

УДК 633.3:631.52:22:577.21

**ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ДЛЯ ПЦР-АНАЛИЗА  
ИЗ «БАЛК-ОБРАЗЦОВ» ПРОРОСТКОВ**

**И.А. Клименко**, кандидат сельскохозяйственных наук  
**А.А. Антонов**, младший научный сотрудник, аспирант  
**В.А. Душкин**, младший научный сотрудник  
**А.О. Шамустакимова**, научный сотрудник  
**Ю.М. Мавлютов** научный сотрудник, аспирант

*ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»  
141055, Россия, Московская область, г. Лобня, ул. Научный городок, корп. 1  
[iaklimenko@mail.ru](mailto:iaklimenko@mail.ru)*

**EFFICIENT METHOD OF DNA ISOLATION FROM  
BULKING SAMPLES OF SEEDLINGS**

**I.A. Klimenko**, Candidate of Agricultural Sciences  
**A.A. Antonov**, Junior Researcher, Graduate Student  
**V.A. Dushkin**, Junior Researcher  
**A.O. Shamustakimova**, Researcher  
**Yu.M. Mavlyutov**, Researcher, Graduate Student

*Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology  
141055, Russia, Moscow region, Lobnya, Nauchnyi gorodok str., k. 1  
[iaklimenko@mail.ru](mailto:iaklimenko@mail.ru)*

DOI: <https://doi.org/10.33814/AFP-2222-5366-2021-3-29-48>

Проведение молекулярно-генетических исследований с использованием кормовых однолетних и многолетних трав осложняется проблемой получения качественных препаратов ДНК из-за высокого содержания в этих растениях протеинов, полисахаридов и фенольных соединений, ингибирующих ПЦР. Известные методики ДНК-экстракции с включением этапов дополнительной очистки нуклеиновых кислот или современные коммерческие наборы реагентов позволяют получить хороший результат на листовой ткани, однако на проростках недостаточно эффективны. В настоящем исследовании представлен модифицированный способ выделения ДНК на основе SDS-лизирующего буфера. Существенные модификации по составу компонентов и выполняемым операциям применительно к используемому типу растительной ткани позволили получить образцы ДНК с хорошим выходом и качеством, как из суммарной навески проростков («балк-образец»), так и из отдельных проростков/генотипов в составе популяции/сорта. Надежность метода и функциональность полученных препаратов ДНК проверены в ПЦР-анализе с разными группами молекулярных маркеров — SSR, SRAP и PwS — в исследованиях по изучению генетического полиморфизма видов и сортов кормовых бобовых трав. Основные преимущества методики: простота выполнения и оперативность, возможность получения качественных образцов ДНК без использования токсичных органических растворителей, относительно низкая стоимость и доступность компонентов экстракционного буфера. Модифицированный метод может найти практическое

применение при оценке генетического разнообразия растений и для решения любых задач, требующих быстрого анализа большой популяции.

**Ключевые слова:** кормовые травы, клевер луговой (*Trifolium pratense* L.), люцерна (*Medicago* L.), ДНК-полиморфизм, ДНК-экстракция, проростки, «балк-образцы», ПЦР-анализ.

Forage annual and perennial grasses are the difficult subject for molecular and genetic studies because of the problem with obtaining qualitative genomic DNA for PCR, due of high content of proteins, polysaccharides and polyphenols. The known methods of DNA extraction or the numerous commercial kits allow isolating purified nucleic acids from the leaf tissue, but characterized by low efficiency at seedlings using. The modified method of DNA isolation, based on the SDS-extraction buffer (sodium dodecil sulfate), is presented in this study. Significant modifications were introduced in the reagents compound and the steps of procedure accordingly to used type of plant tissue and the result was positive at usage on the bulking samples, as well as on the individual genotypes (the only seedling). Reliability of this method and the functionality of the obtained DNA samples were tested in PCR with different molecular markers (SSR, SRAP and PawS) in researches on revealing of forage legume grasses DNA polymorphism. The general advantages of the proposed method are simplicity and effectiveness, the possibility to isolate qualitative DNA without toxic reagents application, as well as relatively low cost and availability of reagents. This method can be useful for studying the genetic biodiversity and for decision the different tasks, required the rapid analysis of large plant populations.

**Keywords:** forage legume grasses, red clover (*Trifolium pratense* L.), alfalfa (*Medicago* L.), DNA polymorphism, DNA extraction, seedlings, bulking samples, PCR-analysis.

**Введение.** Эффективное использование генетических ресурсов является важнейшим условием успешной селекции кормовых культур, направленной на повышение их продуктивности и долговечия, питательной ценности и устойчивости к стрессовым факторам. Современные методы анализа на основе молекулярных ДНК-маркеров позволяют обеспечить объективную характеристику генплазмы, провести идентификацию исходного материала и определить перспективные гетерогенные образцы для использования в селекционных программах. Для проведения молекулярных исследований и объективной интерпретации полученных результатов необходимы образцы ДНК высокого качества: с неповрежденной структурой и очищенные от примесей, ингибирующих амплификацию целевых фрагментов в полимеразной цепной реакции [1]. Путем экспериментальных исследований

установлено, что существенное влияние на выход и качество образцов геномной ДНК оказывают не только морфологические свойства растений (наличие прочных клеточных оболочек), но также их физиологические и биохимические особенности, варьирующие в зависимости от видовой принадлежности, стадии онтогенеза, условий выращивания и даже типа используемой растительной ткани (семена, проростки, клубни, листья) [2; 3; 4]. При всем многообразии методов и способов выделения ДНК, включая разработанные для этих целей коммерческие наборы реагентов, на сегодняшний день не существует универсальной процедуры, одинаково эффективной для любого материала. Поэтому модификация или создание «собственных» протоколов в условиях конкретной лаборатории, с учетом специфики объекта исследований и возможностей для снижения стоимости и максимальной безопасности

