

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ ГЕНОМНОЙ ДНК ИЗ РАСТЕНИЙ: ПУТИ РЕШЕНИЯ

© 2023 г. У. А. Галактионова^{1,2}, В. Н. Большаков¹, М. Ю. Тиходеева², О. Н. Тиходеев^{2,*,**}

¹ООО Вега ГК Алкор Био

Железнодорожный проспект 40А, Санкт-Петербург, 192148, Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская наб., 7/9/11, Санкт-Петербург, 199034, Россия

*e-mail: tikhodeyev@mail.ru

**e-mail: o.tihodeev@spbu.ru

Поступила в редакцию 08.12.2022 г.

После доработки 28.05.2023 г.

Принята к публикации 06.06.2023 г.

Важную роль в современных ботанических исследованиях играют различные молекулярно-генетические методы: секвенирование генома, ПЦР, AFLP-анализ и т.п. Эти методы требуют использования высококачественной (т.е. хорошо очищенной и не деградировавшей) геномной ДНК. Однако выделение такой ДНК из растений осложнено широким спектром органических соединений, загрязняющих ДНК и резко снижающих ее качество. В результате протоколы выделения ДНК из растений обычно отличаются трудоемкостью, большими затратами времени и требуют приобретения дорогостоящих реагентов, большинство из которых производится за рубежом. При массовом выделении ДНК из растительного материала перечисленные недостатки имеют большое значение, особенно с учетом текущих проблем с импортом. Более того, не существует универсального протокола, пригодного для любых видов растений и любых вариантов используемого растительного материала: в разных случаях приходится применять разные протоколы и зачастую вводить в них дополнительные модификации. К перспективным путям преодоления этих проблем относится поиск упрощенных методов выделения ДНК из растений, а также использование специально подготовленного исходного материала.

Ключевые слова: геномная ДНК растений, протоколы выделения ДНК, вторичные метаболиты, полифенолы, полисахариды, СТАВ, поливинилпирролидон, *Myrica gale* L.

DOI: 10.31857/S0006813623060030, EDN: ZLLHZC

В различных областях современной биологии, включая ботанику, широко применяют анализ геномной ДНК. К соответствующим методам относятся Саузерн-блот, ПЦР-анализ, RAPD-анализ, AFLP-анализ, секвенирование и целый ряд других (Hadrys et al., 1992; Vos et al., 1995; Arif, 2010; Soltis, Doyle, 2012). В этих методах часто используют энзиматические реакции (рестрикцию, амплификацию, лигирование, модификацию ДНК), эффективность которых может значительно снижаться в присутствии разнообразных ингибиторов. Поэтому непременным условием успешности анализа является получение высококачественных препаратов геномной ДНК.

Для некоторых объектов это не представляет проблемы. Так, серьезные успехи в выделении качественной ДНК из вирусов, бактерий, животных и грибов были достигнуты еще в середине прошлого века (см. Schmidt, 1950). Но на растения эти успехи не распространялись. Первые

протоколы выделения ДНК из растений были разработаны только в 70-х годах (см. Grisvard, Guille, 1973). Это связано с тем, что растительные клетки содержат целый ряд соединений, резко снижающих качество выделяемой ДНК (Couch, Fritz, 1990; Fang et al., 1992; Ziegenhagen et al., 1993; Luro, Laigret, 1995; Barnwell et al., 1998; Aggarwal et al., 2022). Соответственно, эпоха молекулярно-генетического анализа началась для растений на несколько десятилетий позже, чем для других биологических объектов.

К настоящему времени разработано множество протоколов, позволяющих выделять геномную ДНК из растений. Но большинство из них имеет существенные недостатки. Это либо потребность в особых мерах безопасности в связи с использованием вредных реактивов (фенола, хлороформа, 2-меркаптоэтанола), либо реактивы довольно высокой стоимости (СТАВ или магнитные наночастицы), либо необходимость приме-

нения дополнительного оборудования (термостатов, устройств для измельчения растительного материала и т.п.). При массовом выделении ДНК из растительного материала такие нюансы имеют большое значение, особенно с учетом текущей внешнеполитической обстановки.

Настоящий обзор посвящен ключевым проблемам, возникающим при выделении геномной ДНК из растений, а также поиску путей преодоления этих проблем.

БАЗОВАЯ СХЕМА ВЫДЕЛЕНИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК

Хотя протоколы выделения геномной ДНК для разных объектов существенно различаются (Wink, 2006; Kitchoni et al., 2011; Dhaliwal, 2013; Elkins, 2013; Dairawan, Shetty, 2020), общая схема довольно консервативна. Обычно она состоит из трех этапов, каждый из которых важен для рассматриваемой проблемы.

На первом этапе гомогенизируют исследуемый образец и обеспечивают лизирование содержащихся в нем клеток, т.е. разрушают клеточные оболочки и ядерные мембраны. При этом необходимо инактивировать ферменты, способные разрушить ДНК в процессе выделения. Мы не будем останавливаться на протоколах, предназначенных для выделения ДНК из окаменелостей, донных отложений, почвы и т.п. (Daniel, 2005; Parducci et al., 2017; Bailleul, Li, 2021). Ограничимся лишь теми ситуациями, когда в качестве исследуемого образца выступают непосредственно организмы, ткани или клетки – либо живые, либо предварительно фиксированные. Процедура их гомогенизации сравнительно проста. Так, при выделении ДНК из клеток крови достаточно использовать лизирующий буфер, главными компонентами которого являются NaOH, SDS и EDTA (Tapia-Tussell et al., 2005; Dhaliwal, 2013; Elkins, 2013; расшифровка названий используемых реактивов и их роль в процессе выделения ДНК представлены в таблице 1). Если же образец имеет более плотную структуру (например, содержит клеточные стенки), его дополнительно измельчают при помощи ступок, шариковых гомогенизаторов или иного оборудования со сходным предназначением (Garrett et al., 2002; Aggarwal et al., 2022).

На втором этапе лизат очищают от клеточного дебриса (компонентов разрушенных клеточных оболочек и ядерных мембран), а также от содержащихся в цитоплазме белков. Даже сравнительно небольшие концентрации белков могут приводить к быстрому разрушению ДНК или ингибированию энзиматических реакций, необходимых для молекулярно-генетического анализа (Couch, Fritz, 1990; Fang et al., 1992; Ziegenhagen et al., 1993; Luro, Laigret, 1995; Barnwell et al., 1998; Ag-

garwal et al., 2022). Методы соответствующей очистки весьма разнообразны (Tapia-Tussell et al., 2005; Dhaliwal, 2013; Elkins, 2013; Dairawan, Shetty, 2020). Идеальным вариантом является ультрацентрифугирование в градиенте CsCl с отбором фракции ДНК (Grisvard, Guille, 1973; Carpi et al., 2011; Cseke et al., 2012), но это весьма трудоемко и недешево. Простейший способ очистки лизата от белков – высаливание хлоридом или ацетатом натрия, в результате чего белки денатурируют и переходят в нерастворимую форму (Takahashi and Nagano, 1984; Miller et al., 1988; Kaiser et al., 1994). Полученный осадок удаляют центрифугированием, а ДНК остается растворенной в надосадочной жидкости. Однако это не гарантирует хорошей очистки. Более надежный способ удаления белков – экстракция смесью фенола и хлороформа с возможным добавлением изоамилового спирта (Doyle, 1991; Lodhi et al., 1994; Elkins, 2013). ДНК остается в составе водной фазы, а белки уходят в органическую или в осадок. В некоторых случаях дополнительно используют протеиназу К, обеспечивающую дегградацию белков (Procunier et al., 1990; Evans, 2001).

