

УДК 634.8

UDC 634.8

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ЛИСТЬЕВ *VITIS VINIFERA L.***EXTRACTION OF DNA FROM LEAVES OF *VITIS VINIFERA L.***

Звягин Андрей Сергеевич
к. б. н., старший научный сотрудник

Zvyagin Andrey Sergeevich
Cand.Biol.Sci., senior researcher scientists

Трошин Леонид Петрович
д. б. н., профессор
Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, Россия

Troshin Leonid Petrovich
Dr. Sci. Biol., professor
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Экстрагирование ДНК из листьев растений рода *Vitis* является сложной задачей, так как в винограде содержатся вещества, затрудняющие ее использование в молекулярно-генетических исследованиях. В работе были использованы усовершенствованные методы выделения ДНК с частицами силики (SiO_2) в качестве абсорбента, позволяющие улучшить качество и скорость работы

Extraction of the DNA from leaves of genus *Vitis* is a very difficult task, as a grape has a lot of elements, which make difficult to use it in the genetic manipulation. In that article used the methods of extraction of the DNA with silica (SiO_2) particles as the absorbent material for getting better quality DNA

Ключевые слова: ВИНОГРАД, ПОДВИДЫ, ДНК, SDS, СИЛИКА, СТАБ-МЕТОДЫ, ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ

Keywords: GRAPES, SUBSPECIES, DNA, SDS, HERBARIUM LEAVES, VARIABILITY, STAB-METHODS, GENETIC DIVERSITY

Введение

Виноградное растение является одним из наиболее привлекательных объектов с точки зрения изучения генетики [16]. Одним из условий его использования для молекулярных исследований является экстрагирование ДНК.

Общей проблемой высших растений при выделении ДНК являются загрязняющие вещества, у винограда - это присутствие повышенного содержания полисахаридов [13, 15, 25] и полифенолов [9, 10, 20, 21]. В процессе экстрагирования ДНК образуется коллоидная гиалосома, которая практически не растворима в водной среде или ТЕ-буфере (10 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 1 мМ EDTA).

В дальнейшей работе это влияет на использование ДНК в исследованиях путем угнетения энзимной активности реакции [8]. Также ДНК из выделенных образцов становится не стабильной для длительного хранения [23, 33].

В настоящее время опробовано несколько протоколов по выделению ДНК и удалению полисахаридов из разнообразных источников [3, 7, 11, 14, 18, 22, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 40].

Однако, у плодово-ягодных культур, содержащих высокий уровень полисахаридов, таких как рода *Vitis*, существующие протоколы имеют некоторые ограничения, поэтому их можно использовать при определенных условиях и данная ДНК не всегда амплифицируема в методах полимеразной цепной реакции, секвенирования и других манипуляциях. Присутствие различных ингибиторов в растворе вызывает угнетение ДНК-полимеразной активности [5].

Большинство методов экстрагирования ДНК оптимизированы для простоты и скорости, в то время как другие приспособлены к качественному и количественному анализу. Каждая техника применяется в различных исследованиях и к различным организмам. Поэтому важно проверять и приспосабливать методы экстрагирования для нужд исследователя.

В настоящее время активно используют для выделения ДНК из растений методы с раствором мелкодисперсного оксида кремния «силики» при выделении из агарозных гелей [6, 39], микроорганизмов [2, 24], почв [28, 38] и некоторых эукариот [4, 19, 37].

Эти методы продемонстрировали, что ДНК, выделенная с использованием раствора оксида кремния, может быть использована для проведения ПЦР реакции [17, 38] и других манипуляций с ДНК [37].

В данной работе приводятся усовершенствованные протоколы, комбинирующие различные аспекты обоих предыдущих методов экстракции, а именно методов с использованием раствора СТАБ (цетилтриметиламониум бромид) и с раствором сорбента оксида кремния.

Данное исследование показывает, что извлечение ДНК не всегда является простым и рутинным делом, и что опубликованные протоколы не

обязательно являются воспроизводимыми для всех видов растений [29, 35].

Цель исследования - оценка разнообразных методов выделения ДНК, экстрагированной из разных материалов и определение ее качества для молекулярно-генетических исследований винограда.

Задачами являлось определить, какой из трех общих методов выделения ДНК (СИЛИКА-МЕТОД № 1, СИЛИКА-МЕТОД № 2 и SDS-МЕТОД), позволяет выделять ДНК из виноградных листьев и какая стадия развития виноградного растения является наиболее пригодной для их сбора.

