

УДК 06.01.00: 577.2

UDC 06.01.00: 577.2

06.01.00 Агрономия

Agronomy

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ПРОТОКОЛ ВЫДЕЛЕНИЯ РНК ИЗ ЗРЕЛЫХ ЛИСТЬЕВ ВИНОГРАДА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ОТ-ПЦР¹**A MODIFIED PROTOCOL OF RNA ISOLATION FROM MATURE LEAVES OF GRAPES FOR RT-PCR**

Сундырева Мария Андреевна
канд. с.-х. наук, с.н.с.
SPIN-код (РИНЦ):1353-4525

Sundyreva Mariya Andreevna
Cand. Agr. Sci., Senior Researcher
RSCI SPIN: 1353-4525

Степанов Илья Владимирович
м.н.с.
SPIN-код (РИНЦ): 3968-1982

Stepanov Ilya Vladimirovich
staff scientist
RSCI SPIN:1302-3070

Супрун Иван Иванович
канд. биол. наук, зав. лаб.
SPIN-код (РИНЦ): 7124-5304

Suprun Ivan Ivanovich
Cand. Biol. Sci., head of the laboratory
SPIN:7124-5304

Ушакова Яна Владимировна
канд. биол. наук, н.с.
SPIN-код (РИНЦ): 1107-6192
ФГБНУ Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, Россия, Краснодар, ул. 40-летия Победы, д. 39
e-mail: taurim2012@yandex.ru

Ushakova Yana Vladimirovna
Cand. Biol. Sci., Researcher
RSCI SPIN: 1107-6192
North-Caucasian Federal Research Center of Horticulture, Viticulture, Winemaking, Russia, Krasnodar, 40 let Pobedy, 39
e-mail: taurim2012@yandex.ru

Выделение высококачественной РНК из тканей многолетних древесных растений, в том числе и винограда, представляет большую сложность в связи с высоким содержанием фенольных соединений, вторичных метаболитов и полисахаридов и рибонуклеазной активностью разрушенных тканей. Большинство методов требуют больших временных или финансовых затрат, либо не дают воспроизводимого результата в случае работы со зрелыми тканями винограда. Был разработан протокол выделения на основе комбинирования и модификации известных методов экстракции РНК с учетом особенностей зрелых тканей винограда. Коммерческие наборы для выделения РНК из тканей растений показали невысокую эффективность экстракции РНК из зрелых тканей винограда, прежде всего связанную с «сортовой спецификой». Воспроизводимые результаты при экстрагировании РНК показывал СТАВ-метод, но он имел ряд недостатков: длительность и сложность обработки препарата РНК ДНК-азой. Разработанный метод основан на повышении концентрации меркаптоэтанола и поливинилпирролидона в экстрагирующем буфере, исключении этапа селективного осаждения РНК LiCl и замене его на осаждение на мембране на основе силики (SiO₂) с последующей обработкой ДНК-азой. Данные модификации в два раза сокращают временные затраты на выделение РНК и повышают чистоту препарата РНК от геномной ДНК в сравнении с

Isolation of high-quality RNA from the tissues of perennial woody plants, including woody grape vines, is very difficult due to the high content of phenolic compounds, secondary metabolites and polysaccharides and the ribonuclease activity of destroyed tissues. Most of the existing methods require either large time or financial costs, or do not give reproducible results in the case of RNA extraction from mature grape tissues. The modified isolation protocol is based on a combination and modification of the known RNA extraction methods, taking into account the characteristics of mature grape tissues. Existing commercial kits for the isolation of RNA from plant tissues showed a low efficiency of RNA extraction from mature grape tissues, primarily associated with "varietal specificity". Reproducible results in the extraction of RNA showed CTAB-method, however, it has several significant drawbacks associated with the duration of the extraction and the complexity of the processing of an RNA preparation with a DNAase. The developed method is based on increasing the concentration of mercaptoethanol and polyvinylpyrrolidone in the extraction buffer, eliminating the stage of RNA selective precipitation via LiCl, and replacing it with deposition on a silica-based membrane (SiO₂) followed by processing with DNA-ase. and increase the purity of the preparation of RNA from genomic DNA in comparison with the original method. A modified isolation protocol was developed based on a combination and modification of known

¹ Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-60154 мол-а-дк

исходной методикой. Данное решение позволяет получать воспроизводимые количество и качество РНК для последующего синтеза кДНК и RT-PCR

RNA extraction methods, taking into account the characteristics of mature grape tissues. This solution allows to obtain reproducible quantity and quality of RNA for the subsequent synthesis of cDNA and RT-PCR

Ключевые слова: VITIS VINIFERA L., ЗРЕЛЫЕ ТКАНИ, ВЫДЕЛЕНИЕ РНК, МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ПРОТОКОЛ