применяемой процедуры, является актуальной задачей. В оптимальных протоколах ДНК-экстракции должны сочетаться рациональные приемы по первоначальной обработке образцов с целью нарушения целостности клеточных структур и применение активных реагентов для осаждения нуклеиновых кислот и удаления веществ, негативно влияющих на последующий ПЦР-анализ. Для лизиса клеточных стенок обычно используют разного рода детергенты. Наиболее распространенные буферы при работе с растительным материалом — на основе SDS (додецилсульфат натрия) или СТАВ (цетилтриметиламмония бромид) [5; 6; 7; 8]. Однако и после успешной гомогенизации растительной ткани получить качественные образцы ДНК сложно из-за присутствия в растворах белков, полисахаридов (клетчатка, в том числе целлюлоза клеточных стенок и крахмал), полифенолов (танины, лигнины, флавоноиды) и других вторичных метаболитов, таких как алкалоиды и терпены, синтезируемые в ответ на стрессовые условия окружающей среды. Эти соединения трудноотделимы от препаратов нуклеиновых кислот и часто делают их непригодными для дальнейшего использования [7; 8; 9].

Полисахариды вызывают особые проблемы: они могут совместно осаждаться с ДНК во время экстракции с образованием высоковязких растворов, что затрудняет электрофорезную разгонку и приводит к ошибочным показаниям при измерениях концентрации образцов спектрометрическим методом [7; 10; 11]. Кроме того, полисахариды могут снижать или подавлять активность ДНК-полимеразы в ПЦР [12; 13]. Для удаления полисахаридов применяют переоса-

ждение ДНК изопропанолом или добавляют в растительный экстракт соли. Растворы солей высокой концентрации, как и анионные детергенты в виде SDS, используют и для удаления белков. Они вызывают их быструю денатурацию и осаждают как нерастворимый комплекс вместе с полисахаридами [10; 11; 14]. Получению высококачественных препаратов ДНК могут мешать и присутствующие во многих растениях полифенольные соединения, в основном флавоноиды, фенолы и алкалоиды. Полифенолы при гомогенизации тканей вступают в реакции окисления, ковалентно связываются с белками и нуклеиновыми кислотами, отрицательно влияют на качество и срок хранения полученных препаратов; в их присутствии снижается активность действия ферментов — катализаторов полимеразной цепной реакции [13]. Для очищения растворов ДНК от фенольных соединений обычно применяют меркаптоэтанол или поливинилпирролидон (PVP) [14]. Еще одна распространенная проблема — это деградация ДНК, вызванная эндонуклеазами — металл-зависимыми ферментами, разрушающими нуклеиновые кислоты. Для связывания ионов металлов и инактивации нуклеаз в экстракционный буфер включают хелатирующий агент в виде ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) [15].

Лучше всего для выделения ДНК подходят молодые органы растений (ювенильные листочки, соцветия), так как они не накопили еще большого количества запасных веществ и вторичных метаболитов. Причем более высоким качеством, как правило, отличаются препараты, полученные из листовой ткани. Для использования этого типа расти-

тельной ткани разработано большинство известных на сегодняшний день протоколов ДНК-экстракции, в том числе из растений с высоким содержанием вторичных метаболитов [9; 16; 17]. Широко используются и коммерческие наборы реагентов, так называемые КИТы, которые сочетают высокую эффективность и безопасность использования — в их состав обычно не включают токсичные органические растворители. Ограничивающим фактором для широкого применения, особенно при необходимости масштабных экспериментов, является высокая стоимость КИТов. Кроме того, коммерческие наборы, как правило, предназначены для выделения ДНК из свежей или замороженной листовой ткани, что не всегда доступно по разным причинам, а размеры рекомендованных инструкцией навесок слишком малы для получения нужного количества ДНК из одного образца.

С проблемами подобного рода мы столкнулись при оценке межсортового генетического разнообразия кормовых бобовых трав, в частности клевера лугового и люцерны разных видов. Эти культуры широко используются практически во всех регионах Российской Федерации в качестве источника высокоэнергетических кормов для животных и важного компонента травосмесей для пастбищ; также они защищают почвы от эрозии и повышают их плодородие, накапливая до 120–150 кг биологического азота [18; 19; 20]. Ценность бобовых трав для животноводства обусловлена, в первую очередь, высоким содержанием в них белка, в состав которого входят все основные аминокислоты. Так, в 1 кг клевера лугового в ранние фазы развития (до бутонизации) содержится до 15–16% и

более протеина в пересчете на сухое вещество, а у люцерны этот показатель достигает 16–23% [19; 20]. В надземной части клевера содержатся углеводы, в том числе клетчатка (24–26% в период цветения), жиры (2,5–3,5%), включая ненасыщенные жирные кислоты, соли кальция и фосфора. Биологически активные вещества представлены флавоноидами (до 15 мг/г на СВ), витаминами (С, В, Е, Р и К), фитогормонами [21]. В химическом составе люцерны, наряду с белками (в среднем 20–24%), жирами (3,0–3,5%) и углеводами (более 20%), присутствуют жирные кислоты, эфирные масла, пектины, стероиды, витамины, а также ферменты и сапонины [19; 20]. Ценные кормовые и технологические свойства многолетних бобовых трав, определяемые высоким содержанием белка, сахаров и биологически активных веществ, делают их сложным объектом для молекулярно-генетического анализа, препятствуя получению качественных препаратов ДНК, свободных от примесей, ингибирующих ПЦР. При использовании современных коммерческих наборов реагентов возможность получить образцы хорошего качества легко реализуется на листовой ткани [23; 24], но на проростках эта задача, в большинстве случаев, является трудновыполнимой.

В связи с этим *цель настоящих исследований* заключалась в разработке рационального способа выделения ДНК (простого, надежного и относительно недорогого по стоимости) из проростков кормовых бобовых трав для последующего ПЦР-анализа.

