>H. glycines</i> (16)	14,4	1,50
17		<i>H. glycines</i> (17)	18,7	1,44
18		<i>H. glycines</i> (18)	17,4	1,37
19		<i>H. glycines</i> (19)	20,4	1,40
20		<i>H. glycines</i> (20)	17,5	1,46
21	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)	<i>H. glycines</i> (21)	0,7	0,97
22		<i>H. glycines</i> (22)	1,1	0,98
23		<i>H. glycines</i> (23)	1,2	0,99
24		<i>H. glycines</i> (24)	0,8	1,14
25		<i>H. glycines</i> (25)	1,6	1,35
26	Проба-НК (Агро-Диагностика)	<i>H. glycines</i> (26)	6,9	1,37
27		<i>H. glycines</i> (27)	4,9	1,18
28		<i>H. glycines</i> (28)	9,7	1,44
29		<i>H. glycines</i> (29)	7,0	1,78
30		<i>H. glycines</i> (30)	5,1	1,31
31	ЦитоСорб (Синтол)	<i>H. glycines</i> (31)	29,6	1,47
32		<i>H. glycines</i> (32)	29,4	1,50
33		<i>H. glycines</i> (33)	27,1	1,45
34		<i>H. glycines</i> (34)	27,9	1,45
35		<i>H. glycines</i> (35)	30,6	1,47

Источник: выполнено А.В. Ивановым.

Table 2

Determining the concentration of DNA isolated from *Heterodera glycines*

№ п/п	Reagent kit	Sample	Concentration, µg/mL	The ratio of the 260/280 nm
1	DNA-Extran-2 (Sintol)	<i>H. glycines</i> (1)	6.5	1.94
2		<i>H. glycines</i> (2)	3.1	1.88
3		<i>H. glycines</i> (3)	3.7	1.91
4		<i>H. glycines</i> (4)	5.6	1.87
5		<i>H. glycines</i> (5)	3.5	1.81

Ending. 2

№ п/п	Reagent kit	Sample	Concentration, µg/mL	The ratio of the 260/280 nm
6	Sorb-GMO-A (Sintol)	<i>H. glycines</i> (6)	2.5	1.59
7		<i>H. glycines</i> (7)	2.8	1.48
8		<i>H. glycines</i> (8)	2.4	1.49
9		<i>H. glycines</i> (9)	3.5	1.38
10		<i>H. glycines</i> (10)	1.6	1.59
11	Proba-GS (Agrodiagnostika)	<i>H. glycines</i> (11)	11.1	6.26
12		<i>H. glycines</i> (12)	12.5	5.54
13		<i>H. glycines</i> (13)	10.5	5.87
14		<i>H. glycines</i> (14)	11.7	8.40
15		<i>H. glycines</i> (15)	10.7	7.74
16	PhytoSorb (Sintol)	<i>H. glycines</i> (16)	14.4	1.50
17		<i>H. glycines</i> (17)	18.7	1.44
18		<i>H. glycines</i> (18)	17.4	1.37
19		<i>H. glycines</i> (19)	20.4	1.40
20		<i>H. glycines</i> (20)	17.5	1.46
21	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)	<i>H. glycines</i> (21)	0.7	0.97
22		<i>H. glycines</i> (22)	1.1	0.98
23		<i>H. glycines</i> (23)	1.2	0.99
24		<i>H. glycines</i> (24)	0.8	1.14
25		<i>H. glycines</i> (25)	1.6	1.35
26	Proba-NK (Agrodiagnostika)	<i>H. glycines</i> (26)	6.9	1.37
27		<i>H. glycines</i> (27)	4.9	1.18
28		<i>H. glycines</i> (28)	9.7	1.44
29		<i>H. glycines</i> (29)	7.0	1.78
30		<i>H. glycines</i> (30)	5.1	1.31
31	CytoSorb (Sintol)	<i>H. glycines</i> (31)	29.6	1.47
32		<i>H. glycines</i> (32)	29.4	1.50
33		<i>H. glycines</i> (33)	27.1	1.45
34		<i>H. glycines</i> (34)	27.9	1.45
35		<i>H. glycines</i> (35)	30.6	1.47

Source: compiled by A.V. Ivanov.

Для количественной оценки экстрагированной ДНК использовали метод ПЦР в реальном времени с применением модифицированной системы праймеры — зонд, представленной в данной работе. Опираясь на полученные данные значений пороговых циклов ПЦР-РВ, сделали оценку количества и качества извлеченной ДНК *Heterodera glycines*.