Keywords: VITIS VINIFERA L., MATURE TISSUES, RNA ISOLATION, MODIFIED ISOLATION PROTOCOL

Doi: 10.21515/1990-4665-143-012

Введение. Рибонуклеиновая кислота (РНК) является химически неустойчивым и подверженным нуклеазному разложению соединением. Множество методов экстракции часто не дают большого количества и высокого качества РНК вследствие ее деградации в процессе выделения [1]. Качество и количество РНК является критическим для исследования экспрессии генов, создания библиотек к ДНК, генетической инженерии и других. Выделение высококачественной РНК из тканей многолетних древесных растений, в том числе и винограда, представляет большую сложность в связи с высоким содержанием фенольных соединений, вторичных метаболитов и полисахаридов и рибонуклеазной активностью разрушенных тканей. Разнообразные фенольные соединения в большом количестве накапливаются в вегетативных и генеративных органах винограда с увеличением их возраста, при воздействии абиотических и биотических стрессов. Фенольные соединения, особенно проантоцианидины и танины, способны химически связываться с белками и нуклеиновыми кислотами при разрушении клеток, образуя высокомолекулярные комплексы [2]. Полисахариды соосаждаются спиртами вместе с нуклеиновыми кислотами, загрязняя пробу [3].

В классических условиях выделение нуклеиновых кислот из клеток и тканей производится в сильно денатурирующих и восстанавливающих условиях, при использовании расщепляющих протеины ферментов. Образующиеся фракции нуклеиновых кислот очищают экстракцией фенолом/хлороформом, и нуклеиновые кислоты выделяют из водной фазы путем диализа или преципитации этанолом [4]. Выделение РНК производится с ис-

пользованием детергентов, таких, как додецил сульфат натрия (SDS) или цетилтриметиламмоний бромид (СТАВ), органических растворителей (фенол и хлороформ и их смесей), восстанавливающих (β -меркаптоэтанол и дитиотреитол) и хаотропных (гуанидин изотиоцианат, перхлорат натрия и др.) агентов.

Авторами показано, что достаточно эффективным при выделении РНК из растительных тканей, богатых фенольными соединениями, является использование гуанидин изотиоцианата. Методы выделения РНК, основанные на сочетании гуанидин изотиоцианата и фенола, позволяют получить большое количество продукта высокого качества [3, 5, 6]. Данные методы экстракции ограничены в использовании в связи с высокой токсичностью применяемых реактивов. Также многими авторами показана их неэффективность в случае работы с тканями винограда. Недостатком указанных методов является низкий выход продукта и частое образование окрашенного, не растворимого в воде осадка, что приводит к невозможности дальнейшей работы с экстрактом [7, 8].

Использование детергентов (SDS и СТАВ) нашло широкое применение при выделении РНК из тканей многолетних растений. Применение SDS в 1% концентрации в составе экстракционного буфера показало хорошие результаты при экстракции РНК из листьев и ягод винограда, яблони, *Hevea brasiliensis*, *Dendrobium candidum* и др. [8, 9, 10, 11].

Для выделения РНК из различных тканей винограда и других, богатых указанными выше веществами многолетних растений, используются методы, являющиеся различными модификациями СТАВ-метода [7, 12, 13, 14, 15]

Хорошие результаты показало применение в составе экстрагирующего буфера антихаотропных агентов, например, NaCl [16]. Многими авторами испытаны комбинации описанных методов экстракции РНК [17].

Очистка РНК из общего экстракта производится селективным осаждением хлоридом лития (LiCl) или связыванием с твердым носителем (силика

(SiO₂) или специальные мембраны на ее основе, в присутствии хаотропного агента с дальнейшей обработкой ДНКазой от контаминирующей ДНК.

Большинство из этих методов требуют либо больших временных или финансовых затрат, либо не дают воспроизводимого результата в случае выделения РНК из зрелых тканей винограда. В связи с чем была поставлена задача создания модифицированного протокола выделения из зрелых тканей винограда, позволяющего получать воспроизводимые количество и качество РНК для последующего синтеза кДНК и RT-PCR. Для решения этой задачи был разработан протокол на основе комбинирования и модификации известных методов экстракции РНК.

Объекты и методы исследования. Материалом для работы послужили зрелые листья (с 6-го по 8-й от верхушки побега) двух сортов винограда: Восторг и Мускат белый. Растения, полученные *in vitro*, выращивались в горшках при 16-часовом световом дне и оптимальных условиях увлажнения. Сбор листьев осуществлялся с растений, достигших 60-дневного возраста. Собранные листья немедленно замораживались в жидком азоте, затем перетирались в пудру с жидким азотом и хранились при -80 °С до экстракции РНК.