Материалы и методы

Виноградные образцы были собраны на территории Северного Кавказа. Тестировались два подвида: культурный виноград *V. vinifera subsp. sativa* D.C. и его дикий предок *V. vinifera subsp. silvestris* Gmel. (200 образцов).

Листья были собраны в разные сроки (молодые, взрослые и высушенные), однолетние и шестилетние (замороженные) и гербарные образцы. Для сравнения количества ДНК по разным методам использовали одно и то же количество для каждого образца – 1 г для свежего материала, для гербарных листьев количество пробы было уменьшено до 0,1-0,5 г [19].

1. СИЛИКА-МЕТОД № 1 [36].

Растворы для выделения:

- Экстракционный буфер: 10 г СТАВ (цетилтриметиламониум бромид); 140 мл 5 М NaCl; 25 мл 2 М Tris-HCl (pH 8); 20 мл 0.5 М EDTA (pH 8). Доводим до объема в 500 мл чистой водой и проавтоклавировать.

- Раствор силики: смешать 1 часть частиц силики (Sigma S-5631) с 1 частью (к объему) стерилизованной воды (1 г–к–1 мл). Все приготовления проводить под вытяжкой. Тщательно перемешать и оставить на 12-24 ч. Затем вылить верхнюю жидкую фазу, нижний раствор с частицами оксида кремния «силики» повторно разбавить с аналогичным количеством воды, которая была добавлена в начале процесса приготовления. Перемешать на вортексе и дать отстояться в течение 5-10 ч, вылить верхнюю жидкую фазу и удалить остаток воды путем испарения. Повторить процедуру с добавлением воды и ее удаления из частиц;

Промывочный буфер: 25% изопропанол; 25% этанол; 100 мМ NaCl; 10 мМ Tris-HCl (pH 7.4); 2 мМ EDTA (pH 8); довести до 100% объема чистой водой и проавтоклавировать;

- 5 М NaCl;
- 70% этанол;
- 5 М NaCl;
- Изопропанол;
- Рибонуклеаза А (Sigma R9009: 10 мг/мл).
- TE-буфер: 10 мМ Tris-HCl и 1 мМ EDTA, pH 8.0 и проавтоклавировать.

Протокол выделения

1) Добавить 1200 мл экстракционного буфера (добавить 0,2% β-меркаптоэтанола только перед использованием) и 2 мкл рибонуклеазы А к растительному материалу и перемешать на вортексе.

2) Инкубировать при 37° С от 5 мин. до 10 часов.

3) Добавить 500 мл хлороформа: спирт и перемешать тщательно 20-25 мин.

4) Отцентрифугировать при 6000 оборотах 15 мин. при комнатной температуре.

5) Перенести верхнюю фазу в новую пробирку.

- 6) Добавить 200–800 мкл раствора с частицами оксида кремния и перемешивать в течение 5 мин. по часовой стрелке.
- 7) Отцентрифугировать при максимальных оборотах в течение 1 мин.
- 8) Удалить супернатант аккуратно.
- 9) Промыть промывочным буфером путем добавления 1000 мл.
- 10) Отцентрифугировать при максимальных оборотах в течение 1 мин.
- 11) Удалить супернатант аккуратно.
- 12) Повторить шаги 9, 10 и 11.
- 13) Высушить в течение 37° С 3 мин. и перевернуть пробирки для легкого высушивания.
- 14) Растворить белый осадок в 400 мкл TE.
- 15) Инкубировать 68° С в течение 15 мин.
- 16) Отцентрифугировать при максимальных оборотах в течение 1 мин. и перенести супернатант в новую пробирку.
- 17) Промыть ДНК путем добавления 0.1 объема 5 М NaCl; затем добавить к общему объему 60% изопропанола.
- 18) Перемешать 1 мин., отцентрифугировать при максимальных оборотах в течение 1 мин., удалить супернатант.
- 19) Промыть осадок 70% этанолом.
- 20) Отцентрифугировать при максимальных оборотах в течение 1 мин. и вылить супернатант.
- 21) Определить качество ДНК на спектрофотометре при длине волны A260.
- 22) Положить при -70° С на длительный период хранения и -20° С на короткий период хранения.

2. СИЛИКА-МЕТОД № 2, модифицированный под виноградную культуру кафедрой виноградарства КубГАУ.