Результаты проведенного ПЦР-анализа проб, выделенных с помощью исследуемых наборов препаратов, систематизированы в табл. 3.

Таблица 3

Значения пороговых циклов ПЦР-РВ для образцов ДНК, выделенных из *H. Glycines*

Образец	Набор реагентов и пороговый цикл Ct по каналу FAM, специфичный для <i>H. glycines</i> SCN-SCAR маркер						
	ДНК-Экстр-ан-2 (Синтол)	СорбГМО-А (Синтол)	Проба-ГС (Агро-Диагностика)	Фито-Сорб (Синтол)	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)	Проба-НК (Агро-Диагностика)	ЦитоСорб (Синтол)
<i>H. glycines</i> (1*)	21,28	41,68	25,21	25,45	28,92	21,98	26,39
<i>H. glycines</i> (2*)	25,05	30,29	26,09	25,37	29,61	23,05	23,24
<i>H. glycines</i> (3*)	24,16	27,22	22,84	25,08	26,06	25,70	23,35
<i>H.glycines</i> (4*)	21,24	41,56	23,44	24,70	27,14	21,81	27,36
<i>H.glycines</i> (5*)	24,21	28,09	26,92	23,99	26,99	25,35	25,39
К-в	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ср.з. ± Ст.о.	23,19 ± 0,8	33,79 ± 3,2	24,90 ± 0,7	24,92 ± 0,3	27,74 ± 0,6	23,58 ± 0,8	25,15 ± 0,8

Примечание. К-в — отрицательный контрольный образец выделения; N/A — отсутствие сигнала флуоресценции; Ср.з. — среднее значение; Ст. о. — стандартная ошибка.

Источник: выполнено А.В. Ивановым.

Table 3

The values of the threshold cycles of PCR-RT for DNA samples isolated from *H. glycines*

Sample	Reagents and the threshold cycle Ct fluorescent signal FAM, specific for <i>H. glycines</i> SCN-SCAR marker						
	DNA-Extran-2 (Sintol)	Sorb-GMO-A (Sintol)	Proba-GS (Agro-diagnostika)	PhytoSorb (Sintol)	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)	Proba-NK(Agro-diagnostika)	CytoSorb (Sintol)
<i>H. glycines</i> (1*)	21.28	41.68	25.21	25.45	28.92	21.98	26.39
<i>H. glycines</i> (2*)	25.05	30.29	26.09	25.37	29.61	23.05	23.24
<i>H. glycines</i> (3*)	24.16	27.22	22.84	25.08	26.06	25.70	23.35
<i>H.glycines</i> (4*)	21.24	41.56	23.44	24.70	27.14	21.81	27.36
<i>H.glycines</i> (5*)	24.21	28.09	26.92	23.99	26.99	25.35	25.39
K-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Av.v. ± St.er.	23.19 ± 0.8	33.79 ± 3.2	24.90 ± 0.7	24.92 ± 0.3	27.74 ± 0.6	23.58 ± 0.8	25.15 ± 0.8

Note. K- — negative control sample; N/A — no fluorescence signal; Av. v. — average value; St. er. — standard error.
Source: compiled by A.V. Ivanov.

Согласно приведенным данным (см. таб. 2, 3) наивысшее качество экстракции ДНК *H. glycines* достигнуто при использовании «ДНК-Экстр-ан-2» (Синтол), соответствующий пороговый цикл которого составляет 23,19 Ct, а коэффициент

соотношения поглощения при длинах волн А260/280 нм находится в пределах 1,8...1,97, что также соответствует высокой чистоте полученного препарата ДНК.

Набор «Проба-НК» (АгроДиагностика) также демонстрирует приемлемую эффективность в плане концентрации экстрагированной нуклеиновой кислоты, что подтверждается средним значением порогового цикла 23,58 Ct. Однако коэффициент чистоты, варьирующийся от 1,18 до 1,78, значительно ниже допустимых стандартов, что указывает на возможное загрязнение полученного препарата компонентами, присутствующими в реагентах, используемых для выделения. Это может отрицательно сказаться на последующих этапах анализа, таких как ПЦР-РВ, и привести к искаженным результатам.