Перед экстракцией РНК из листьев винограда подготавливали следующие растворы:

1. Буфер экстракции из набора для выделения РНК AurumTotalRNA MiniKit (BioRad, США) с добавлением β-меркаптоэтанола и поливинилпирролидона (ПВП) согласно рекомендациям производителя;
2. Буфер экстракции из набора для выделения РНК Aurum Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit (BioRad, США);
3. Буфер экстракции из набора для выделения РНК AurumTotalRNA MiniKit (BioRad, США) с увеличенной до 5% (v/v) концентрацией β-меркаптоэтанола и до 2,5 % (w/v) - ПВП;

4. Буфер экстракции, содержащий 2,5 % СТАВ (w/v), 2,5 % ПВП, 25мМ ЭДТА, 2,0 М NaCl, 100 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 5,0% β-меркаптоэтанол (v/v);

5. Буфер экстракции, содержащий 4М гуанидин тиоцианата, 0,2М ацетата натрия (pH 5,2), 25мМ ЭДТА, 1М ацетата калия (pH 7,5), 1% β-меркаптоэтанол (v/v), 2,5 % лаурилсаркозинат натрия (w/v) [17].

Остальные растворы: хлороформ/изоамиловый спирт – 24:1(Cl); 4 М NaCl; 10 М LiCl; TE буфер: 10 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА; 70 % этанол; 100 % изопропанол; Wash solution – растворы из набора Aurum Total RNA Mini Kit (Bio Rad, США) (WS); Elution solution – раствор из набора Aurum Total RNA Mini Kit (Bio Rad, США) (ES); Раствор NaI: 0,75 г Na₂SO₃, 36 г NaI в 40 мл деионизованной воды (NaI); промывочный раствор: 10 мМ Трис-HCl, 0,5 мМ ЭДТА, 50мМ NaCl, 50% этанола (ПР) [17]; DEPC-вода

В работе оценивались методы очистки РНК из тотального экстракта следующими способами:

1. На спин-колонках из набора Aurum Total RNA MiniKit (BioRad, США) с добавлением ДНКазы;

2. На частицах SiO₂ (силика). Подготовка силики осуществлялась следующим способом. 60 г частиц SiO₂ смешивали с 500 мл деионизованной воды, полученную смесь отстаивали 24 часа. После этого верхние 470 мл жидкости удаляли и приливали к оставшимся 30 мл смеси 500 мл деионизованной воды и хорошо смешивали. Через 5 часов отстаивания удаляли верхние 440 мл жидкости. Оставшуюся смесь подкисляли HCl до pH 2,0, автоклавировали и хранили в темноте при комнатной температуре [17].

3. Селективным осаждением LiCl.

Экстракцию проводили шестью различными методами.

1). По протоколу, описанному Tong Zh с соавторами (2012) [18] с модификациями. Образцы (0,4-1,0 г) растирают в жидком азоте. Замороженная пудра переносится в 2,0 мл микроцентрифужные пробирки, содержащие 900 μl экстракционного буфера 4, предварительно нагретого до 65 °C на водяной

бане. Образцы смешиваются с буфером на вортексе и инкубируются при 65 °С в течение 30 мин с периодическим перемешиванием на вортексе. Пробирки охлаждают до комнатной температуры и добавляют эквивалентный объем СІ в каждую, хорошо перемешивают, переворачивая пробирку, и центрифугируют при 16000g 8 мин при 4 °С. Экстрагирование СІ проводят еще два раза. После центрифугирования водную фазу переносят в чистые пробирки и последовательно добавляют эквивалентные объемы 4М NaCl и предварительно охлажденного изопропилового спирта, смешивая растворы после каждого добавления. Нуклеиновые кислоты осаждаются в течение 1 часа при -20°С. Затем производится центрифугирование при 16000g 40 мин при 4 °С. Надосадочная жидкость отбрасывается, а осадок растворяется в 600 µl TE буфера. Селективное осаждение РНК производится добавлением 10 М LiCl до финальной концентрации 3М. Образцы ставят на ночь в холодильник +4°С. На следующий день РНК осаждают центрифугированием при 16000g 1 час при 4 °С. Надосадочную жидкость аккуратно сливают. Осадок отмывают ледяным 70% этанолом. Спирт удаляют, высушивают осадок на воздухе и ресуспендируют в соответствующем объеме буфера ES или DEPC воды. Все образцы РНК обрабатываются DNase согласно рекомендациям производителя.

2а) По протоколу, описанному выше, но без этапа осаждения LiCl. Для этого после осаждения нуклеиновых кислот с 4М NaCl и изопропиловым спиртом и центрифугирования осадок растворяют в TE буфере с добавлением 0,7 М NaCl и 0,5 мл холодного изопропанола и наносят на спин-колонку (Bio Rad, США) с добавлением ДНКазы. Промывка мембраны осуществляется промывочными буферами WS (Bio Rad, США) согласно рекомендациям производителя.