Растворы для выделения:

- Экстракционный буфер: 2 мМ Tris-HCl (pH 8,0); 20 мМ; 20 мМ EDTA (pH 8,0) и 5 М гуанидиний тиоционат. Довести до необходимого объема и проавтоклавировать [2, 37];

- Раствор силики: смешать 1 часть частиц силики (Sigma S-5631) с 1 частью (к объему) стерилизованной воды (1 г–к–1 мл). Все приготовления проводить под вытяжкой. Тщательно перемешать и оставить на 12-24 ч. Затем вылить верхнюю жидкую фазу, нижний раствор с частицами силики заново разбавить с аналогичным количеством воды, которая была добавлена в начале процесса приготовления. Перемешать на вортексе и дать отстояться в течение 5-10 ч, вылить верхнюю жидкую фазу и удалить остаток воды путем испарения. Повторить процедуру с добавлением воды и ее удаления из частиц;

- Промывочный буфер I (силика 1): 50 мМ CH₃COONa (pH 5,2); 20 мМ EDTA (pH 8); 5 М гуанидиний тиоционат или гидрохлорид; довести до 100% объема чистой водой и проавтоклавировать;

- Промывочный буфер II (силика 2): 25% изопропанол; 25% этанол; 100 мМ NaCl; 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0); 2 мМ EDTA (pH 8,0); довести до 100% объема чистой водой и проавтоклавировать;

- CH₃COONa (pH 5,2);

- Изопропанол;

- TE-буфер: 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0) и 1 мМ EDTA (pH 8,0). Раствор проавтоклавировать.

Протокол выделения

- 1) К размолотому в жидком азоте растительному материалу добавить 1000 мл экстракционного буфера.

- 2) Инкубировать при 37° С от 5 до 10 мин.

- 3) Отцентрифугировать при 12000 оборотах 3 мин. при комнатной температуре.
- 4) Перенести верхнюю фазу в новую пробирку.
- 5) Добавить 4–5 мкл раствора с частицами силики и 25-30 мкл CH_3COONa перемешивать в течение 5 мин. по часовой стрелке.
- 6) Отцентрифугировать при 12000 оборотах в течение 10 сек.
- 7) Удалить супернатант аккуратно.
- 8) Промыть раствором силики 1 путем добавления 500-700 мл.
- 9) Перемешать его на вортексе в течение 1 мин.
- 10) Отцентрифугировать при 12000 оборотах в течение 10 сек.
- 11) Удалить супернатант аккуратно, не выливая белый осадок.
- 12) Повторить шаги 8, 9, 10 и 11.
- 13) Промыть раствором силики 2 путем добавления 1000 мл.
- 14) Перемешать его на вортексе в течение 1 мин.
- 15) Отцентрифугировать при 12000 оборотах в течение 10 сек.
- 16) Удалить супернатант аккуратно, не выливая белый осадок.
- 17) Повторить шаги 13, 14, 15 и 16.
- 18) Промыть изопропанолом путем добавления 1000 мл.
- 19) Отцентрифугировать при 12000 оборотах в течение 10 мин.
- 20) Высушить в течение 37°C 3 мин. и перевернуть пробирки для легкого высушивания.
- 21) Растворить белый осадок в 50 мкл TE.
- 22) Инкубировать 37°C в течение 15 мин.
- 23) Отцентрифугировать при максимальных оборотах в течение 1 мин. и перенести супернатант в новую пробирку.
- 24) Определить качество ДНК на спектрофотометре при длине волны A260.
- 25) Положить при -70°C на длительный период хранения и -20°C на короткий период хранения.

3. SDS-МЕТОД (метод выделения ДНК с использованием додецилсульфат натрия) [12].

Растворы для выделения:

- Экстракционный буфер: 0.1 М Tris (pH 8.0), 0.05 М EDTA (pH 8.0), 0.5 М NaCl, и 0.01 М В-меркаптоэтанол;
- 5 М ацетат калия;
- Изопропанол;
- 20% додецилсульфат натрия (SDS);
- Поливинилполипирролидона (PVP) (Sigma, P6755);
- 70% этанол;
- TE-буфер: 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0) и 1 мМ EDTA (pH 8,0). Раствор проавтоклавировать.

Протокол выделения

- 1) К размолотому в жидком азоте растительному материалу добавить 1000 мл экстракционного буфера и 100 мкл 20% SDS.
- 2) Инкубировать при 65° С от 30 мин.
- 3) Добавить 500 мкл раствора 5 М ацетат калия и перемешивать в течение 5 мин.
- 4) Инкубировать при 4° С от 30 мин.
- 5) Отцентрифугировать при 12000 оборотах 3 мин. при 4° С и комнатной температуре.
- 6) Перенести верхнюю фазу в новую пробирку.
- 7) Добавить 1000 мкл холодного изопропанола.
- 8) Собрать выпавший белый осадок крючком и перенести в новую пробирку.
- 9) Промыть осадок 700 мкл холодным 70% спиртом.
- 10) Отцентрифугировать при 12000 оборотах в течение 10 сек.
- 11) Удалить супернатант аккуратно.