Зарубежный набор «DNeasy Plant Mini Kit» (Qiagen) также имеет свои недостатки. Несмотря на то, что цикл (27,74 Ct) находится в пределах среднего значения, но коэффициент чистоты ДНК, колеблющийся от 0,97 до 1,35, заметно ниже оптимального значения. Это свидетельствует о низкой степени очистки экстрагированной нуклеиновой кислоты и потенциальной проблеме, связанной с наличием посторонних примесей, способных повлиять на точность и надежность дальнейших молекулярных исследований. Также, если учесть относительно высокую стоимость использованных реагентов, то данный набор является экономически невыгодным для использования в рутинной диагностике.

Следует отметить, что образцы, полученные с помощью других российских НР, имели низкую степень чистоты — в процессе экстракции в препаратах остались различные примеси и вещества, которые могли повлиять на результаты анализа. Тем более, что уровень ингибирования ПЦР-реакции значительно превысил допустимый пороговый уровень: Проба-ГС — 24,9 Ct; ФитоСорб — 24,92 Ct; ЦитоСорб (Синтол) — 25,15 Ct; Сорб ГМО-А (Синтол) — 33,79 Ct. Вероятно, качество выделенных препаратов ДНК снизилось из-за недостаточного удаления сопутствующих биологических примесей, а также насыщенных хаотропных агентов и детергентов, вследствие попадания которых в реакцию происходит значительное снижение ее эффективности. По этой причине необходимо оптимизировать количество и состав промывок, чтобы получать высокоочищенные препараты ДНК.

Заключение

Итоги исследования приводят к выводу: коммерческие наборы «Проба-ГС» (АгроДиагностика), «ФитоСорб» (Синтол) и ЦитоСорб (Синтол) могут применяться для извлечения нуклеиновых кислот из нематод в рамках стандартных анализов при использовании метода классической ПЦР, так как она менее восприимчива к воздействию ингибирующих агентов.

Зарубежный набор «DNeasy Plant Mini Kit» (Qiagen) и российский набор «Проба-НК» (АгроДиагностика) демонстрируют определенные ограничения в отношении чистоты экстрагированных нуклеиновых кислот. При планировании экспериментов, требующих высокой точности и стабильности результатов, рекомендуется либо

использовать дополнительные методы очистки, либо рассмотреть альтернативные наборы реагентов, обеспечивающие более стабильные и чистые образцы ДНК.

Российский набор реагентов «ДНК-Экстран-2» от компании «Синтол» обеспечил эффективное выделение ДНК, о чем свидетельствует отношение оптических плотностей A260/280 нм в диапазоне 1,8...1,97, подтверждающее высокую чистоту экстракта. Такой материал полностью подходит для проведения качественных молекулярно-генетических исследований. Показатель среднего порогового цикла 23,19 Ct демонстрирует высокую чувствительность метода и гарантирует получение надежных результатов при использовании этого набора в ПЦР-анализе. Результаты указывают на то, что набор реагентов «ДНК-Экстран-2» (Синтол) демонстрирует высокую эффективность выделения ДНК и может быть рекомендован для применения в лабораторных исследованиях, требующих высокой точности и надежности. Таким образом, данный набор реагентов может быть использован для применения чувствительного, практичного и быстрого метода ПЦР в реальном времени для идентификации *Heterodera glycines*.