2б) Аналогично пункту 2а, но в качестве промывочного использовали раствор ПР.

3). Выделение осуществляли набором для экстракции РНК Aurum Total RNA Mini Kit (Bio Rad, США) согласно рекомендациям производителя.

4). Выделение осуществляли набором для экстракции РНК Aurum Total RNA Mini Kit (Bio Rad, США) согласно рекомендациям производителя, но с увеличением концентрации ПВП до 2,5 % и меркаптоэтанола до 5 % в пробе.

5). Выделение РНК осуществляли как описано в п.п. 4, но проводили дополнительную инкубацию образца с экстрагирующим буфером 30 мин при 65 °С.

6). Навеску образца 0,3 г гомогенизируется с 350 μ л буфера 5. Образцы инкубируются 10 минут при 70°С и охлаждаются на льду 5 минут. После этого производится центрифугирование 10 минут при 13000 об/мин. Супернатант переносится в чистую пробирку, содержащую 150 μ л 96 % этанола, 300 μ л NaI, 25 μ л SiO₂ и проводится 10-минутная инкубация на шейкере. Центрифугируют одну минуту на 6000 об/мин, надосадочная жидкость отбрасывается, а к осадку добавляют 500 μ л раствора 15. Осадок хорошо перемешивается и центрифугируется 1 минуту на 6000 об/мин. Отмывка повторяется еще один раз, супернатант тщательно удаляется, а осадок просушивается на воздухе и ресуспендируется с 50 μ л деионизованной воды, инкубируется 5 минут при 70 °С, центрифугируется 3 минуты на 13000 об/мин. Надосадочная жидкость отбирается в чистые пробирки и хранится при -70 °С [17].

Чистота РНК оценивалась при измерении оптической плотности раствора при 230, 260, 280 нм на нанофотометре IMPLEN NP 80 (США). Соотношение экстинкции при 260 и 230 нм и 260 и 280 нм близкое к 2 у препарата РНК свидетельствовало о его чистоте. Препарат РНК наносили на 2% агарозный гель и проводили электрофорез для оценки целостности выделенной РНК. Визуализация окрашенной бромистым этидием тотальной РНК проводилась в ультрафиолетовом свете.

На основе выделенных препаратов тотальной РНК был осуществлен синтез кДНК. Концентрация реагентов смеси: тотальная РНК – 1 мкг,

олиго(dT)18 – 100 pmol, dNTP – 0,5 mM, 1xRT Buffer, Maxima H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, США) – 100 ед. Синтез кДНК проходил согласно рекомендациям производителя при температуре 50 °С 30 минут. Инактивация проходила 5 минут при 85 °С.

ПЦР проводилась по кДНК генов актина и липоксигеназы. Последовательности использованных в работе праймеров: гена липоксигеназы (LOX) - прямой CTG-GGT-GGC-TTC-TGC-TCT-C, обратный CAG-GGT-CCA-TTC-AGG-AGT-GT; гена актина – прямой TGC-TAT-CCT-TCG-TCT-TGA-CCT-TG, обратный GGA-CTT-CTG-GAC-AAC-GGA-ATC-TC. Концентрация реагентов смеси: кДНК – 2 мкл, dNTP – 0,1 mM, 1x Buffer, Праймеры – 0,32 pmol/ml, Таq полимераза («Синтол», Россия) – 1 ед.

Этапы реакции: начальная денатурация 95 °С 2 минуты. 25 циклов: денатурация 95 °С 20 секунд; отжиг праймеров 30 секунд (50 °С для LOX; 57 °С для Актина); элонгация 72 °С 40 секунд. Финальная элонгация 72 °С 3 минуты.

Результаты и обсуждение. В работе были испытаны наиболее распространенные методы экстракции РНК: коммерческим набором Aurum Total RNA Mini Kit (BioRad, США), при помощи детергентов (СТАВ), смеси фенола и гуанидин изотиоционата Pure ZOL (аналог TRIZOL) (набор Aurum Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit, BioRad, США), гуанидин изотиоционата и очистки различными способами.

Простая и быстрая экстракция РНК из зрелых листьев винограда двух разных сортов (Восторг и Мускат белый) коммерческим набором Aurum Total RNA MiniKit (BioRad, США) показала, что из листьев одного сорта РНК выделяется нормально, а из листьев другого – нет (рис. 1). Таким образом, существует выраженная «сортовая специфика» в отношении сохранности РНК в процессе экстракции из зрелых листьев винограда, что влечет за собой необходимость поиска метода, решающего данную проблему.