Третий этап – окончательная очистка ДНК. Дело в том, что после первичной обработки лизата в нем сохраняются многие нежелательные соединения, особенно низкомолекулярные. Пытаться осадить их – довольно сложная задача, а потому проблему решают обратным путем: переводят ДНК в нерастворимую форму, оставляя нежелательные соединения в растворе. Для этого к очищенному лизату добавляют этанол, центрифугируют полученную смесь и удаляют надосадочную жидкость. Если отсутствуют какие-либо осложняющие факторы, осадок содержит хорошо очищенную ДНК, а также различные типы РНК. Его обычно растворяют в Tris/EDTA буфере или в воде. Полученный раствор ДНК пригоден для длительного хранения и различных вариантов молекулярно-генетического анализа (Wink, 2006; Dhaliwal, 2013; Dairawan, Shetty, 2020).

ХИМИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК, ЗАТРУДНЯЮЩИЕ ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ ГЕНОМНОЙ ДНК

Спектр таких компонентов очень широк. В первую очередь это полисахариды, полифенолы и липиды. Кратко рассмотрим перечисленные классы соединений и их влияние на качество выделяемой ДНК.

Полисахариды

Среди характерных для растений полисахаридов главным загрязнителем ДНК является цел-

Таблица 1. Реактивы, широко используемые для выделения ДНК из растений
Table 1. Reagents commonly used for DNA extraction from plants

Обозначение	Расшифровка	Роль при выделении ДНК
Силикагель Silica gel	Высушенный гель из перенасыщенных растворов кремниевых кислот Dried gel from supersaturated silicic acid solutions	Благодаря своей гигроскопичности обеспечивает постепенное высушивание и как следствие — консервирование свежего растительного материала Due to its hygroscopic properties provides gradual drying and thus preservation of fresh plant material
Жидкий азот Liquid nitrogen	—	Обеспечивает мгновенное замораживание и как следствие — консервирование свежего растительного материала Provides instant freezing and thus preservation of fresh plant material
SDS	Додецилсульфат натрия Sodium dodecyl sulfate	Ионный детергент, разрушающий клеточные и ядерные мембраны. Способен связывать белки и полисахариды Ionic detergent that destroys cell and nuclear membranes. Able to bind proteins and polysaccharides
EDTA	Этилендиаминтетрауксусная кислота Ethylenediaminetetraacetic acid	Ингибирует многие нуклеазы, связывая необходимые для их активности ионы Mg^{2+} , и тем самым препятствует деградации ДНК Inhibits various nucleases by binding the Mg^{2+} ions necessary for their activity, and thus prevents DNA degradation
NaOH	—	Создает слабощелочную среду, способствующую стабильности ДНК Creates slightly alkaline conditions that promote DNA stability
Tris-HCl	Трис(гидроксиметил)аминометана гидрохлорид Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride	Выполняет буферную функцию, поддерживая необходимый уровень pH Performs a buffering function thus maintaining the necessary pH level
Соли натрия Sodium salts	Как правило, хлорид или ацетат Chloride or acetate, as a rule	В высоких концентрациях снижают растворимость белков и полисахаридов, удерживая ДНК в растворе In high concentrations reduce solubility of proteins and polysaccharides, keeping DNA in solution
СТАВ	Цетилтриметиламмония бромид Cetyltrimethylammonium bromide	Детергент, разрушающий клеточные и ядерные мембраны. Переводит полисахариды в нерастворимое состояние Detergent that destroys cell and nuclear membranes. Converts polysaccharides into insoluble state
α -амилаза α -amylase	—	Расщепляет крахмал на олигосахариды, не осаждаемые вместе с ДНК Cleaves starch into oligosaccharides that do not co-precipitate with DNA
PVP	Поливинилпирролидон Polyvinylpyrrolidone	Образуют водородные связи с полифенолами, способствуя их удалению из лизата Produce hydrogen bonds with polyphenols, thus promoting their removal from the lysate
PVPP	Поливинилполипирролидон Polyvinylpolyrrolidone	

Таблица 1. Окончание

Обозначение	Расшифровка	Роль при выделении ДНК
Антиоксиданты Antioxidants	Как правило, β-меркаптоэтанол β-mercaptoethanol, as a rule	Препятствуют окислению полифенолов и их взаимодействию с ДНК Prevent oxidation of polyphenols and their interaction with DNA
Органические растворители Organic solvents	Как правило, смесь фенола, хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 25:24:1 A mixture of phenol, chloroform, and isoamyl alcohol in the ratio 25:24:1, as a rule	Вызывают денатурацию белков, обеспечивают удаление липидов из лизата Cause denaturation of proteins, ensure removal of lipids from the lysate
Протеиназа К Proteinase K	—	Обеспечивает деградацию белков Provides protein degradation
Изопропанол Isopropanol	—	В зависимости от состава лизирующего буфера переводит в нерастворимое состояние либо белки, либо ДНК Depending on the lysis buffer composition, transfers either proteins or DNA to insoluble state
Этанол Ethanol	—	Переводит ДНК в нерастворимое состояние Converts DNA to insoluble state

люлоза (Barnwell et al., 1998; Sharma et al., 2002; Aggarwal et al., 2022). Она сохраняется в лизате при очистке от белков, а затем осаждается вместе с ДНК, формируя вязкую желатинизированную гранулу. ДНК, выделенная в составе такой гранулы, малоприспособна для молекулярно-генетического анализа: целлюлоза препятствует проведению молекулярной гибридизации, ингибирует ДНК-полимеразы и ферменты рестрикции (Bi et al., 1996; Barnwell et al., 1998; Tel-zur et al., 1999; Sharma et al., 2002). Соответственно, RAPD-, AFLP- и рестрикционный анализ, секвенирование и даже ПЦР крайне затруднены.

Являясь компонентом растительных клеточных стенок, целлюлоза присутствует в любых тканях растений и вместе с другими полисахаридами составляет до 80% сухого веса (Gunina, Kuzyakov, 2015; Noorbakhsh, Khorasgani, 2022). Это создает серьезные проблемы, для решения которых предложены различные пути. В частности, высокая концентрация NaCl снижает растворимость полисахаридов и тем самым удаляет их из клеточного лизата (Lodhi et al., 1994; Aljanabi, Martinez, 1997; Sharma et al., 2002). Сходного эффекта достигают и при помощи СТАВ (Doyle, Doyle, 1987). Особенно успешным оказалось совместное использование высоких концентраций СТАВ и NaCl (Murray, Thompson, 1980; Aljanabi, Martinez, 1997; Tel-zur et al., 1999). Однако для получения высококачественной ДНК процесс выделения становится многоэтапным, а при большом числе образцов — весьма трудоемким. К тому же СТАВ — довольно дорогой реактив. Наконец, выход ДНК при использовании СТАВ обычно ниже по сравнению с другими методами выделения (Rogers,

Bendich, 1994). В связи с этим, заслуживают серьезного внимания сообщения, что СТАВ, по меньшей мере, в некоторых случаях может быть заменен обычным SDS (Edwards et al., 1991; Ahmed et al., 2009; Kotchoni et al., 2011).