Список литературы / References

1. Ivanov AV, Sudarikova SV, Khudyakova EA. Optimized approach for the detection of *Heterodera* spp. and the quarantine species *Heterodera glycines*. *Plant Health and Quarantine*. 2020;(4):30–39. (In Russ.). doi: 10.69536/FKR.2020.96.92.001 EDN: JCTKEC
Иванов А.В., Сударикина С.В., Худякова Е.А. Оптимизированный подход к выявлению нематод рода *Heterodera* и карантинного вида *Heterodera glycines* // Фитосанитария. Карантин растений. 2020. № 4. С. 30–39. <https://doi.org/10.69536/FKR.2020.96.92.001> EDN: JCTKEC
2. Ichinohe M. On the soy bean nematode, *Heterodera glycines* n. sp. from Japan. *Oyo-Dobutsugaku-Zasshi (Magazine of Applied Zoology)*. 1952;17(1/2):4.
3. Cook R, Noel GR. Cyst nematodes: *Globodera* and *Heterodera* species. In: Starr JL, Cook R, Bridge J. (eds.) *Plant resistance to parasitic nematodes*. CABI Publishing; 2002. p.71–105. doi: 10.1079/9780851994666.0071
4. Subbotin SA, Mundo-Ocampo M, Baldwin JG. *Systematics of Cyst Nematodes (Nematoda: Heteroderinae)*. *Nematology Monographs and Perspectives*. Vol. 8B. Leiden, The Netherlands: Brill; 2010.
5. Subbotin SA, Peng D, Moens M. A rapid method for the identification of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* using duplex PCR. *Nematology*. 2001;3(4):365–371. doi: 10.1163/156854101317020286 EDN: LYMMML
6. Amiri S, Subbotin SA, Moens M. Identification of the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* by PCR. *European Journal of Plant Pathology*. 2002;108:497–506. doi: 10.1023/A:1019974101225 EDN: MAOKJT
7. Madani M, Subbotin SA, Moens M. Quantitative detection of the potato cyst nematode, *Globodera pallida*, and the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*, using Real-Time PCR with SYBR green I dye. *Molecular and Cellular Probes*. 2005;19(2):81–86. doi: 10.1016/j.mcp.2004.09.006 EDN: LJAWOX
8. Bekal S, Gauthier JP, Rivoal R. Genetic diversity among a complex of cereal cyst nematodes inferred from RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer region. *Genome*. 1997;40(4):479–486. doi: 10.1139/g97-064 EDN: LMLCPX
9. Szalanski AL, Sui DD, Harris TS, Powers TO. Identification of cyst nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1. *Journal of Nematology*. 1997;29(3):255–267.
10. Subbotin SA, Waeyenberge L, Moens M. Identification of cyst forming nematodes of the genus *Heterodera* (Nematoda: Heteroderidae) based on the ribosomal DNA-RFLPs. *Nematology*. 2000;2(2):153–164. doi: 10.1163/156854100509042 EDN: LGBXHV
11. Zheng J, Subbotin SA, Waeyenberge L, Moens M. Molecular characterisation of Chinese *Heterodera glycines* and *H. avenae* populations based on RFLPs and sequences of rDNA-ITS regions. *Russian Journal of Nematology*. 2000;8(2):109–113. EDN: LGBQPF

12. Ou S, Peng D, Liu X, Li Y, Moens M. Identification of *Heterodera glycines* using PCR with sequence characterized amplified region (SCAR) primers. *Nematology*. 2008;10(3):397–403. doi: 10.1163/156854108783900212 EDN: LYYMRB

13. Ye W. Development of PrimeTime-Real-Time PCR for Species Identification of Soybean Cyst Nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe, 1952) in North Carolina. *Russian Journal of Nematology*. 2012;44(3):284–290.

14. Rebrikov DV, Samatov GA, Trofimov DY, Semenov PA, Savilova AM, Kofiadi IA, et al. *PTsR v real'nom vremeni* [Real-time PCR]. Moscow: BINOM publ.; 2009. (In Russ.).

Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР в реальном времени / под ред. Д.В. Ребрикова. М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. С. 115.

Об авторах:

Иванов Антон Владиславович — младший научный сотрудник лаборатории гельминтологии испытательного лабораторного центра, Всероссийский центр карантина растений, Российская Федерация, 140150, Московская область, р.п. Быково, ул. Пограничная, д. 32; e-mail: tonijons8@mail.ru
ORCID: 0009-0002-5361-6100 SPIN-код: 4537-6755

Бондаренко Галина Николаевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник — начальник испытательного лабораторного центра, Всероссийский центр карантина растений, Российская Федерация, 140150, Московская область, р.п. Быково, ул. Пограничная, д. 32; e-mail: reseachergm@mail.ru
ORCID: 0000-0002-1635-2508 SPIN-код: 2631-5209

About authors:

Ivanov Anton Vladislavovich — Junior researcher, Helminthology Laboratory, Testing Laboratory Center, All-Russian Plant Quarantine Center, 32 Pogradichnaya st., Bykovo, 140150, Moscow region, Russian Federation; e-mail: tonijons8@mail.ru

ORCID: 0009-0002-5361-6100 SPIN-code: 4537-6755

Bondarenko Galina Nikolaevna — Candidate of Biological Sciences, Senior researcher, Head of the Testing Laboratory Center, All-Russian Plant Quarantine Center, 32 Pogradichnaya st., Bykovo, 140150, Moscow region, Russian Federation; e-mail: reseachergm@mail.ru

ORCID: 0000-0002-1635-2508 SPIN-code: 2631-5209