**Материалы и методы.** Объектом исследований служили 15 районированных сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) и 18 — люцерны разных ви-

дов: изменчивой, посевной и хмелевидной (*Medicago varia* Mart., *M. sativa* L., *M. lupulina* L.) из коллекции генофонда кормовых культур ФНЦ «ВИК им. В. Р. Вильямса». Экспериментальная работа проводилась в лаборатории молекулярно-генетических исследований. Образцы ДНК, выделенные модифицированным способом, использовали при оценке внутрисортного и межсортного полиморфизма исследуемого материала с целью ДНК-идентификации и генетической паспортизации.

От каждого сорта случайно отбирали по 100 штук семян, стерилизовали в 1,5%-ном растворе перманганата калия ( $\text{KMnO}_4$ ) и скарифицировали механическим способом для ускорения прорастания зародыша. Проращивали семена на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри в течение семи дней. ДНК выделяли из проростков с семядольными листочками без семенной оболочки, достигших размера 1,5 см. При изучении внутрисортного генетического полиморфизма использовали образцы ДНК индивидуальных генотипов (не менее 10), а для межсортной дифференциации формировали так называемый «балк-образец» — суммарную навеску части растительной ткани 30 проростков от каждого сорта. В предварительных экспериментах испытано несколько протоколов ДНК-экстракции. Оптимальным по качеству и выходу ДНК при использовании как единичного проростка, так и общей навески оказался модифицированный в условиях лаборатории протокол на основе SDS-лизирующего буфера, описание которого приводится ниже.

*Растворы и реактивы для ДНК-экстракции:*

SDS-экстракционный буфер (200 mM

трис- $\text{HCl}$  pH 7,5; 250 mM  $\text{NaCl}$ ; 25 mM ЭДТА; 0,5% SDS); фермент РНКаза; 5 M ацетат аммония; изопропанол, охлажденный на льду; ЭДТА; 70%-ный этиловый спирт, ТЕ буфер (0,1 M трис- $\text{HCl}$ , 1 mM ЭДТА, pH 8,0).

*Протокол выделения ДНК из «балк-образца» проростков:*

Определить индивидуальный объем SDS-лизирующего буфера на каждый образец, включающий набор проростков без семенной оболочки, из расчета 300 мкл на 30 мг растительной ткани. Быстро растереть ткань в ступке с помощью пестика, добавляя порционно буфер для лизиса. В пробирки типа Эппендорф (1,5 мл) перенести 300 мкл растительного экстракта, добавить 3 мкл фермента РНКазы и инкубировать смесь в термостате при 60 °C в течение одного часа. В охлажденные пробирки добавить по 100 мкл 5 M ацетата аммония, перемешать на вортексе и центрифугировать 5 мин при 13000 оборотах. Полученный супернатант с добавлением 300 мкл изопропанола центрифугировать 5 мин при 13000 оборотах. Слить верхнюю фракцию, а к осадку добавить охлажденный 70%-ный этиловый спирт и центрифугировать смесь в течение двух минут (13000 оборотов). Пробирки с промытым осадком подсушить до полного испарения спирта, а затем растворить в 50 мкл ТЕ буфера. Образцы ДНК можно использовать для анализа сразу после выделения или поместить для продолжительного хранения в морозильную камеру (-20 °C).

Количественные и качественные показатели полученных образцов ДНК оценивали методом электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле в трис-ацетатном буфере, при напряжении

100 V в течение 30 минут, а также с помощью спектрофотометра Nano Spectrophotometer NABI («MicroDigital», Корея) в диапазоне длин волн 220–350 нм.

Эффективность применяемой процедуры экстракции определяли при использовании выделенной ДНК для генотипирования с разными типами молекулярных маркеров: SSR, SRAP и PwS. Реакционная смесь объемом 20 мкл включала стандартные компоненты, амплификация проходила в термоциклере T100 Thermal Cycler («Bio-Rad», США). Размер полученных ПЦР-продуктов оценивали в сравнении с маркерами молекулярной массы 20 bp DNA Ladder («Takara BIO Inc.», Япония), 1 kb DNA Ladder («Bio-Rad», США) 100 bp DNA Ladder («СибЭнзим», Россия) после электрофореза в агарозном или полиакриламидном гелях. Для визуализации результатов использовали систему геледокументирования GelDoc XR Plus («Bio-Rad», США) в комплекте с пакетом оригинальных программ (Image Lab. Software). Статистическая обработка данных проводилась с помощью программ GelAnalyzer, Microsatellite toolkit (MStools v.3) и Pop Gene [25; 26].

**Результаты и их обсуждение.** Преимущество в качестве объекта для выделения ДНК имеют обезвоженные образцы и органы растений, например, в виде семян, которые доступны в любое время года, для сохранения не нуждаются в заморозке, при необходимости легко транспортируются на дальние расстояния [2; 15]. Мы использовали семена для получения проростков, из которых выделяли ДНК при оценке генетического полиморфизма клевера лугового и люцерны. Исследования такого рода предполагают анализ большого набора инди-