При работе с растениями, богатыми крахмалом (пшеница, ячмень, картофель и т.п.), иногда дополнительно применяют α-амилазу, расщепляющую крахмал до олиго- и моносахаридов, которые не осаждаются вместе с ДНК (Liang et al., 2015).

Полифенолы

Это высокогетерогенный класс соединений, содержащих два или более фенольных остатка. Он охватывает различные фенольные кислоты, флавоноиды, стильбены и лигнаны, общее число которых у растений составляет не менее 8000 веществ (Teplova et al., 2018¹), а по некоторым данным — более 50000 (Vasanth Rupasinghe, 2015). Особенно разнообразны флавоноиды. К ним относятся различные флавоны (в том числе — конденсированные танины), ауроны, катехины, халконы, антоцианы и множество родственных им соединений (Peterson, Dwyer, 1998).

При выделении ДНК любые полифенолы представляют собой серьезную проблему: они не только осаждаются вместе с ДНК, но и могут вступать с ней в необратимые химические реак-

¹ [Teplova et al.] Теплова В.В., Исакова Е.П., Кляйн О.И., Дергачева Д.И., Гесслер Н.Н., Дерябина Ю.И. 2018. Природные полифенолы: биологическая активность, фармакологический потенциал, пути метаболической инженерии. — Прикладная биохимия и микробиология. 54 (3): 215–235.

ции (Couch, Fritz, 1990; John, 1992; Lodhi et al., 1994; Peterson et al., 1997). Загрязненная полифенолами осажденная ДНК имеет буроватый оттенок и непригодна для молекулярно-генетического анализа.

Полифенолы относятся к вторичным метаболитам. Они характерны для всех тканей растений, особенно претерпевших лигнификацию. Даже незначительное повреждение растительных клеток приводит к быстрому накоплению и окислению полифенолов, что резко усиливает их взаимодействие с ДНК (Couch, Fritz, 1990; John, 1992; Lodhi et al., 1994). Поэтому при выделении ДНК из растений главной проблемой обычно являются именно полифенолы (Aggarwal et al., 2022).

Для предотвращения описанных выше эффектов в лизирующий буфер добавляют антиоксиданты, как правило – β -меркаптоэтанол (Wang et al., 1996; Michiels et al., 2003). Они препятствуют окислению полифенолов и тем самым повышают качество выделяемой ДНК. Для большей надежности наряду с антиоксидантами часто используют PVP и/или PVPP. Эти вещества образуют водородные связи с различными типами полифенольных соединений и тем самым абсорбируют их из лизата (John, 1992; Lodhi et al., 1994). Указанные модификации достаточно эффективны, однако заметно усложняют базовую схему. В частности, β -меркаптоэтанол относится к высоко токсичным реактивам, что требует соблюдения особых мер безопасности и использования специализированных вытяжных шкафов.

Еще один способ решения проблем, вызванных полифенольными соединениями, заключается в использовании магнитных наночастиц. Такие частицы обычно состоят из магнетита с полимерным покрытием, имеющим сродство к ДНК (Saiyed et al., 2008; Min et al., 2014). Будучи помещенными в клеточный лизат, они абсорбируют на себя молекулы ДНК, а полифенолы остаются в жидкой фракции (Rittich, Španová, 2013). Наночастицы осаждают магнитным полем, промывают, а затем элюируют с них ДНК, повышая температуру до 65°C. Этот метод весьма эффективен, быстр и удобен, однако приводит к заметному удорожанию протокола.

Липиды

К данному классу биоорганических соединений относят очень широкий круг веществ (жиры, стерины, воски и многие другие), общим свойством которых является гидрофобность (Markman, 1963²; 1970³). Липиды присутствуют в каждой раститель-

ной клетке, но их спектр и количество существенно варьируют в зависимости от видовой принадлежности образца, генотипа, используемой ткани и прочих факторов (Ohlrogge et al., 1991).

Даже следовые количества липидов могут негативно влиять на качество ДНК, преобразуя ее раствор в коллоидную смесь, непригодную для enzymатических реакций (Sangwan et al., 2000). Эта проблема особенно актуальна для растений, в которых содержание липидов достаточно высоко, например, для *Papaver somniferum* L. Ее решают, экстрагируя липиды органическими растворителями, например смесью хлороформа и изоамилового спирта (Sangwan et al., 2000). При необходимости проводят повторные экстракции. Это обеспечивает хорошую очистку лизата, однако хлороформ относится к токсичным реактивам, требующим соблюдения специальных мер безопасности.

ВЛИЯНИЕ ИСХОДНОГО РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА НА КАЧЕСТВО ВЫДЕЛЯЕМОЙ ГЕНОМНОЙ ДНК

Чаще всего для выделения высококачественной ДНК используют свежесобранные молодые листья (Murray, Thompson, 1980; Doyle, Doyle, 1987; Bi et al., 1996; Peterson et al., 1997; Sika et al., 2015). Во-первых, клетки в таких листьях сравнительно мелкие, т.е. содержат существенно меньше цитоплазмы, нежели в случае полностью сформированных листьев. В соответствии с этим, количественный выход ДНК из молодых листьев выше, нежели из зрелых (Ahmad et al., 2004). Во-вторых, молодые листья еще не накопили всего объема белков, полисахаридов, полифенолов, липидов и других соединений, способных создать проблемы при выделении ДНК. Поэтому такой материал наиболее предпочтителен для выделения геномной ДНК высокого качества.

Молодые листья могут быть собраны в природе или при выращивании растений в искусственных условиях: в лаборатории, теплице и т.п. (Bi et al., 1996; Michiels et al., 2003; Sharma et al., 2002; Kotchoni et al., 2011; Liang et al., 2015). Вместо листьев иногда используют молодые проростки, зародыши, корни, клубни, каллусные культуры (Rogers, Bendich, 1985; 1989; Tel-zur et al., 1999; Sharma et al., 2002; Kang, Yang, 2004; Tapia-Tussell et al., 2005).

Анализируя естественные популяции растений, исследователь далеко не всегда имеет возможность сразу выделять ДНК из собранного материала. В этих случаях растительный материал приходится фиксировать. Его либо высушивают с помощью силикагеля, либо подвергают глубокой заморозке (как правило, с использованием жидкого азота), либо помещают в обезвоживающие жидкости наподобие смеси этанола и метанола

² [Markman] Маркман А.Л. 1963. Химия липидов. Вып. 1. Жирные кислоты. Ташкент. 174 с.

³ [Markman] Маркман А.Л. 1970. Химия липидов. Вып. 2. Ташкент. 223 с.

(Pyle, Adams, 1989; Couch, Fritz, 1990; Kim et al., 1997; Sharma et al., 2002; Edge-Garza et al., 2014).

Каждый из этих способов связан с определенными проблемами. Так, при фиксации растительного материала в этаноле нередко происходит заметная деградация ДНК (Pyle, Adams, 1989). Сходная проблема возможна и при высушивании. Данный процесс довольно продолжителен (особенно для видов с сочными мясистыми органами), что может отражаться на качестве выделяемой ДНК, поскольку некоторые клетки неизбежно повреждаются (Ryabushkina et al., 2012⁴). Особого внимания требует глубокое замораживание. Оно предохраняет ДНК от действия нуклеаз, однако становится очень серьезной проблемой, если фиксированный материал успевает оттаять, прежде чем будет помещен в лизирующий буфер (Couch, Fritz 1990; Aggarwal et al., 2022). Происходит быстрое окисление полифенолов, что резко снижает качество выделяемой ДНК.