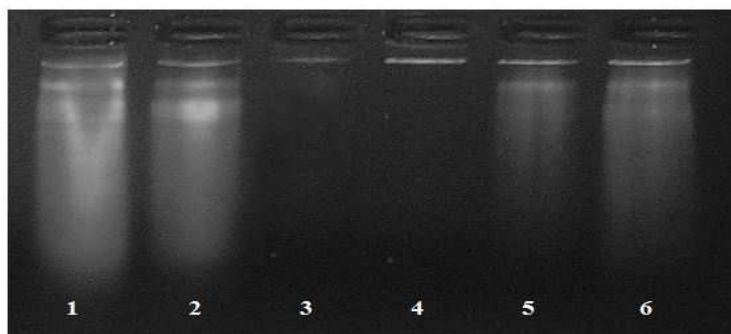


Рисунок 1 – Электрофореграмма РНК из зрелых листьев сортов Восторг (1,2,5,6) и Мускат белый (3-4) в 2% агарозном геле. Экстракция набором Aurum Total RNA Mini Kit (Bio Rad, США)

Для поиска наиболее эффективного метода экстракции из зрелых листьев винограда нами были испытаны описанные выше методы на сорте Мускат белый, характеризующимся трудным извлечением РНК.

Извлечение РНК из листьев винограда набором Aurum Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit (BioRad, США) на основе смеси фенола и гуанидин изотиоционата приводило к образованию полностью нерастворимого бурого осадка и невозможности дальнейшей работы с экстрактом, что согласуется с исследованиями Li et al. [19]. Экстракция РНК методом б привела к получению образца низкого качества. Shu et al. при экстрагировании РНК модифицированными Trizol методами получили вязкую, трудно растворимую субстанцию, выход и качество РНК при этом были очень низкими (табл. 1) [20].

Таблица 1 - Оценка качества и выхода РНК из листьев винограда

Вариант	260/280	260/230	Выход РНК, мкг/мл
1	1,83	2,20	618,2
2 а	2,03	2,13	580,0
2 б	1,79	2,07	61,6
3	1,97	2,15	43,4
4	1,97	2,23	290,4
5	-	-	-
6	1,63	2,23	262,6

Применение детергентов в качестве лизирующего агента позволяет ингибировать РНКазы и получить РНК высокого качества. В нашей работе наилучшие результаты были получены при экстракции РНК методами 1 и 2. Аналогичные результаты были получены другими авторами [11, 21].

Наибольшее количество РНК удалось получить с помощью метода 1, а наименьшее – с помощью метода 5. Чистота выделенной РНК во всех случаях, кроме экстракции методом 6, была достаточно высокой. Преимуществами экстракции РНК из растительных тканей методом 1 является возможность обработки большого количества материала и, как результат, высокий выход РНК. Однако, выделение РНК занимает 2 дня, что осложняет работу исследователя при большом количестве образцов. Для сокращения времени экстракции переосаждение РНК LiCl нами было заменено на использование спин-колонок (BioRad, США). Такая модификация позволила сократить время экстракции в 2 раза, при этом выход РНК оставался на высоком уровне, а чистота препарата повысилась. Применение спин-колонок также облегчает обработку препарата РНК ДНК-азой от примеси геномной ДНК.

Экстракция РНК методом 3 (Aurum Total RNA Mini Kit (Bio Rad, США) являлась наименее трудоемкой, однако, приводила к крайне нестабильному результату. Поэтому было принято решение модифицировать предложенный производителем протокол, увеличив содержание ПВП в буфере, что обеспечило бы связывание фенольных соединений, которыми богаты зрелые вегетативные органы винограда [22], а также увеличить концентрацию β -меркаптоэтанола для эффективного ингибирования РНКаз (метод 4). Такие модификации позволили увеличить выход РНК почти в 7 раз. 30-минутное прогревание образца при экстракции методом 5 привело к полной потере РНК (рис. 2).

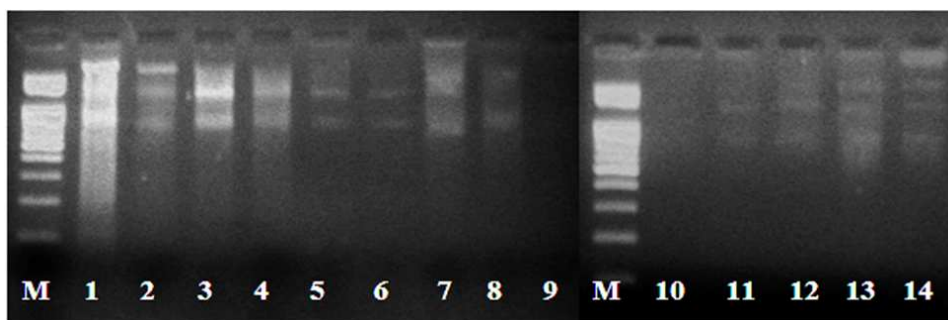


Рисунок 2 – Электрофореграмма образцов тотальной РНК

М – маркер; 1– 2 – согласно протоколу экстракции РНК 1; 3-4 – согласно протоколу экстракции РНК 2а; 5-6 – согласно протоколу экстракции РНК 2б; 7-8 – согласно протоколу экстракции РНК 4; 9-10 – согласно протоколу экстракции РНК 5; 11-12 – согласно протоколу 3; 13-14 – согласно протоколу экстракции РНК 6.