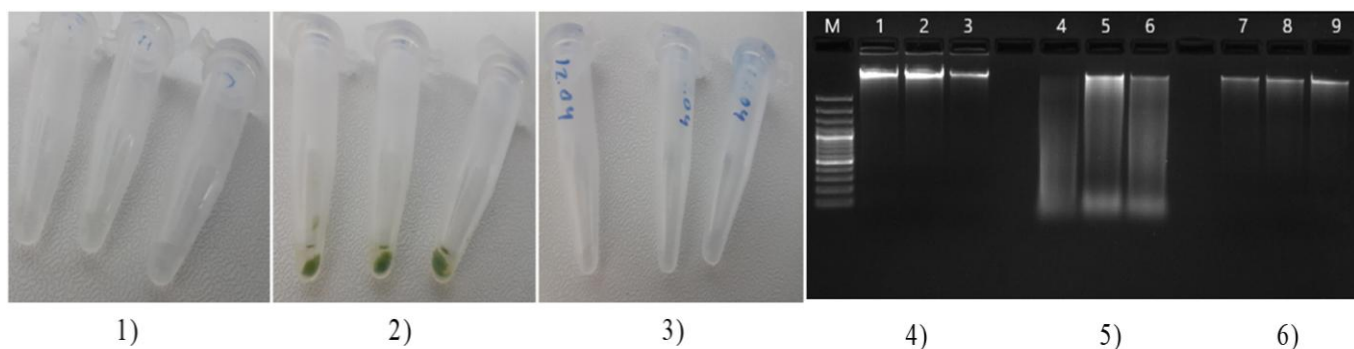
видуальных генотипов в составе каждого сорта, что является трудоемким, затратным по времени и дорогостоящим процессом. Существенно сократить издержки позволяет метод формирования «балк-образцов» (balk sampling) [27; 28; 29]. Это эффективный подход, основанный на использовании суммарной навески части растительной ткани нескольких генотипов в одном образце, что позволяет значительно снизить усилия и стоимость эксперимента, но является оправданным лишь при условии, что выборка для анализа репрезентативна. Для перекрестноопыляющихся видов с высоким уровнем внутривидовой изменчивости, к которым относится большинство кормовых трав, репрезентативная выборка должна включать не менее 30–50 растений от сорта или популяции. В этом случае существенно выше вероятность учета редких аллелей, встречающихся в популяции с частотой менее 10% [30; 31].

В нашей работе анализируемый образец состоял из 30 проростков, поэтому размер общей навески был достаточно большим — от 200 до 700 мг растительной ткани. Успешно применявшийся нами ранее на ювенильных листочках клевера лугового и люцерны коммерческий набор «ДНК-Экстран-3» (компания «Синтол», Россия) оказался малоэффективным при работе с проростками. Технические трудности возникли уже на этапе формирования суммарной навески от сорта, так как ее масса значительно превышала рекомендуемый производителем объем 10–30 мг свежей или замороженной растительной ткани. Для выполнения регламента протокола приходилось нарезать небольшие фрагменты ткани из средней части гипокотила каж-

дого проростка. В результате процесс подготовки материала усложнялся, требовал большего времени и средств на стерилизацию вспомогательных инструментов. Но и в этом случае не удавалось получить ДНК нужного качества для большинства образцов; существенные различия наблюдались и по выходу продукта, а для некоторых сортов он просто отсутствовал. Очевидно, активность и концентрация лизирующего буфера были недостаточными для извлечения необходимого количества ДНК из большой по массе выборки проростков. При этом существенно увеличивать объемы реагентов для гомогенизации нецелесообразно по экономическим соображениям. Применение указанного способа для выделения ДНК из индивидуальных генотипов сорта (единичный проросток) также не дало положительного эффекта. Как правило, целевого продукта на выходе не получали, несмотря на высокое содержание нуклеиновых кислот на единицу площади в молодых, делящихся клетках проростков. Видимо, высокая

обводненность данного типа растительной ткани (содержание воды до 92,85%) препятствовала получению препарата ДНК достаточной концентрации.

Попытки использования других, широко распространенных методик на проростках бобовых трав также не увенчались успехом. Так, низкой эффективностью отмечен экспресс-метод Эдвардса с соавторами [32], с помощью которого ранее удавалось выделить ДНК удовлетворительного качества из листовой ткани. В экстрактах, полученных этим способом из смеси проростков, наблюдался осадок светло-зеленого или коричневатого цвета, что свидетельствовало о недостаточной очистке от примесей хлорофилла и других пигментов (рис. 1.2), а это зачастую приводит к ингибированию ПЦР и сокращению срока хранения полученных образцов. На электрофореграмме ДНК выглядела в виде размытой полосы со шлейфом деградированных молекул и наличием РНК в нижней части лунок агарозного геля (см. рис. 1.5).



**Рис. 1. Сравнительная оценка способов выделения ДНК из «балк-образцов» проростков растений люцерны сортов Мира, Селена, Нижегородская**  
 Растворы ДНК в ТЕ-буфере (1, 2, 3) и электрофореграммы (4, 5, 6) ДНК-проб, полученных методами: на основе SDS-лизирующего буфера, Эдвардса и СТАВ соответственно.  
 М — молекулярный маркер (100 bp DNA Ladder).

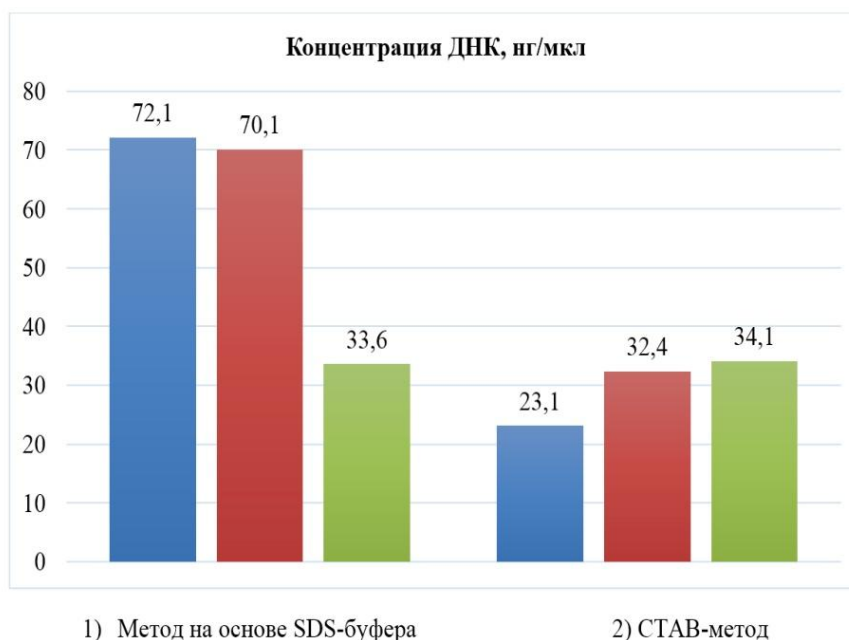
Лучшим качеством, по сравнению с методом Эдвардса, отличались препараты ДНК, полученные СТАВ-методом (см. рис. 1.3, 1.6), на что указывали ре-