Довольно часто при проведении филогенетического анализа исследователь вынужден использовать гербарные образцы. Их высушивание длится как минимум несколько суток и обычно не предполагает специальных процедур, направленных на хорошую сохранность ДНК. Поэтому выделить качественную геномную ДНК удается далеко не из всех гербарных образцов (Savolainen et al., 1995; Ryabushkina et al., 2012; Krinitsyna et al., 2015⁵). Тем не менее, в некоторых случаях метод работает (Rogers, Bendich, 1989; Ribeiro, Lovato, 2007; Ryabushkina et al., 2012; Korolyuk et al., 2015; Krinitsyna et al., 2015; Rodionov et al., 2017; Fomina et al., 2019⁶). Но это сопряжено с заметным усложнением протокола, в частности – с предварительным замачиванием образца в промывочном буфере, с длительным инкубированием в лизирующем буфере при температуре 60°C, с дополнительной очисткой изопропанолом и т.п. (Savolainen et al., 1995; Ryabushkina et al., 2012; Krinitsyna et al., 2015; Fomina et al., 2019). В итоге выделение становится более трудоемким и требует применения дополнительного оборудования.

С учетом всех перечисленных выше нюансов не существует универсального протокола выделе-

ния ДНК, пригодного для любого вида растений и любого исходного материала. Более того, растения настолько разнообразны по спектру и содержанию вторичных метаболитов, что зачастую при введении в анализ нового вида приходится не только опробовать разные протоколы, но вносить в них те или иные модификации, затрачивая на это время и материальные ресурсы (Ryabushkina et al., 2012; Aggarwal et al., 2022).

ПОИСК ПУТЕЙ, УПРОЩАЮЩИХ ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ДНК ИЗ РАСТЕНИЙ

Традиционные методы выделения ДНК из растений имеют целый ряд серьезных недостатков. Это довольно большие затраты времени (до 6 ч на один образец), высокая стоимость некоторых реактивов, необходимость соблюдения повышенных мер безопасности ввиду использования вредных реактивов, чрезмерно широкий спектр необходимого оборудования (Allen et al., 2006; Aggarwal et al., 2022). В связи с этим, ведется поиск различных путей, позволяющих минимизировать указанные недостатки. Кратко остановимся на двух таких путях.

Разработка упрощенных протоколов выделения ДНК из растений

Несмотря на все перечисленные выше проблемы, для некоторых видов растений удается использовать очень простые протоколы выделения ДНК (Dellaporta et al., 1983a; 1983b; Edwards et al., 1991; Benito et al., 1993; Guidet, 1994). В частности, для свежих листьев резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) оказался весьма успешным следующий протокол (Kotchoni and Gachomo, 2009):

1. В пробирке типа Эппендорф измельчить вручную 10–50 мг свежего растительного материала;
2. К измельченному растительному материалу добавить 400 мкл лизирующего раствора (0.5 М NaCl, 1% SDS) и перемешать на вортексе в течение 20 с при комнатной температуре;
3. Центрифугировать смесь при 13,000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре;
4. Перенести надосадочную жидкость в новую чистую пробирку, добавить 400 мкл изопропанола и аккуратно перемешать;
5. Центрифугировать смесь при 13,000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре;
6. Удалить из пробирки надосадочную жидкость, добавить к осадку 500 мкл 70% этанола;
7. Центрифугировать при 13,000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре;
8. Удалить из пробирки надосадочную жидкость и подсушить осадок на воздухе;

⁴ [Ryabushkina et al.] Рябушкина Н.А., Омашева М.Е., Галиакпаров Н.Н. 2012. Специфика выделения ДНК из растительных объектов. – Биотехнология. Теория и практика. 2: 9–26.

⁵ [Krinitsyna et al.] Криницына А.А., Сизова Т.В., Заика М.А., Сперанская А.С., Сухоруков А.П. 2015. Простой и быстрый метод выделения ДНК из гербарных образцов долгого срока хранения. – Биохимия. 80 (11): 1698–1706.

⁶ [Fomina et al.] Фомина Н.А., Антонова О.Ю., Чухина И.Г., Гавриленко Т.А. 2019. Гербарные коллекции в молекулярно-генетических исследованиях. – Turczaninowia. 22 (4): 104–118.

9. Растворить осадок в 50 мкл воды.

Главные отличительные особенности данного протокола – его простота, дешевизна и малые затраты времени (около 10 минут на образец). Все этапы проводят при комнатной температуре. Для их выполнения нужны всего два прибора: вортекс и настольная центрифуга (это открывает широкие возможности для использования метода в школьных лабораториях, в развивающихся странах и т.п.). Ни один из четырех используемых реактивов не относится к дорогостоящим или требующим особых мер безопасности: это 1% SDS, 0.5 М NaCl, изопропанол и 70% этанол.

Каждый этап протокола предельно прост. Измельченный материал инкубируют в лизирующем буфере, не содержащем EDTA и Tris-HCl, т.е. без регулирования уровня pH. Подавляющее большинство белков и полисахаридов выпадает в осадок вместе с SDS, что позволяет очистить лизат за одно центрифугирование. Выделенная ДНК стабильна, режется рестриктазами и служит эффективной матрицей для ПЦР.

Конечно, такой простой протокол не может быть успешным применительно к любым видам растений. Тем не менее, при незначительных модификациях он пригоден для целого ряда сельскохозяйственных культур, включая капусту (Edwards et al., 1991), рапс (Wang et al., 2022); гевету (Martínez-Caballero et al., 2014), кешью (Sika et al., 2015), кунжут (Wei et al., 2016), бетель (Fakruddin et al., 2017), рис (Singha et al., 2017) и некоторые другие. Причем ДНК удается выделять не только из свежих листьев, но даже из высушенных (Sika et al., 2015). Это позволяет надеяться, что в ближайшей перспективе для многих видов растений будут разработаны упрощенные методы выделения геномной ДНК.

Использование специально подготовленного исходного материала

При анализе видов, сложных для выделения ДНК, могут оказаться полезными специальные приемы, благодаря которым удается получить наиболее приемлемый исходный растительный материал. Мы столкнулись с этим при выделении ДНК из восковника болотного (*Myrica gale* L.) в рамках выполнения гранта РНФ № 22-24-00138. Целью гранта является AFLP-анализ периферических популяций данного вида.

Восковник болотный (семейство Myricaceae) – приатлантический вид кустарников, приуроченный к сильно увлажненным экотопам. Обилен на Британских островах и в Фенноскандии. В России встречается в Карелии и Ленинградской области (Komarov, 1936⁷; Ivanter, Kuznetsov, 2007⁸; Volkova et al., 2021⁹), но все известные популяции весьма

малочисленны (как правило, не более нескольких сотен растений). Поэтому данный вид включен в Красную книгу РФ со статусом редкий (категория 3). На Дальнем Востоке и западном побережье Северной Америки встречается близкая форма, недавно получившая статус самостоятельного вида – *Myrica tomentosa* (DC.) Aschers. et Groebn. (Kashina, Oskolsky, 2009¹⁰).