На электрофореграмме образцов тотальной РНК было выявлено различное качество выделенных препаратов, наилучшими показателями обладали препараты РНК, выделенные согласно протоколу 1 и 2а.

Так же качество выделенных препаратов РНК проверялось по уровню амплификации кДНК генов актина и липоксигеназы (рис. 3, 4). Наиболее яркие бэнды по двум маркерам соответствовали протоколам экстракции РНК 1 и 2а. Достаточно яркие бэнды по маркерам актина и липоксигеназы были выявлены при экстракции РНК по способу 4.

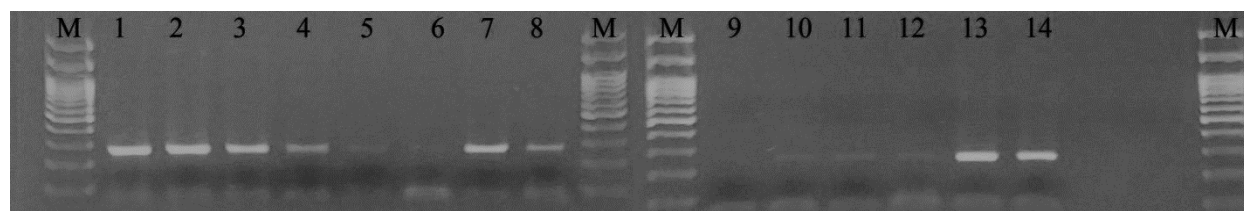


Рисунок 3 – Результаты ПЦР по кДНК гена актина

М – маркер; 1– 2 – согласно протоколу экстракции РНК 1; 3-4 – согласно протоколу экстракции РНК 2а; 5-6 – согласно протоколу экстракции РНК 2б;

7-8 – согласно протоколу экстракции РНК 4; 9-10 – согласно протоколу экстракции РНК 5; 11-12 – согласно протоколу 3; 13-14 – согласно протоколу экстракции РНК 6.

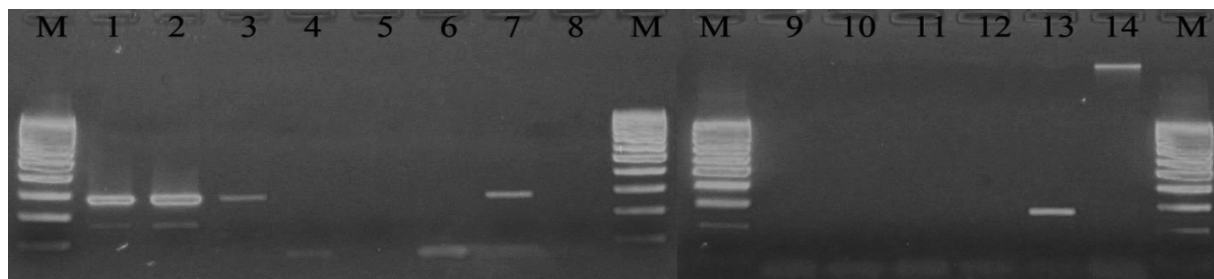


Рисунок 4 - Результаты ПЦР по кДНК гена липоксигеназы

М – маркер; 1– 2 – согласно протоколу экстракции РНК 1; 3-4 – согласно протоколу экстракции РНК 2а; 5-6 – согласно протоколу экстракции РНК 2б; 7-8 – согласно протоколу экстракции РНК 4; 9-10 – согласно протоколу экстракции РНК 5; 11-12 – согласно протоколу 3; 13-14 – согласно протоколу экстракции РНК 6.