- 12) Высушить в течение 37°C 3 мин. и перевернуть пробирки для легкого высушивания.
- 13) Растворить белый осадок в 50 мкл ТЕ.
- 14) Инкубировать 37°C в течение 15 мин.
- 15) Отцентрифугировать при максимальных оборотах в течение 1 мин. и перенести супернатант в новую пробирку.
- 16) Определить качество ДНК на спектрофотометре при длине волны A260.
- 17) Положить при -70°C на длительный период хранения и -20°C на короткий период хранения.

Результаты исследований

Качество ДНК было оценено спектрофотометром при длине волны 260\280 нм абсорбционным рангом (Nanodropе 2000). Для этого разбавляли раствор с ДНК в соотношении 1:50 (20 мкл стокового раствора ДНК + 980 мкл стерилизованной воды) при длине волны 260 нм (для ДНК) и длине волны 280 нм (абсорбционная длина поглощения света для белков) и затем рассчитывали концентрацию ДНК в стоковом растворе. Спектральный уровень продуктов (A 260/280 и, в некоторых случаях, A 260/230) коррелировал с качеством амплификации ДНК, давая оценку качества чистоты ДНК в образце.

Однако, остаточное содержание солей и РНК, загрязняющие и вторичные растительные метаболиты, могут снизить количество ДНК и неправильно быть оценены с помощью данного метода. Это связано с тем, что данный метод является не совсем удачным для оценки маленького количества ДНК (<1 нг/мл), потому что считается, что денситометрические методы являются не способными определить маленькое содержание ДНК в пробе [3].

В ходе исследования методы позволили выделить ДНК из исследуемых образцов, при этом качество ДНК сильно варьировало (рис. 1, 2, 3). Она хорошо проявилась при визуализации на агарозном геле.

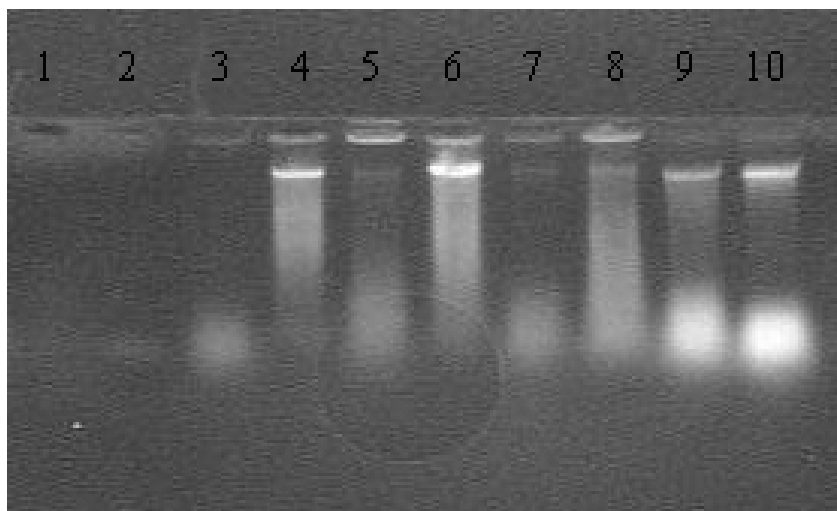


Рис. 1. Выделение ДНК методом № 1 с использованием раствора силики (СИЛИКА-МЕТОД № 1).

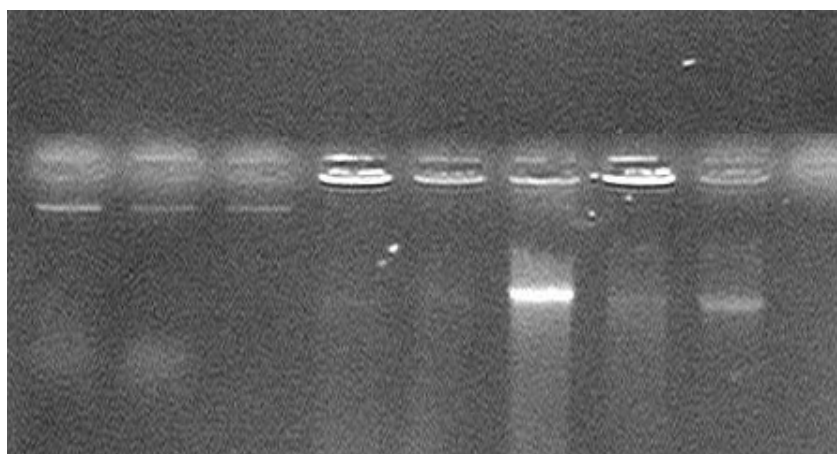


Рис. 2. Выделение ДНК методом № 2 с использованием раствора силики (СИЛИКА-МЕТОД № 2).