Насколько нам известно, в литературе отсутствуют протоколы выделения ДНК из восковника болотного. Для данного вида характерны многочисленные органические соединения, затрудняющие выделение геномной ДНК. Действительно, листья и стебли *Myrica gale* обильно покрыты железистыми трихомами, выделяющими широкий спектр липидов, в частности – восков (Svoboda et al., 1998; Popovici et al., 2008). В экссудатах вегетативных и генеративных органов обнаружены разнообразные эфирные масла и флавоноиды (Malterud, 1992; Popovici et al., 2008; 2010; Rosa et al., 2020). Благодаря многочисленным вторичным метаболитам, включая десятки вариантов полифенолов, данный вид проявляет отчетливую антимикробную, репеллентную, фитотоксическую и лекарственную активность (Blackwell et al., 2003; Sylvestre et al., 2005; Popovici et al., 2008; 2011; Silva et al., 2015; Rosa et al., 2020).

Наши попытки выделить геномную ДНК из гербарных образцов или высушенных листьев *Myrica gale* с помощью протоколов со СТАВ (Doyle, Doyle, 1987; Aljanabi, Martinez, 1997; Telzur et al., 1999) оказались неудачными. Из свежесобранных листьев ДНК выделялась, но низкого качества и в недостаточном количестве. Дополнительное использование PVP улучшило ситуацию: выделенная ДНК расщеплялась рестриктазами, но эффективность этого расщепления была низкой.

Поскольку СТАВ – довольно дорогой реактив, а для выполнения нашего гранта необходим анализ большого числа образцов, мы поставили перед собой задачу найти для *Myrica gale* более дешевый протокол выделения ДНК. Попытка применить упрощенный протокол (Kotchoni and Gachomo, 2009)

⁷ [Komarov] Комаров В.Л. (ред.) 1936. Восковник болотный. – В кн.: Флора СССР. Т. 5. М.-Л. С. 243–244.

⁸ [Ivanter, Kuznetsov] Ивантер Э.В., Кузнецов О.Л. (ред.). 2007. Красная книга Республики Карелия. Петрозаводск. 364 с.

⁹ [Volkova et al.] Волкова Е.А., Смагин В.А., Храмов В.Н. 2021. Сообщества с *Myrica gale* L. на болотах побережья Финского залива (Санкт-Петербург и Ленинградская область). – Растительность России. 41: 58–74

¹⁰ [Kashina, Oskolsky] Кашина А.А., Осольский А.А. 2009. Диагностика *Myrica gale* u *M. tomentosa* (Myricaceae) на основе анатомических признаков. – Бот. журн. 94 (9): 1294–1302.

для высушенных листьев не привела к успеху. Из свежих листьев данного вида, собранных в природных популяциях, ДНК выделялась, но была непригодна для молекулярного анализа из-за сильного загрязнения полифенолами.

Распускание листьев у *Myrica gale* в естественных условиях происходит обычно в середине мая. Распустившиеся листья растут довольно медленно (в это время ночные температуры в Ленинградской области могут мало отличаться от 0°C) и уже на ранних этапах своего развития содержат значительное количество полифенолов и восков. Поэтому широко используемая практика выделять ДНК из молодых свежесобранных листьев применительно к данному виду не приносит успеха.

Перед нами встала проблема получения альтернативного исходного материала для выделения ДНК из *Myrica gale*. Понимая сложность задачи, мы провели нестандартный сбор растительного материала. У побега с еще не полностью раскрытыми вегетативными почками мы отрезали верхнюю часть (5–6 почек), что не наносило растению заметного вреда. Отрезанную часть побега помещали в емкость с питьевой водой и выдерживали в течение недели при комнатной температуре. В таких условиях вегетативные почки интенсивно раскрывались с формированием быстро растущих, обильно облиственных, нежных зеленых побегов без признаков накопления восков. По мере развития этих побегов мы собирали молодые листья в пластиковые пробирки и переносили их в холодильник на –70°C для немедленной заморозки.

Полученный свежемороженый материал хорошо сохраняет ДНК длительное время и легко гомогенизируется в пробирках объемом 1.5 мл с помощью пластикового пестика. Более того, из этого материала мы смогли успешно выделить геномную ДНК, используя упрощенный протокол с небольшими модификациями (увеличенная концентрация SDS в лизирующем буфере, инкубация лизата на льду, дополнительная очистка лизата солями гуанидина). Выделенная ДНК стабильна, пригодна для ПЦР и хорошо режется рестриктазами. Подробный протокол с описанием указанных модификаций, а также количества и

качества выделяемой ДНК будет опубликован нами отдельно.

Мы полагаем, что предложенный нами подход может оказаться успешным и для других видов, листья которых в естественных условиях развиваются медленно и еще в молодом состоянии успевают накопить органические соединения, затрудняющие процесс выделения геномной ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дороговизна, трудоемкость, значительные затраты времени, необходимость соблюдения повышенных мер безопасности в связи с применением вредных реактивов, необходимость использования дополнительного оборудования – серьезные недостатки общепринятых протоколов, предназначенных для выделения ДНК из растений. Особенно при анализе большого числа образцов. Поиск путей преодоления перечисленных недостатков становится все более и более актуальной задачей.

Эта задача еще далека до своего решения, но некоторые шаги в нужном направлении уже делаются. В качестве примеров можно привести замену дорогостоящего СТАВ на SDS, использование протоколов выделения без вредных реагентов, осаждение целлюлозы и белков за одно центрифугирование, а также предложенный нами алгоритм нестандартного получения исходного растительного материала. Вполне вероятно, что уже в обозримой перспективе для многих видов растений будут разработаны максимально упрощенные протоколы выделения ДНК, подобные тому, что предложен Kotchoni и Gachomo (2009).

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00138 “Анализ генетического полиморфизма периферических популяций на модели охраняемого вида растений *Myrica gale* (Красная книга РФ)” (<https://rscf.ru/project/22-24-00138/>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

См. References

SPECIFIC PROBLEMS OF GENOMIC DNA EXTRACTION FROM PLANTS: WAYS FOR SOLUTION

U. A. Galaktionova^{a,b}, V. N. Bolshakov^a, M. Yu. Tikhodeeva^b, and O. N. Tikhodeyev^{b,###}

^aVega Ltd, Alkor Bio Group
Zheleznodorozhny Ave., 40A, St. Petersburg, 192148, Russia

^b*Saint-Petersburg State University*
Universitetskaya Emb., 7/9/11, St. Petersburg, 199034, Russia
[#]*E-mail: tikhodeyev@mail.ru*
^{##}*E-mail: o.tihodeev@spbu.ru*

In modern botanical studies, various molecular genetic methods such as genome sequencing, PCR, AFLP-analysis, etc. are often involved. These methods require the use of high-quality (i.e. well purified and non-degraded) genomic DNA. However, extraction of such DNA from plants is complicated by a wide spectrum of organic compounds that contaminate DNA and drastically reduce its quality. As a result, the protocols for DNA extraction from plants are usually labor-intensive, time-consuming and require expensive reagents, most of which are imported from abroad. In the case of high-throughput DNA extraction from plant material, these disadvantages are of a great importance, especially in view of the current import problems. Moreover, there is no universal protocol suitable for all plant species and all variants of plant material used: different protocols are effective in different cases and additional modifications are often required. Promising ways to overcome these problems include the search for simplified methods of plant DNA extraction, as well as the use of specially prepared initial material.