Заключение. Согласно оценке качества полученной кДНК и результатам ПЦР-анализа, наиболее оптимальными методиками выделения РНК из зрелых листьев винограда являются 1, 2а, 4. Методика 4 наиболее эффективна в отношении временных затрат, но в то же время является самой дорогостоящей, в связи с чем трудно применима при большом количестве образцов. Выделение РНК методикой 1 позволяет получить препараты РНК с высокими качественными и количественными показателями, но требует двух дней на один цикл экстракции. Методика 2а обеспечивает однодневный цикл экстракции, хотя и значительно более трудоемкий в сравнении с готовыми коммерческими наборами, стоимость процедур в сравнении с методикой 4 сокращается в четыре раза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nwokeoji A.O., Kilby P.M., Portwood D.E., Dickman M.J. RNA Swift: a rapid, versatile RNA extraction method free from phenol and chloroform // *Analytical Biochemistry*, 2016. - doi: 10.1016/j.ab.2016.08.001
2. Newbury H.J., Possingham J. Factors affecting the extraction of intact ribonucleic acid from plant tissues containing interfering phenolic compounds // *Plant Physiol.*, 1977. - V 60. - P. 543-547
3. Salzman R.A., Fugita T., Zhu-Salzman K., Hasewaga P.M., Bressan R.A. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high level of phenolic compounds or carbohydrates // *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1999. - V. 17. - P. 11-17
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование., 1984. - 479 с.
5. Chomczynski P., Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction // *Analytical Biochemistry*, 1987. - V. 162. - P. 156-159
6. Gehrig H.H., Winter K., Cushman J., Borland A., Taybi T. An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides // *Plant molecular biology reporter*, 2000. - V. 18. - P. 369-376
7. Zeng Y., Yang T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides // *Plant molecular biology reporter*, 2002. - V. 20
8. Tesnier C., Vayda M. Method for the isolation of high quality RNA from berry tissues without contaminating tannins or carbohydrates // *Plant molecular biology reporter*, 1991. - V. 9. - P. 242-251
9. Moser C., Gatto P., Moser M., Pindo M., Velasco R. Isolation of functional RNA from small amounts from different grape and apple tissues // *Molecular biotechnology*, 2004. - V. 26. - P. 95-99
10. Tang Ch., Qi J., Li H., Zhang C., Wang Yu. A convenient and efficient protocol for isolating high quality RNA from latex of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree) // *J. Biochem. Biophys. Methods.*, 2007. - V. 70. - P. 749-754
11. Wanqian L., Bochu W., Chuanren D., Biao L. A method for isolating functional RNA from callus of *Dendrobium candidum* containing rich polysaccharides // *Colloids and surfaces B: Biointerfaces.*, 2005. - V. 42. - P. 259-262
12. Gambino G., Perrone I., Gribaudo I. A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapes and other woody plants // *Phytochem. Anal.*, 2008. - V.19. - P. 520-525
13. Tong Zh., Qu Sh., Zhang J., Wang F., Tao J., Gao Zh., Zhang Zh. A modified protocol for RNA extraction from different peach tissues suitable for gen isolation and real-time PCR analysis // *Mol. Biotechnol.*, 2012. - V 50. - P. 229-236
14. Reid K., Olsson N., Schlosser J., Peng F., Lund S. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development // *BMC Plant Biology*, 2006. - doi: 10.1186/1471-2229-6-27
15. Liao Zh., Chen M., Guo L., Gong Y., Tang F., Sun X., Tang K. Rapid isolation of high-quality total RNA from *Taxus* and *Ginkgo* // *Preparative biochemistry and biotechnology*, 2004. - V. 34. - № 3. - P. 209-214
16. Хиллебранд Т., Бендцко П. Композиция и способ для выделения нуклеиновых кислот из комплексных материалов с применением антихаотропной соли. Патент № 2241004 от 27.11.2004

17. Rott, M.E., Jelkmann, W. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol // *Eur. J. Plant Pathol.*, 2001. - V. 107. - P. 411-420.
18. Tong Zh., Qu Sh., Zhang J., Wang F., Tao J., Gao Zh., Zhang Zh. A modified protocol for RNA extraction from different peach tissues suitable for gen isolation and real-time PCR analysis // *Mol. Biotechnol.*, 2012. - V. 50. - P. 229-236
19. Li J., Tang CH., Song C.Y., Chen M.J., Feng Z.Y., Pan Y.J. A simple, rapid and effective method for total RNA extraction from *Lentinula edodes* // *Biotechnol. Lett.*, 2006. - V.28. - P. 1193-1197
20. Shu C., Sun. S., Chen J., Chen J., Zhou E. Comparison of different methods for total RNA extraction from sclerotia of *Rhizoctonia solani* // *Electronic Journal of Biotechnology*, 2014. - V. 17. - P. 50-54
21. Argumedo-Delira R., Gonzales-Mendoza D., Alarcon A. A rapid and versatile method for the isolation of total RNA from the filamentous fungus *Trichoderma* sp // *Ann. Microbiol.*, 2008. -V. 58. - P. 761-763
22. Latouche G., Bellow S., Poutaraud A., Meyer S., Cerovic Z. Influence of constitutive phenolic compounds on the response grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves to infection by *Plasmopara viticola* // *Planta*, 2013. - V. 237. - P. 351-361

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (ТРАНСЛИТЕРАЦИЯ)