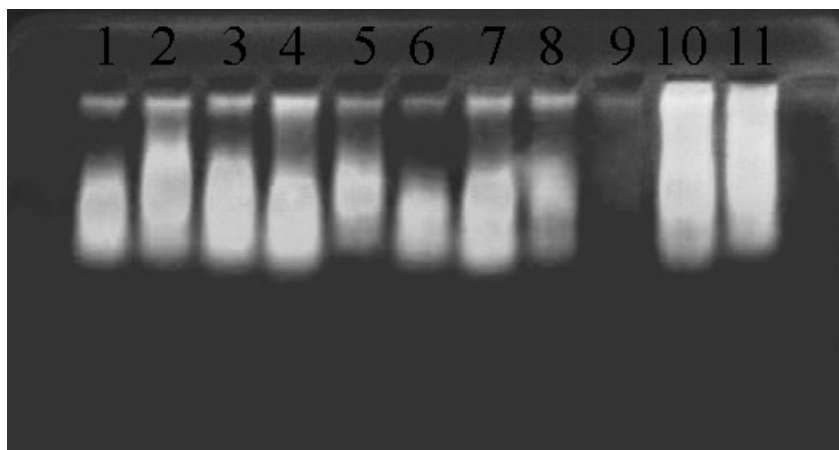


Рис. 3. Метод выделения ДНК с использованием додецилсульфата натрия (SDS-МЕТОД).

При экстракции методами № 1 и № 2 ДНК выделилась из молодых листьев, при этом раствор не был вязкий, а также имел слегка белый и прозрачный цвета.

При экстракции методом № 3 (SDS-МЕТОД) с использованием додецилсульфата натрия образовался верхний плотный и толстый слой белков и жиров сразу после добавления изопропанола к растительному материалу при инкубации ДНК с ацетатом калия при 4° С. Поэтому их видно на агарозном геле (рис. 3). Этот слой легко можно удалить путем аккуратного микропипетирования нижнего слоя, содержащего ДНК. В ходе выделения методом № 3 белесые загрязняющие вещества также осаждаются с ДНК, поэтому раствор относительно вязкий (табл. 1). Это делает ее не пригодной для дальнейших биологических изысканий, так как влияет на ферментативную активность [1].

В дальнейшем была проведена амплификация ДНК для определения ее качества с использованием 6 нейтральных микросателлитных (SSR) маркеров: VRTAG79, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VRZAG62, VVS2 [41]. Праймерные пары, фланкирующие указанные микросателлитные локусы, были синтезированы фирмой ЗАО «Синтол», Россия (рис. 4).

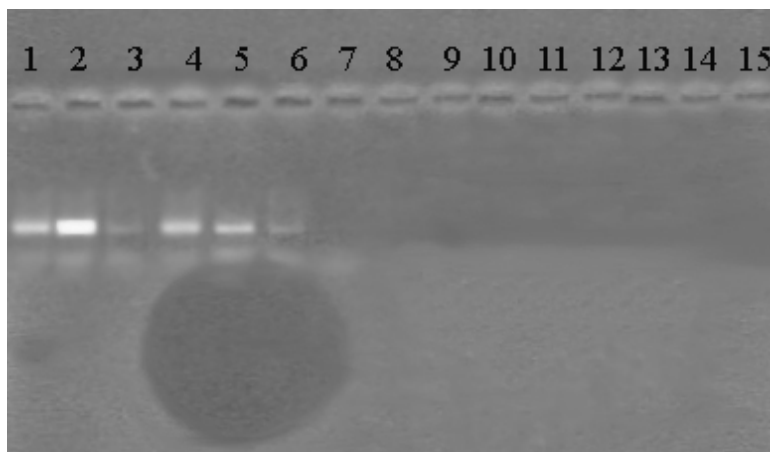


Рис. 4. ПЦР-амплификация экстрагированной ДНК.