Keywords: plant genomic DNA, protocols for DNA isolation, secondary metabolites, polyphenols, polysaccharides, CTAB, polyvinylpyrrolidone, *Myrica gale* L.

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was supported by grant No. 22-24-00138 of the Russian Science Foundation “Analysis of the genetic polymorphism of edge-populations of the protected plant species *Myrica gale* (Red Book of the Russian Federation) as a model” (<https://rscf.ru/project/22-24-00138/>).

REFERENCES

- Aggarwal G., Edhigalla P., Walia P. 2022. A comprehensive review of high-quality plant DNA isolation. – *The Pharma Innovation Journal*. SP-11 (6): 171–176.
- Ahmad S., Ganaie M., Qazi P., Verma V., Basir S., Qazi G. 2004. Rapid DNA isolation protocol for angiospermic plants. – *Bulg. J. Plant Physiol.* 30 (1–2): 25–33.
- Allen G., Flores-Vergara M., Krasynanski S., Kumar S., Thompson W. 2006. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. – *Nature Protocols*. 1 (5): 2320–2325.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.384>
- Aljanabi S., Martinez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*. 25 (22): 4692–4693.
<https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
- Arif I. A., Bakir M.A., Khan H.A., Al Farhan A.H., Al Homaidan A.A., Bahkali A.H., Sadoon M.A., Shobrak M. 2010. A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. – *Int. J. Mol. Sci.* 11 (5): 2079–2096.
<https://doi.org/10.3390/ijms11052079>
- Bailleul A.M., Li Z. 2021. DNA staining in fossil cells beyond the Quaternary: Reassessment of the evidence and prospects for an improved understanding of DNA preservation in deep time. – *Earth-Science Reviews*. 216: 103600.
<https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2021.103600>
- Barnwell P., Blanchard A.N., Bryant J.A., Smirnoff N., Weir A.F. 1998. Isolation of DNA from the highly mucilaginous succulent plant *Sedum telephium*. – *Plant Mol. Biol. Rep.* 16: 133–138.
<https://doi.org/10.1023/A:1007473302551>
- Benito C.A., Figueiras M., Zaragoza C., Gallego F.J., del Pena A. 1993. Rapid identification of Triticeae genotypes from single seeds using the polymerase chain reaction. – *Plant Mol. Biol.* 21: 181–183.
<https://doi.org/10.1007/BF00039629>
- Bi V., Harvengt L., Chandelier A., Mergeai G., Jardin P. 1996. Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. – *Plant Breed.* 115 (3): 205–206.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1996.tb00905.x>
- Blackwell A., Stuart A.E., Estambale B.B. 2003. The repellent and antifeedant activity of *Myrica gale* oil against *Aedes aegypti* mosquitoes and its enhancement by the addition of salicylic acid. – *J. R. Coll. Physicians Edinb.* 33: 209–214.
- Carpi F.M., Di Pietro F., Vincenzetti S., Mignini F., Napolioni V. 2011. Human DNA Extraction Methods: Patents and Applications. – *Recent Patents DNA Gene Seq.* 5 (1): 1–7.
<https://doi.org/10.2174/187221511794839264>
- Couch J.A., Fritz P.J. 1990. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. – *Plant Mol. Biol. Rep.* 8: 8–12.
<https://doi.org/10.1007/BF02668875>
- Cseke L.J., Kirakosyan A., Kaufman P.B., Westfall M.V. 2012. Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine (3rd Edition). Boca Raton, UK. 735 p.
- Dairawan M., Shetty P.J. 2020. The evolution of DNA extraction methods. – *Am. J. Biomed. Sci. Res.* 8: 39–45.
<http://dx.doi.org/10.34297/AJBSR.2020.08.001234>
- Daniel R. 2005. The metagenomics of soil. – *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (6): 470–478.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1160>
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. 1983a. Maize DNA minipreps. – *Maize Gen. Coop. News*. 57: 26–29.
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. 1983b. A plant DNA minipreparation: version II. – *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:

- 19–21.
<https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Dhaliwal A. 2013. DNA extraction and purification. — *Mater Methods*. 3: 191.
<https://doi.org/10.13070/mm.en.3.191>
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. — *Phytochem. Bull.* 19: 11–15.
- Doyle J. 1991. DNA Protocols for Plants. — In: *Molecular Techniques in Taxonomy*. Berlin. P. 283–293.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18
- Edge-Garza D., Rowland T., Haendiges S., Peace C. 2014. A high-throughput and cost-efficient DNA extraction protocol for the tree fruit crops of apple, sweet cherry, and peach relying on silica beads during tissue sampling. — *Mol. Breed.* 34 (4): 2225–2228.
<https://doi.org/10.1007/s11032-014-0160-x>
- Edwards K., Johnstone C., Thompson C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. — *Nucleic Acids Res.* 9: 1349.
<https://doi.org/10.1093/nar/19.6.1349>
- Elkins K. 2013. *Forensic DNA Biology*. Kidlington, England. 224 p.
- Evans J. 2001. The complexities of predictive genetic testing. — *BMJ*. 322 (7293): 1052–1056.
<https://doi.org/10.1136/bmj.322.7293.1052>
- Fakruddin M., Sultana R., Rahaman M.M., Hossain M.N., Morshed M. 2017. Comparative study of different methods of genomic DNA extraction from Betel leaf (*Piper betle* L.) for detection of *Salmonella* spp. — *Bangladesh J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1 (1): 20–28
- Fang G., Hammar S., Grumet R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. — *Biotechniques*. 13: 52–56.
- Fomina N.A., Antonova O.Y., Chukhina I.G., Gavrilenko T.A. 2019. Gerbarnye kollektzii v molekulyarno-geneticheskikh issledovaniyakh [Herbarium collections in molecular genetic research]. — *Turczaninowia*. 22 (4): 104–118. (In Russ.)
- Garrett P.E., Tao F., Lawrence N., Ji J., Schumacher R.T., Manak M.M. 2002. Tired of the same old grind in the new genomics and proteomics era? — *Targets*. 1 (5): 156–162.
[https://doi.org/10.1016/S1477-3627\(02\)02228-6](https://doi.org/10.1016/S1477-3627(02)02228-6)
- Grisvard J., Guille E. 1973. A new DNA extraction method for plant cells. *Preparative Biochemistry*. 3 (1): 83–94.
- Guidet F. 1994. A powerful new technique to quickly prepare hundreds of plant extracts for PCR and RAPD analyses. — *Nucleic Acids Res.* 22: 1772–1773.
<https://doi.org/10.1093/nar/22.9.1772>
- Gunina A., Kuzyakov Y. 2015. Sugars in soil and sweets for microorganisms: review of origin, content, composition and fate. — *Soil Biol. Biochem.* 90: 87–100.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.07.021>
- Hadrys H., Balick M., Schierwater B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. — *Mol. Ecol.* 1 (1): 55–63.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1992.tb00155.x>
- Ivanter E.V., Kuznetsov O.L. (eds.). 2007. *Krasnaya Kniga Respubliki Karelia [Red Book of the Republic of Karelia]*. Petrozavodsk. 364 p.
- John M. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. — *Nucleic Acids Res.* 20 (9): 2381–2381.
<https://doi.org/10.1093/nar/20.9.2381>
- Kaiser C., Michaelis S., Mitchell A. 1994. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 234 p.
- Kashina A.A., Oskolsky A.A. 2009. Diagnostika *Myrica gale* i *M. tomentosa* (Myricaceae) na osnove anatomicheskikh priznakov [Diagnostics of *Myrica gale* and *M. tomentosa* (Myricaceae) based on the anatomic traits]. — *Botanicheskii zhurnal*. 94(9): 1294–1302. (In Russ.)
- Kim C., Lee C., Shin J., Chung Y., Hyung N. 1997. A simple and rapid method for isolation of high-quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Res.* 25 (5): 1085–1086.
<https://doi.org/10.1093/nar/25.5.1085>
- Komarov V.L. (ed.) 1936. *Voskovnik bolotnyi [Sweet gale]*. — In.: *Flora of SSSR*. V. 5. M.-L. pp. 243–244. (In Russ.)
- Korolyuk E., Makunin A., Matveeva T. 2015. Relationships and generic delimitation of Eurasian genera of the subtribe Asterinae (Asteraceae, Asteraceae) using molecular phylogeny of ITS. — *Turkish J. Bot.* 39 (5): 808–824.
<https://doi.org/10.3906/bot-1410-12>
- Kotchoni S.O., Gachomo E.W. 2009. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants. — *Mol. Biol. Reports*. 36: 1633–1636.
<https://doi.org/10.1007/s11033-008-9362-9>
- Kotchoni S., Gachomo E., Jimenez-Lopez J. 2011. A plant cocktail amenable for PCR-based genetic analysis in *Arabidopsis thaliana*. — *Mol. Biol. Rep.* 38 (8): 5281–5284.
<https://doi.org/10.1007/s11033-011-0677-6>
- Krinitina A.A., Sizova T.V., Zaika M.A., Speranskaya A.S., Sukhorukov A.P. 2015. A rapid and cost-effective method for DNA extraction from archival herbarium specimens. *Biochemistry (Moscow)*. 80: 1478–1484.
<https://doi.org/10.1134/S0006297915110097>
- Liang H., Deng Y., Wang C., Xu X. 2015. A high-throughput DNA extraction method from rice seeds. — *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 30 (1): 32–35.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1088401>
- Lodhi M., Ye G., Weeden N., Reisch B. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. — *Plant Mol. Biol. Rep.* 12 (1): 6–13.
<https://doi.org/10.1007/BF02668658>
- Luro F., Laigret F. 1995. Preparation of high molecular weight genomic DNA from nuclei of woody plants. — *Biotechniques*. 19: 388–392.
- Malterud K.E. 1992. C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* fruit exudate. — *Acta Pharm. Nord.* 4: 65–68.
- Markman A.L. 1963. *Khimiya lipidov [Lipids Chemistry]*. V. 1. Zhirnye kisloty. Tashkent. 174 p. (In Russ.)
- Markman A.L. 1970. *Khimiya lipidov [Lipids Chemistry]*. V. 2. Tashkent. 223 p. (In Russ.)
- Martínez-Caballero S., Cano-Sánchez P., Mares-Mejía I., Díaz-Sánchez A.G., Macías-Rubalcava M.L., Hermoso J.A., Rodríguez-Romero A. 2014. Comparative study of two GH 19 chitinase-like proteins from *Hevea*

- brasiliensis*, one exhibiting a novel carbohydrate-binding domain. – *The FEBS J.* 281 (19): 4535–4554. <https://doi.org/10.1111/febs.12962>
- Michiels A., Van den Ende W., Tucker M., Van Riet L., Van Laere A. 2003. Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. – *Anal. Biochem.* 315 (1): 85–89.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. – *Nucleic Acids Res.* 16 (3): 1215. <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2F16.3.1215>
- Min J.H., Woo M.K., Yoon H.Y., Jang J.W., Wu J.H., Lim C.S., Kim Y.K. 2014. Isolation of DNA using magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid. – *Analyt. Biochem.* 447: 114–118. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.11.018>
- Murray M.G., Thompson W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. – *Nucleic Acids Res.* 8: 4321–4325. <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2F8.19.4321>
- Noorbakhsh H., Khorasgani M.R. 2022. Date (*Phoenix dactylifera* L.) polysaccharides: a review on chemical structure and nutritional properties. – *J. Food Meas. Charact.* 16 (4): 3240–3250. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01425-y>
- Ohlrogge J.B., Browse J., Somerville C.R. 1991. The genetics of plant lipids. – *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism.* 1082 (1): 1–26. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(91\)90294-R](https://doi.org/10.1016/0005-2760(91)90294-R)
- Parducci L., Bennett K.D., Ficetola G.F., Alsos I.G., Suyama Y., Wood J.R., Pedersen M.W. 2017. Ancient plant DNA in lake sediments. – *New Phytol.* 214 (3): 924–942. <https://doi.org/10.1111/nph.14470>
- Peterson D., Boehm K., Stack S. 1997. Isolation of milligram quantities of nuclear DNA from tomato (*Lycopersicon esculentum*), a plant containing high levels of polyphenolic compounds. – *Plant Mol. Biol. Rep.* 15 (2): 148–153. <https://doi.org/10.1007/BF02812265>
- Peterson J., Dwyer J. 1998. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Res.* 18(12): 1995–2018. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(98\)00169-9](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(98)00169-9)
- Popovici J., Bertrand C., Bagnarol E., Fernandez M.P., Comte G. 2008. Chemical composition of essential oil and headspace-solid microextracts from fruits of *Myrica gale* L. and antifungal activity. – *Nat. Product Res.* 22 (12): 1024–1032. <https://doi.org/10.1080/14786410802055568>
- Popovici J., Comte G., Bagnarol E., Alloisio N., Fournier P., Bellvert F., Bertrand C., Fernandez M.P. 2010. Differential effects of rare specific flavonoids on compatible and incompatible strains in the *Myrica gale*-*Frankia* actinorhizal symbiosis. – *Appl. Environ. Microb.* 76: 2451–2460. <https://doi.org/10.1128/aem.02667-09>
- Popovici J., Bertrand C., Jacquemoud D., Bellvert F., Fernandez M.P., Comte G., Piola F. 2011. An allelochemical from *Myrica gale* with strong phytotoxic activity against highly invasive *Fallopia x bohémica* taxa. – *Molecules.* 16 (3): 2323–2333. <https://doi.org/10.3390/molecules16032323>
- Procurier J.D., Xu J., Kasha K.J. 1990. A rapid and reliable DNA extraction method for higher plants. – *Barley Gene. Newslet.* 20: 74–75.
- Pyle M.M., Adams R.P. 1989. In situ preservation of DNA in plant specimens. – *Taxon.* 38 (4): 576–581. <https://doi.org/10.2307/1222632>
- Ribeiro R.A., Lovato M.B. 2007. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. – *Genet. Mol. Res.* 6: 173–187.
- Rittich B., Španová A. 2013. SPE and purification of DNA using magnetic particles. – *J. Sep. Sci.* 36 (15): 2472–2485. <https://doi.org/10.1002/jssc.201300331>
- Rodionov A.V., Gnutikov A.A., Kotsinyan A.R., Kotseruba V.V., Nosov N.N., Punina E.O., Rayko M.P., Tyupa N.B., Kim E.S. 2017. ITS1–5.8 S rDNA–ITS2 sequence in 35S rRNA genes as marker for reconstruction of phylogeny of grasses (Poaceae family). – *Biological Bulletin Rev.* 7: 85–102. <https://doi.org/10.1134/S2079086417020062>
- Rogers S., Bendich A. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. – *Plant Mol. Biol.* 5 (2): 69–76. <https://doi.org/10.1007/BF00020088>
- Rogers S., Bendich A. 1989. Extraction of DNA from plant tissues. – In: *Plant Molecular Biology Manual*. Springer. P. 73–83. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0951-9_6
- Rogers S.O., Bendich A.J. 1994. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. – In: *Plant Molecular Biology Manual*. P. 183–190. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0511-8_12
- Rosa G.P., Silva B.J., Seca A.M., Moujir L.M., Barreto M.C. 2020. Phytochemicals with added value from *Morella* and *Myrica* species. – *Molecules.* 25 (24): 6052. <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules25246052>
- Ryabushkina N.A., Omasheva M.E., Galiakparov N.N. 2012. Spetsifika vydeleniya DNK is rastitel'nykh ob'ektov [Specificity of DNA extraction from plants]. – *Biotekhnologia. Teoria i Praktika.* 2: 9–26. (In Russ.)
- Saiyed Z.M., Ramchand C.N., Telang S.D. 2008. Isolation of genomic DNA using magnetic nanoparticles as a solid-phase support. – *J. Physics: Condensed Matter.* 20 (20): 204153. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/20/20/204153>
- Sangwan R.S., Yadav U., Sangwan N.S. 2000. Isolation of genomic DNA from defatted oil seed residue of opium poppy (*Papaver somniferum*). – *Plant Mol. Biol. Rep.* 18: 265–270. <https://doi.org/10.1007/BF02823997>
- Savolainen V., Cuenoud Ph., Spichiger R., Martinez M.D.P., Crevecoeur M., Manen J.-F. 1995. The use of herbarium specimens in DNA phylogenetics: evaluation and improvement – *Plant Syst. Evol.* 197: 87–98. <https://doi.org/10.1007/BF00984634>
- Schmidt G. 1950. Nucleic acids, purines, and pyrimidines. – *Annu. Rev. Biochem.* 19 (1): 149–186.
- Sharma K., Lavanya M., Anjaiah V. 2000. A method for isolation and purification of peanut genomic DNA suitable for analytical applications. – *Plant Mol. Biol. Rep.*