1. Nwokeoji A.O., Kilby P.M., Portwood D.E., Dickman M.J. RNA Swift: a rapid, versatile RNA extraction method free from phenol and chloroform // *Analytical Biochemistry*, 2016. - doi: 10.1016/j.ab.2016.08.001
2. Newbury H.J., Possingham J. Factors affecting the extraction of intact ribonucleic acid from plant tissues containing interfering phenolic compounds // *Plant Physiol.*, 1977. - V 60. - P. 543-547
3. Salzman R.A, Fugita T., Zhu-Salzman K., Hasewaga P.M., Bressan R.A. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high level of phenolic compounds or carbohydrates // *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1999. - V. 17. - P. 11-17
4. Maniatis T., Fritsch E.H., Sambrook J. *Metody geneticheskoy inzhenerii. Molekulyarnoe klonirovanie*, 1984. - 479 s.
5. Chomczynski P., Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction // *Analytical Biochemistry*, 1987. - V. 162. - P. 156-159
6. Gehrig H.H., Winter K., Cushman J., Borland A., Taybi T. An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides // *Plant molecular biology reporter*, 2000. - V. 18. - P. 369-376
7. Zeng Y., Yang T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides // *Plant molecular biology reporter*, 2002. - V. 20
8. Tesnier C., Vayda M. Method for the isolation of high quality RNA from berry tissues without contaminating tannins or carbohydrates // *Plant molecular biology reporter*, 1991. - V. 9. - P. 242-251
9. Moser C., Gatto P., Moser M., Pindo M., Velasco R. Isolation of functional RNA from small amounts from different grape and apple tissues // *Molecular biotechnology*, 2004. -V. 26. - P. 95-99
10. Tang Ch., Qi J., Li H., Zhang C., Wang Yu. A convenient and efficient protocol for isolating high quality RNA from latex of *Hevea brassilensis* (para rubber tree) // *J. Biochem. Biophys. Methods.*, 2007. - V. 70. - P. 749-754

11. Wanqian L., Bochu W., Chuanren D., Biao L. A method for isolating functional RNA from callus of *Dendrobium candidum* contented rich polysaccharides // *Colloids and surfaces B: Biointerfaces.*, 2005. - V. 42. - P. 259-262
12. Gambino G., Perrone I., Gribaudo I. A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapes and other woody plants // *Phytochem. Anal.*, 2008. - V.19. - P. 520-525
13. Tong Zh., Qu Sh., Zhang J., Wang F., Tao J., Gao Zh., Zhang Zh. A modified protocol for RNA extraction from different peach tissues suitable for gen isolation and real-time PCR analysis // *Mol. Biotechnol.*, 2012. - V 50. - P. 229-236
14. Reid K., Olsson N., Schlosser J., Peng F., Lund S. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development // *BMC Plant Biology*, 2006. - doi: 10.1186/1471-2229-6-27
15. Liao Zh., Chen M., Guo L., Gong Y., Tang F., Sun X., Tang K. Rapid isolation of high-quality total RNA from *Taxus* and *Ginkgo* // *Preparative biochemistry and biotechnology*, 2004. - V. 34. - № 3. - P. 209-214
16. Hillebrand T., Bendcko P. Kompoziciya i sposob dlya vydeleniya nukleinovyh kislot iz kompleksnyh materialov s primeneniem antihotropnoj soli. Patent № 2241004 ot 27.11.2004
17. Rott, M.E., Jelkmann, W. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol // *Eur. J. Plant Pathol.*, 2001. - V. 107. - P. 411-420.
18. Tong Zh., Qu Sh., Zhang J., Wang F., Tao J., Gao Zh., Zhang Zh. A modified protocol for RNA extraction from different peach tissues suitable for gen isolation and real-time PCR analysis // *Mol. Biotechnol.*, 2012. -V 50. - P. 229-236
19. Li J., Tang CH., Song C.Y., Chen M.J., Feng Z.Y., Pan Y.J. A simple, rapid and effective method for total RNA extraction from *Lentinula edodes* // *Biotechnol. Lett.*, 2006. - V.28. - P. 1193-1197
20. Shu C., Sun. S., Chen J., Chen J., Zhou E. Comparison of different methods for total RNA extraction from sclerotia of *Rhizoctonia solani* // *Electronic Journal of Biotechnology*, 2014. - V. 17. - P. 50-54
21. Argumedo-Delira R., Gonzales-Mendoza D., Alarcon A. A rapid and versatile method for the isolation of total RNA from the filamentous fungus *Trichoderma* sp // *Ann. Microbiol.*, 2008. -V. 58. - P. 761-763
22. Latouche G., Bellow S., Poutaraud A., Meyer S., Cerovic Z. Influence of constitutive phenolic compounds on the response grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves to infection by *Plasmopara viticola* // *Planta*, 2013. - V. 237. - P. 351-361