зультаты электрофореза и спектрофотометрических измерений. К примеру, чистота «балк-образцов» люцерны была допустимой для последующих молекулярных исследований, однако выход про-

дукта практически во всех случаях был меньшим, чем при использовании разработанного нами способа, и, зачастую, недостаточным для использования ДНК-матрицы в ПЦР-анализе (табл. 1, рис. 2).

**1. Показатели чистоты ДНК, выделенной из «балк-образцов» проростков люцерны различными методами**

«Балк-образец» ДНК	Оптическая плотность раствора при соотношении длины волны	
	260/280	260/230
<i>метод на основе SDS-лизирующего буфера</i>		
Сорт Мира	1,95	1,91
Сорт Селена	1,93	2,23
Сорт Нижегородская	1,84	2,18
<i>СТАВ-метод</i>		
Сорт Мира	1,91	1,62
Сорт Селена	1,88	1,68
Сорт Нижегородская	1,79	2,25



**Рис. 2. Диаграммы, иллюстрирующие различия в концентрации геномной ДНК, выделенной различными методами из «балк-образцов» проростков люцерны**  
Сорта: Мира, Селена, Нижегородская  
1 — новый метод на основе SDS-лизирующего буфера; 2 — СТАВ-метод

Можно предположить, что низкие ДНК обусловлены действием цетилтрипоказатели концентрации полученной метиламмония бромид — детергента



высокой ионной силы, способного не только эффективно осаждать полисахариды, но и растворять нуклеиновые кислоты, что особенно проявилось на молодой ткани проростков. Кроме того, к недостаткам метода следует отнести использование меркаптоэтанола — обязательного компонента СТАВ-буфера, а в модифицированных вариантах — поливинилпирролидона (PVP) с последующей хлороформной очисткой растворов. Эти реагенты небезопасны для здоровья и требуют специальных мер защиты персонала.

Таким образом, предварительные исследования показали, что используемые классические методы и коммерческий набор реагентов недостаточно эффективно влияют на ткани проростков и необходимо оптимизировать процедуру с учетом особенностей этого типа растительной ткани.

После серии экспериментов в условиях лаборатории разработан протокол выделения ДНК на основе SDS-экстракционного буфера с внесением ряда существенных модификаций. SDS-буфер для извлечения ДНК с последующей очисткой экстрактов органическими растворителями впервые предложен Kirby и Cook [33]. Общеизвестное название метода — фенол-хлороформная экстракция. Впоследствии этот способ с некоторыми изменениями применяли Dellaporta с соавторами [5], известны также его многочисленные модификации. Присутствие SDS в буфере позволяет решить несколько практически значимых задач: облегчает солюбилизацию клеточных мембран, способствует быстрой денатурации протеинов, вызывает инактивацию агрессивных экзо- и эндонуклеаз, высвобождающихся в раствор на стадии

лизиса клеток и расщепляющих свободные нуклеиновые кислоты.

В наших экспериментах включение каждого реагента или этапа в процедуру ДНК-экстракции рассматривалось с позиции целесообразности их применения на конкретном объекте — ткани проростков. В частности, большинство существующих методик и протоколов рекомендуют проводить гомогенизацию с добавлением жидкого азота для быстрого разрушения клеточных стенок до начала деструктивного действия внутриклеточных нуклеаз [34; 35]. Специфическая структура проростков позволяла легко растереть ткань в ступке при помощи пестика и получить однородную суспензию без дополнительного охлаждения.

Известно, что растения разных родов и семейств на стадии проростков существенно отличаются по биохимическому составу от представителей этих же таксонов, но более поздних фаз развития, что отражается на качестве полученной из них ДНК и результатах последующего молекулярного анализа [7; 36]. Проростки клевера лугового и люцерны, как и надземная часть растений, богаты белками (в люцерне — до 4 г на 100 г СВ) [20; 37], но представлены они, в основном, полипептидами и свободными аминокислотами. Для удаления белковых соединений из экстрактов проростков нам не потребовалось включать в буфер меркаптоэтанол, который разрушает дисульфидные мостики с нарушением их третичной и четвертичной структуры, или токсичные хлороформ и фенол, как предлагается в большей части известных протоколов [35]. В качестве коагулянта белков мы выбрали ацетат аммония, поскольку этот реагент является дешевым,

простым в подготовке и использовании; единственный его недостаток — высокая гигроскопичность.

Общее содержание углеводов в тканях проростков достаточно высокое (в среднем свыше 2 г на 100 г сухого вещества), но во время процессов прорастания из семени сложные сахара распадаются на олиго- и моносахариды. Авторы многих исследований рекомендуют избавляться от присутствующих в растворах полисахаридов с помощью высококонцентрированной соли хлорида натрия. Хлорид натрия увеличивает общую концентрацию растворенных веществ в клетках, улучшает качество выделенной ДНК, но при слишком высоком содержании способен ингибировать ПЦР [38; 39]. Кроме того, в присутствии высоких концентраций солей и спирта углеводы могут осаждаться вместе с ДНК, загрязняя образцы. В связи с этим в нашем протоколе использовался хлорид натрия с концентрацией 250 мМ вместо рекомендуемой многими исследователями 6 М [2], что, однако, не снижало качества полученных препаратов. Вероятно, более простая структура полисахаридов в проростках препятствует образованию трудноразделяемых комплексов с белками и нуклеиновыми кислотами, что впоследствии позволяет легко удалить их из растительных экстрактов.