Амплификация ДНК произошла с использованием методов № 1 и № 2 – дорожки 1, 2, 4, 5; дорожка 6 частично амплифицировалась с использованием метода № 3 (таблица 1).

Таблица 1. - Описание характеристик растворов, содержащих выделенную ДНК из различных проб и разными методами.

Вариант пробы	Метод выделения ДНК	Цвет раствора с ДНК	Вязкость раствора с ДНК	ПЦР продукт
Молодые апикальные листочки	силика-метод № 1	бело-прозрачный	не вязкий	хорошо виден
	силика-метод № 2	бело-прозрачный	не вязкий	отлично виден
	sds-метод	слегка коричневый	вязкий слегка	не виден
Зрелые листья, собранные в середине вегетационного сезона	силика-метод № 1	бело-прозрачный	не вязкий	слабо виден
	силика-метод № 2	прозрачный	не вязкий	слабо виден
	sds-метод	коричневый	вязкий	не виден
Зрелые листья, замороженные (2-хлетние)	силика-метод № 1	белый	не вязкий	не виден
	силика-метод № 2	прозрачный	не вязкий	не виден
	sds-метод	коричневый	вязкий	не виден
Зрелые листья, замороженные (5-летние)	силика-метод № 1	коричневый	не вязкий	не виден
	силика-метод № 2	коричневый	не вязкий	не виден
	sds-метод	коричневый	вязкий	не виден
Гербарные листья	силика-метод № 1	прозрачный	не вязкий	не виден
	силика-метод № 2	прозрачный	не вязкий	не виден
	sds-метод	коричневый	вязкий	не виден

Полностью не амплифицировалась ни одна ДНК, выделенная всеми тремя методами, из зрелых листьев, собранных 2 года назад и хранившихся в замороженном состоянии – дорожки 7, 8 и 9, также ДНК, выделенная из зрелых листьев, собранных 5 лет назад – дорожки 10, 11 и 12, и из гербарных листьев (рис. 4).

Выводы

Таким образом, ДНК, выделенная из молодых (апикальных) листьев винограда, является наиболее подходящим материалом, при этом лучшие результаты были получены с использованием метода № 2, так как он позволяет получать высокого качества ДНК.

Качество ДНК при спектрофотометрическом анализе из листьев, выделенных из 200 растений, показала удовлетворительные результаты: средний коэффициент абсорбции при длине волны A_{260}/A_{280} нм варьировал в пределах от 1,89-2,05. При этом количество ДНК варьировало в пределах 0,057-0,250 мг/г к свежему весу.

Метод № 1 показал удовлетворительные результаты при выделении ДНК из молодых листьев, но ДНК из выделенных образцов была сильно загрязнена и поэтому требует дальнейшей очистки.

Качество ДНК при спектрофотометрическом анализе из листьев, выделенных из 200 растений, показала следующие результаты: средний коэффициент абсорбции при A_{260}/A_{280} нм варьировал от 0,53 до 1,56. Количество ДНК варьировало в пределах 0,200-0,340 мг/г к свежему весу.

Метод № 3 не является пригодным для выделения ДНК из виноградных листьев, так как ДНК из выделенных образцов была сильно загрязнена и практически не амплифицировалась.

Качество ДНК при спектрофотометрическом анализе из листьев, выделенных из 200 растений, показала следующие результаты: средний коэффициент абсорбции при A260/A280 нм варьировал от 0,53 до 0,62.

Использование гуанидин тиоционатового базового экстрагирующего раствора позволяет во второй методике экстрагировать более качественную ДНК и очистить ее от различных примесей, присутствующих в растворе.

Применение в качестве базового раствора SDS-буфера резко сокращает количество ДНК, которое может быть использовано для амплификации ДНК по сравнению с методами СТАБ и раствора оксида кремния.

Также в работе была выявлена зависимость влияния времени инкубации на качество ДНК: инкубация при 68° С резко уменьшает количество ДНК по сравнению с инкубацией при 37° С при использовании методов с оксидом кремния «силики». Время инкубации является важным условием, которое снижает одновременно качество образца: оптимальным является от 20-30 мин.

Важным условием при экстрагировании ДНК является использование дополнительной промывки со специальными буферными растворами и изопропанолом в обоих методах.

В методах № 1 и № 2 не используется хлороформ для очистки от белков, что делает их наиболее перспективными и безопасными для дальнейшей работы.

В методе № 1 используется большое количество частиц оксида кремния, тогда как в усовершенствованном методе № 2 их меньше в 10 раз, что делает этот метод более дешевым.