- 18 (4): 393–393.
<https://doi.org/10.1007/BF02825068>
- Sika K.C., Kefela T., Adoukonou-Sagbadja H., Ahoton L., Saidou A., Baba-Moussa L., Baptiste L.J., Kotconi S.O., Gachomo E.W. 2015. A simple and efficient genomic DNA extraction protocol for large scale genetic analyses of plant biological systems. – *Plant Gene*. 1: 43–45.
<https://doi.org/10.1016/j.plgene.2015.03.001>
- Silva B.J., Seca A.M., Barreto M.D.C., Pinto D.C. 2015. Recent breakthroughs in the antioxidant and anti-inflammatory effects of *Morella* and *Myrica* species. – *Int. J. Mol. Sci.* 16 (8): 17160–17180.
<https://doi.org/10.3390%2Fijms160817160>
- Soltis P., Doyle J.J. 2012. *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing*. Springer Science & Business Media.
- Sylvestre M., Legault J., Dufour D., Pichette A. 2005. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. – *Phytomedicine*. 12: 299–304.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.12.004>
- Singha D.L., Tuteja N., Boro D., Hazarika G.N., Singh S. 2017. Heterologous expression of PDH47 confers drought tolerance in indica rice. – *Plant Cell Tissue Organ Culture (PCTOC)*. 130: 577–589.
<https://doi.org/10.1007/s11240-017-1248-x>
- Svoboda K.P., Inglis A., Hampson J., Galambosi B., Asakawa Y. 1998. Biomass production, essential oil yield and composition of *Myrica gale* L. harvested from wild populations in Scotland and Finland. – *Flavour Frag. J.* 13: 367–372.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199811/12\)13:6%3C367::AID-FFJ724%3E3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199811/12)13:6%3C367::AID-FFJ724%3E3.0.CO;2-M)
- Takahashi S., Nagano Y. 1984. Rapid procedure for isolation of plasmid DNA and application to epidemiological analysis. – *J. Clin. Microbiol.* 20 (4): 608–613.
<https://doi.org/10.1128/jcm.20.4.608-613.1984>
- Tapia-Tussell R., Quijano-Ramayo A., Rojas-Herrera R., Larque-Saavedra A., Perez-Brito D. 2005. A fast, simple, and reliable high-yielding method for DNA extraction from different plant species. – *Mol. Biotechnol.* 31 (2): 137–140.
<https://doi.org/10.1385/mb:31:2:137>
- Tel-zur N., Abbo S., Myslabodski D., Mizrahi Y. 1999. Modified CTAB Procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). – *Plant Mol. Biol. Rep.* 17 (3): 249–254.
<https://doi.org/10.1023/A:1007656315275>
- Teplova V.V., Isakova E.P., Klein O.I., Dergachova D.I., Gessler N.N., Deryabina Y.I. 2018. Natural polyphenols: Biological activity, pharmacological potential, means of metabolic engineering. – *Applied Biochemistry and Microbiology*. 54: 221–237.
<https://doi.org/10.1134/S0003683818030146>
- Vasanth Rupasinghe H.V. 2015. Application of NMR spectroscopy in plant polyphenols associated with human health. – In: *Applications of NMR Spectroscopy*. Bentham Science Publishers. P. 3–92.
<https://doi.org/10.1016/B978-1-60805-999-7.50001-X>
- Volkova E.A., Smagin V.A., Khramtsov V.N. 2021. Soobshchestva s *Myrica gale* L. na bolotakh poberezh'ya Finskogo zaliva (Sankt-Peterburg i Leningradskaya oblast) [Societies with *Myrica gale* L. in bogs on the edge of Finn Gulf (Saint-Petersburg and Leningrad District)]. – *Rastitel'nost Rossii*. 41: 58–74. (In Russ.)
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijmans M., Lee T.V.D., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23 (21): 4407–4414.
<https://doi.org/10.1093%2Fnar%2F23.21.4407>
- Wang Z., Megha S., Kebede B., Kav N.N.V., Rahman H. 2022. Genetic and molecular analysis reveals that two major loci and their interaction confer clubroot resistance in canola introgressed from rutabaga. – *Plant Genome*. 15 (3): e20241.
<https://doi.org/10.1002/tpg2.20241>
- Wei W., Zhang Y., Wang L., Li D., Gao Y., Zhang X. 2016. Genetic diversity, population structure, and association mapping of 10 agronomic traits in sesame. – *Crop Science*. 56 (1): 331–343.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2015.03.0153>
- Wink M. 2006. *An Introduction to Molecular Biotechnology: Molecular Fundamentals, Methods and Application in Modern Biotechnology*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 544 p.
- Ziegenhagen B., Guillemaut P., Scholz F. 1993. A procedure for mini-preparation of genomic DNA from needles of silver fir (*Abies alba*). – *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 117–121.
<https://doi.org/10.1007/BF02670469>