Поскольку молодые ткани растений отличаются высоким содержанием нуклеиновых кислот, в том числе РНК, в протокол была включена процедура по ее разрушению. Минимальное количество дорогостоящего фермента РНКазы (3 мкл) мы компенсировали увеличением до одного часа времени инкубации раствора в термостате при +60 °С. Этого времени оказалось достаточно для де-

градации РНК, что подтвердили результаты электрофореза. Использование изопропанола вместо этанола для осаждения ДНК и однократное промывание растворов 70%-ным этиловым спиртом (в большинстве протоколов предусмотрено два цикла этой процедуры) позволило упростить и удешевить применяемую методику, что важно при широкомасштабном анализе.

В семенных побегах бобовых трав присутствуют и вторичные метаболиты в виде дубильных веществ и флавоноидов, но их количество значительно ниже, чем накапливается в тканях взрослого растения. В результате только за счет использования SDS, а также добавления солей (250 мМ хлорид натрия и 5 М ацетат аммония) нам удалось получить растворы ДНК, свободные от полифенолов, полисахаридов и белковых соединений. Причем такой результат достигнут без применения токсичных органических растворителей. Раствор ДНК в ТЕ-буфере на заключительной стадии процедуры был светлым, прозрачным, без видимой окраски. Электрофорез в 1,6%-ном агарозном геле показал, что ДНК практически всех образцов светилась в виде довольно компактной полосы, что свидетельствовало о ее малой фрагментации (см. рис. 1.1, 1.4).

Путем экспериментальных исследований установлено, что выход ДНК зависит от видовой принадлежности, возраста и части растения, условий и сроков хранения материала, тщательности процедуры гомогенизации. Концентрацию препаратов определяли с помощью спектрофотометра по стандартной методике в одной–трех повторностях. Этот показатель варьировал в зависимости от культуры, сорта и массы навески. Как и

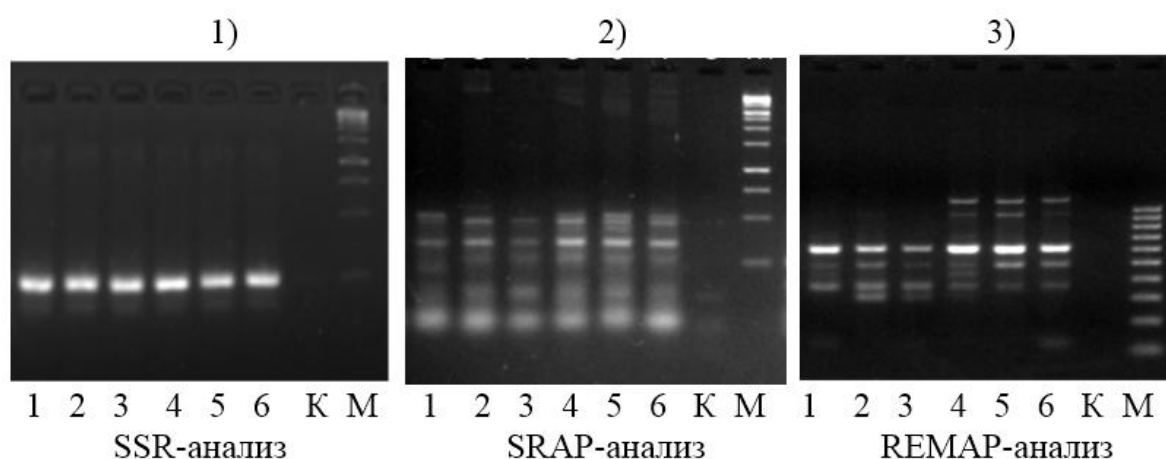
следовало ожидать, меньшим выходом ДНК отличались образцы из одного индивидуального генотипа (проростка), в сравнении с суммарной навеской из 30 проростков. Количество продукта, полученного предлагаемым способом, было довольно высоким: для сортов люцерны эти показатели варьировали от 33 до 137 нг/мкл, для клевера лугового они находились в диапазоне от 38 до 92,6 нг/мкл. Для оценки степени чистоты ДНК-проб от примесей в виде белков и полисахаридов измеряли оптическую плотность растворов при длинах волн 260, 280 и 230 нм. При использовании проростков клевера лугового показатель соотношения 260/280 в среднем составлял 1,8, а для люцерны — 2,1, что указывало на незначительную контаминацию и приемлемую для ПЦР-анализа чистоту образцов.

Таким образом, с применением указанных модификаций к SDS-методу нам удалось получить тотальную геномную ДНК с хорошим выходом, достаточно очищенную от протеинов и полифенол/полисахаридных компонентов, причем не только из «балк-образцов», но также проростков отдельных генотипов в составе сорта.

Из практического опыта и литературных источников известно, что недостаточно высокое качество ДНК-проб может привести к проблемам с выходом ПЦР-продуктов и воспроизводимостью результатов последующего анализа. Чтобы проверить надежность модифицированного метода и функциональность полученных препаратов ДНК, их использовали для генотипирования с разными типами молекулярных маркеров.