Список литературы

1. Ausubel F.M. / F.M.Ausubel, R.Brent, R.E.Kingston, D.D.Moore, J.G.Seidman, J.A.Smith, K.Struhl // *Current Protocols in Molecular Biology*. - 1994. – P. 2.0.1-2.14.8.
2. Boom R. Rapid and simple methods for purification of nucleic acids / R.Boom, C.J.A. Sol, M.M.M.Salimans, C.L.Jansen, P.M.E.Wertheim van Dillen, J. van der Noordaa // *J. Clin. Microbiol.* - 1990. - № 28. - P. 495-503.
3. Buldewo S. Isolation of clean and PCR-amplifiable DNA from *Anthurium andreaeanum* / S.Buldewo and Y.F.Jaufeerally-Fakim // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2002. - № 20. - P. 71a-g.
4. Bush C. Rapid isolation of genomic DNA from whole blood to borosilicate particles / C.Bush and M.Harvey // *Clin. Chem.* - 1991. - № 37. - P. 1060.
5. Bushra C. Mini-scale genomic DNA extraction from cotton / C.Bushra, Y.Afshan, H.Tayyab, S.Riazuddin // *Plant Mol. Biol. Rep.* - 1999. - № 17. - P. 1–7.
6. Carter M.J. An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles / M.J.Carter and I.D.Milton // *Nucleic Acids Res.* - 1993. - № 21. - P. 1044.
7. Csaikl U.M. Comparative analysis of different DNA extraction protocols: a fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies / U.M.Csaikl, H.Bastian, R.Brettschneider, S.Gauch, A.Meir, M.Schauerte, F.Scholz, C.Sperisen, B.Vornam and B.Ziegenhagen // *Plant Mol. Biol. Rep.* - 1998. - №16. - P. 69-86.
8. Cheng Y.-J. An Efficient Protocol for Genomic DNA Extraction From Citrus Species / Y.-J.Cheng, W.-W.Guo, H.-L.YI, X.-M.Pang, X.Deng // *Plant Molecular Biology Reporter*. – 2003. - № 21. - P. 177–177.
9. Collins G.G. Extraction of nuclear DNA from grape vine leaves by a modified procedure / G.G.Collins, R.H.Symons // *Plant Mol. Biol. Rept.* – 1992. - № 10. - P. 233-235.
10. Couch J.A. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics / J.A.Couch, P.J.Fritz // *Plant Mol. Biol. Repr.* – 1990. - № 8. - P. 8-12.
11. Cruz M.D.L., Ramirez F. and Hernandez H. DNA isolation and amplification from / M.D.L.Cruz, F.Ramirez and H.Hernandez // *Cacti. Plant. Mol. Biol. Rep.* – 1997. - № 15. - P. 319-325.
12. Dellaporta S.L. A plant minipreparation: version II / S.L.Dellaporta, J.Wood and J.B.Hicks // *Plant Mol. Biol. Rep.* - 1983. - № 1. - P. 19-20.
13. Do N. A simple technique for removing plant polysaccharide contaminant from DNA / N.Do and R.P.Adams // *BioTechniques*. - 1991. - № 10. - P. 162-166.
14. Drabkova L. Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of Juncaceae / L.Drabkova, J.Kirschner and C.Vlcek // *Plant Mol. Biol. Rep.* - 2002. - № 20. - P. 161-175.
15. Fang, G. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA // *Bio.Techniques*. - 1992. - № 13. - P. 52-56.
16. Gaspero G.D.I. Application of genomics to grapevine improvement / Gaspero G.D.I., Cattonaro F. // *Australian Journal of Grape and Wine Research*. - 2010. - № 16. - P. 122–130.
17. Gerloff U. Amplification of hypervariable simple sequence repeats (microsatellites) from excremental DNA of wild living bonobos (*Pan paniscus*) / U.Gerloff,

C.Schlotterer, K.Rassmann, I.Rambold, G.Hohmann, B.Fruth and D.Tautz // *Mol. Ecol.* - 1995. - № 4. - P. 515-518.

18. Hattori J.S. The isolation of high molecular weight DNA from plants / J.S. Hattori, G.Gottlob-McHugh and D.A.Johnson // *Anal. Biochem.* - 1987. - № 165. - P. 70-74.

19. Hoss M. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method / M.Hoss and S.Paabo // *Nucleic Acids. Res.* - 1993. - № 21. - P. 3913-3914.

20. Howland D.E. A method of extraction of DNA from birch / D.E.Howland, R.P. Oliver and A.J.Davy // *Plant Mol. Biol. Rep.* - 1991. - № 9. - P. 340-344.

21. Katterman F.R.H. An effective method of DNA isolation from the mature leaves of *Gossypium* species that contain large amounts of phenolic terpenoids and tannins / F.R.H.Katterman, V.I.Shattuck // *Preparative Biochem.* - 1983. - № 13. - P. 347-359.

22. Kobayashi N. A simple and efficient DNA extraction method for plants, especially woody plants / N.Kobayashi, T.Horikoshi, H.Katsuyama, T.Handa and K. Takayanagi // *Plant Tissue Culture Biotech.* - 1998. - № 4. - P. 76-80.

23. Lodhi M.A. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis* / M.A.Lodhi, Ye Guang-Ning, F.Norman Weeden and Bruce I. Reisch // *Plant Molecular Biology Reporter.* - 1994. - № 12 (1). - P. 6-13.

24. Marko M.A. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder / M.A.Marko, R.Chipperfield and H.C.Birnboim // *Anal. Biochem.* - 1982. - № 121. - P. 382-387.

25. Murray M.G. Rapid isolation of high molecular weight DNA / M.G.Murray and W.F.Thompson // *Nucleic Acids Res.* - 1980. - № 8. - P. 4321-4325.

26. Möller E.M. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues / E.M.Möller, G.Bahnweg, H.Sandermann and H.H.Geiger // *Nucl. Acids Res.* - 1992. - № 22. - P. 6115-6116.

27. Porebski S. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components / S.Porebski, L.G.Bailey, B.R. Baum // *Plant Mol. Biol. Rep.* - 1997. - № 15. - P. 8-15.

28. Porteous L.A. A simple mini-method to extract DNA directly from soil for use with polymerase chain reaction amplification / L.A.Porteous and J.L.Armstrong // *Curr. Microbiol.* - 1991. - № 27. - P. 115-118.

29. Rogers S.O. Phylogenetic and taxonomic information from herbarium and mummified DNA // *Conservation of plant genes II: Utilization of ancient and modern DNA.* Miss. Bot. Gard., Monogr. - 1994. - Vol. 48.

30. Rogstad S.H. Saturated NaCl-CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analysis // *Taxon.* - 1992. - № 41. - P. 701-708.

31. Rowland L.J. Use of polyethylene glycol for purification of DNA from leaf tissue of woody plants / L.J.Rowland and B.Nguyen // *BioTechniques.* - 1993. - № 14. - P. 735-736.

32. Schlink K. Preparing high-quality DNA from Moss (*Physcomitrella patens*) / K.Schlink, R.Reski // *Plant Mol. Biol. Rep.* - 2002. - № 20. - P. 423-423.

33. Sharma A.D. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants / A.D.Sharma, P.K.Gill and P.Singh // *Plant Mol. Biol. Rep.* - 2002. - № 20. - P. 415a-415f.
34. Scott K.D. DNA extraction technique for PCR in rain forest plant species / K.D.Scott and J.Playford // *BioTechniques.* - 1996. - № 20. - P. 974-979.
35. Stein D.B. Isolation and Comparison of Nuclea Acids from Land Plants: Nuclear and Organellar Genes / D.B.Stein, E.A.Zimmer, T.J.White, R.L.Cann and A.C. Wilson // *Molecular Evolution Producing the Biochemical Data, Methods Enzymol.* -1993. - № 223. - P. 153-167.
36. Steven H.R. Plant DNA Extraction Using Silica // *Plant Molecular Biology Reporter.* – 2003. - № 21. - P. 463–463.
37. Thompson J.D. Extraction of cellular DNA from crude cell lysate with glass / J.D.Thompson, K.K.Cuddy, D.S.Haines, D.Gillepsie // *Nucleic Acids Res.* – 1990. - № 18. - P.1074.
38. Vazquez-Marrufo G. DNA isolation from forest soil suitable for PCR assays of fungal and plant rRNA genes / G.Vazquez-Marrufo, M.Vazquez-Garciduenas, B.E.Gomez-Luna and V.Olalde-Portugal // *Plant Mol. Biol. Rep.* - 2002. - № 20. - P. 379-390.
39. Vogelstein B. Preparative and analytical purification of DNA from agarose / B.Vogelstein and D.Gillespie // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1979. - № 76. - P. 615-619.
40. Zhang J. Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA / J.Zhang and J.M.Stewart // *J. Cotton Sci.* - 2000. - № 4. - P. 193-2001.
41. Web-site <http://www.vitis.com/>.