Микросателлитный анализ с помощью SSR-маркеров (*simple sequence repeats*) показал стабильную и воспроизводимую амплификацию экспериментальных образцов в двух–трех повторностях. Выход и качество полученных продуктов ПЦР были достаточно высокими, как при оценке внутрисортного генетического полиморфизма (ДНК из индивидуальных проростков), так и при анализе межсортных различий (ДНК из суммарной навески ткани нескольких генотипов). На электрофореграммах наблюдали отчетливые ампликоны высокой интенсивности свечения с отсутствием шмеров, которые могут появляться в результате действия каких-либо ингибиторов полимеразной цепной реакции. При анализе клевера лугового и люцерны разных видов амплификация проходила с большей частью из 45 испытанных пар праймеров, разработанных для этой культуры на основе экспрессирующихся последовательностей генома (*Expressed Sequence Tag, EST*) и представленных в базе данных *Red Clover Marker Database* [40]. Однако информативными (выявляющими межсортной ДНК-полиморфизм) оказались всего восемь маркеров для клевера и пять для люцерны. Видимо, умеренная степень полиморфизма (28,8%) обусловлена близкородственным происхождением изучаемого сортового материала (оригинатор большинства сортов — ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса»). Пример амплификации образцов ДНК, полученных вышеописанным способом, приведен на рисунке 3.1.

Выделенная ДНК оказалась пригодной и для анализа с использованием SRAP-маркеров (*sequence-related amplified polymorphism*).



**Рис. 3. ДНК-профили сортов клевера лугового с различными типами молекулярных маркеров**

1) — амплификация с праймерами к SSR-маркеру RCS 5600; 2) — амплификация с комбинацией праймеров к SRAP-маркерам F9 и R9; 3) — амплификация с парой праймеров к REMAP-маркерам PawS11 + MS17.

1–6 сорта: Тριο, Ветеран, Памяти Лисицына, Трифон, Пеликан, Атлант.

К — отрицательный контроль (вода), М — маркеры молекулярной массы.

Эта маркерная система основана на амплификации интрон-экзонных участков генома исследуемого организма или так называемых открытых рамок считывания (*Open Reading Frame, ORF*) [41]. Вариабельность продуктов ПЦР достигается за счет использования обратного праймера, нацеленного на некодирующую область генома, обладающую низкой консервативностью. В нашей работе 18 «балк-образцов» геномной ДНК сортов люцерны отечественной селекции успешно амплифицировались в реакциях с 25 комбинациями SRAP-праймеров [42]. Из них выделены семь информативных, которые генерировали 129 отчетливых и воспроизводимых ПЦР-продуктов длиной от 50 до 708 пар нуклеотидов (см. рис. 3.2). В среднем на одну праймерную пару получено 18,4 ампликона, средний уровень полиморфизма составил 31,7%. На основании полученных результатов была проведена оценка филогенетических отношений

между изучаемыми видами и сортами люцерны и составлены их молекулярно-генетические формулы. Качество экспериментальных образцов геномной ДНК оказалось достаточно высоким для ПЦР-анализа с использованием SRAP-системы маркирования.

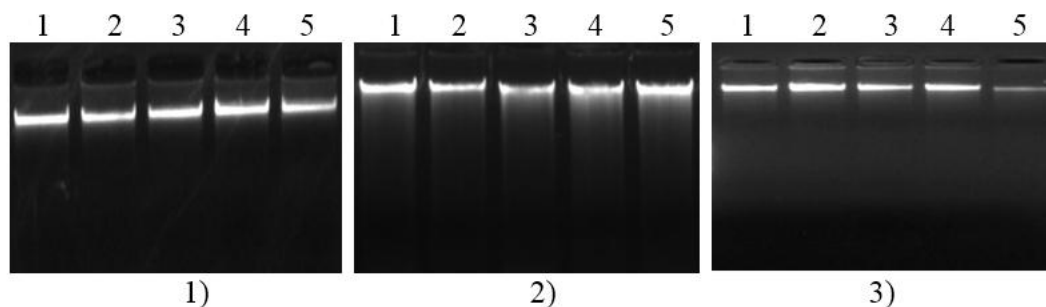
Возможности метода дополнительно оценили при амплификации REMAP-маркерами (*retrotransposon-microsatellite amplification polymorphism*). Данный метод основан на полиморфизме ретротранспозонов — мобильных элементов генома. При взаимодействии пары праймеров, один из которых разработан к последовательностям ретротранспозонов (PawS-маркеры), а другой — к микросателлитам из двух, трех или четырех оснований (SSR-маркеры), получают хорошо воспроизводимые спектры ПЦР-продуктов [43]. Методы анализа с маркерами на основе ретротранспозонов требуют наличия качественных препаратов ДНК — с высокой молекулярной массой,

свободных от примесей РНК, протеинов и фенолов, имеющих достаточную концентрацию (до 100 нг/мкл) [44; 45]. Образцы ДНК, выделенные из проростков клевера лугового и люцерны модифицированным SDS-методом, успешно амплифицировались в ПЦР с REMAP-маркерами с получением полиморфных воспроизводимых ампликонов размером от 170 до 800 п.н. (см. рис. 3.3).

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют об эффективности предложенного способа ДНК-экстракции, поскольку качество препаратов оказалось достаточно высоким для ПЦР с разными типами молекулярных маркеров. Ценным для практического применения преимуществом этой методики является возможность использования экстракта, оставшегося после лизиса растительных клеток, для повторного получения ДНК. Мы использовали лизаты, хранящиеся в морозильной камере при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение восьми месяцев и более, когда возникала потребность в дополнительных количествах ДНК для анализа. Это избавляет от необходимости подготовки и взятия новых проб биоматериала и существенно сокращает

продолжительность процедуры за счет исключения этапов гомогенизации и лизиса растительной ткани. При этом выход продукта был в среднем выше по сравнению с образцами, выделенными из недавно выращенных проростков.

Эффективность метода мы испытали также в серии экспериментов по ДНК-экстракции из проростков вики посевной и козлятника восточного, многолетних злаковых трав разных видов, кормовых капустных (рапс, сурепица) и овощных культур. Выход ДНК варьировал у образцов вики в диапазоне от 71,7 до 188,8 нг/мкл, оптическая плотность растворов при соотношении длин волн  $A_{260}/280$  менялась от 1,79 до 1,91, а при  $A_{260}/230$  — от 1,5 до 2,9, что указывало на достаточно высокую степень чистоты, отсутствие примесей белков и полисахаридов. Для козлятника восточного средний показатель по выходу ДНК составлял 53 нг/мкл, по соотношению длин волн  $A_{260}/280$  — 1,9. Полученные препараты успешно амплифицировались в ПЦР с использованием SSR- и SRAP-маркеров. Электрофореграммы нативной ДНК и результаты спектрофотометрии представлены на рисунке 4 и в таблице 2.



**Рис. 4. Образцы геномной ДНК, выделенной модифицированным методом на основе SDS-буфера из проростков растений разных семейств, видов и сортов**

- 1) — рапс озимый: 1–5 — «балк-образцы» сортов: Северянин, Столичный, ВИК 2, Норд, Лауреат;
- 2) — злаковые травы разных видов: 1–5 — райграс пастбищный Карат, овсяница красная Дипа, тимофеевка луговая ВИК 911, тимофеевка луговая ВИК 85, райграс однолетний Рапид;
- 3) — «балк-образцы» ДНК овощных культур разных сортов: 1–5 — петрушка, огурец, свекла, томат, картофель.

## 2. Выход и чистота образцов геномной ДНК, выделенной из «балк-образцов» проростков растений разных семейств, видов и сортов

Культура	Выход ДНК (концентрация, нг/мкл)	Чистота ДНК (соотношение 260/280)
<i>Рис (озимый)</i>		
Сорт Северянин	159,3	2,13
Сорт Столичный	102,5	2,11
Сорт ВИК 2	160,7	1,98
Сорт Норд	156,5	1,96
Сорт Лауреат	96,9	1,97
<i>Злаковые травы</i>		
Райграс пастбищный Карат	346,4	1,95
Тимофеевка луговая ВИК 911	210,9	1,92
Овсяница красная Дипа	274,4	1,93
Тимофеевка луговая ВИК 85	239,3	1,92
Райграс однолетний Рапид	353,8	1,97
<i>Овощные культуры</i>		
Петрушка	51,3	1,92
Огурец	98,0	2,03
Свекла столовая	75,4	1,94
Томат	54,2	1,99
Картофель	22,5	2,05

Продолжительность процедуры ДНК-экстракции составляет чуть более двух часов на получение 12 образцов, при затратах порядка 13 рублей на один образец в ценах 2020 г.

**Заключение.** Проведенные исследования позволяют сделать вывод, что модифицированный протокол на основе SDS-лизирующего буфера подходит для выделения чистой ДНК из проростков растений разных видов и семейств, о чем свидетельствуют результаты электрофореза, количественные показатели спектрофотометрических измерений и данные ПЦР-анализа. Оптимизация способа позволила получить ДНК-пробы без признаков деградаци и примесей из растений, богатых полифенолами, полисахаридами, эфирными маслами. Метод является относительно низкзатратным, избавляет от необходимости работы с

токсичными веществами — хлороформом, фенолом, изоамиловым спиртом и меркаптоэтанолом, дает возможность проведения молекулярно-генетических исследований в любое время года. Исключена многоступенчатость процедуры ДНК-экстракции за счет сокращения этапов дополнительной очистки и промывания растворов. Это позволяет уменьшить расход пробирок и одноразовых наконечников при каждом выделении и снижает риск механического повреждения молекул в результате многократного пипетирования. Расход экстракционного буфера может быть увеличен или уменьшен с учетом объема доступного материала и требуемого количества ДНК для исследований.

При использовании препаратов ДНК в ПЦР-анализе получены, в большинстве случаев, информативные электрофоре-

граммы, на основании которых проведена видовая и сортовая дифференциация изучаемых кормовых культур.

Модифицированный метод отличается простотой выполнения и оперативностью, позволяет избежать зависимости от дорогостоящих коммерческих наборов реагентов, поэтому может найти практическое применение для анализа большого количества проб.

Несомненно, протокол будет полезным при изучении биоразнообразия и филогенетических отношений между растениями разных таксономических групп, при сортовой идентификации и оценке генетической чистоты партий семян в семеноводстве, для молекулярной диагностики и других задач, требующих быстрого анализа большой популяции.

## Литература

1. Agbagwa I.O., Datta S., Patil P.G., Singh P., Nadarajan N. A protocol for high-quality genomic DNA extraction from legumes // *Genetic Molecular Research*. 2012. V. 11 (4). P. 4632–4639. (doi: 10.4238/2012).
2. Петров Д.Г., Макарова Е.Д., Гермаш Н.Н., Антифеев И.Е. Методы выделения и очистки ДНК // *Научное приборостроение*. – 2019. – Т. 29, № 4. – С. 28–50.
3. Ansari I.A., Khan M.S. An efficient protocol for isolation of high quality genomic DNA from seeds of apple cultivars (*Malus domestica*) for random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis // *Pharm. Crop*. 2012. V. 3. P. 78–83.
4. Kumari V., Bansal A., Aminedi R., Taneja D. and Das N. Simplified extraction of good quality genomic DNA from a variety of plant materials // *African Journal Biotechnology*. 2012. V. 1 (24). P. 6420–6427. (DOI:10.5897/AJB11.2366).
5. Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA miniprep: Version II // *Plant Molecular Biology Reporter*. 1983. V. 1 (4). P. 19–21. (DOI: 10.1007/BF02712670).
6. Doyle J.J. and Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus*. 1990. V. 12. P. 13–15.
7. Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components // *Plant Molecular Biology Reporter*. 1997. V. 15. P. 8–15.
8. Sahu S.K., Thangaraj M., and Kathiresan K. DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid nitrogen and Phenol // *ISRN Molecular Biology*. 2012. P. 1–6. (doi: 10.5402/2012/205049).
9. Niu C., Kebede H., Auld D.L., Woodward J.E., Burow G., Wright R.J. A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment // *African Journal of Biotechnology*. 2008. V. 7. P. 2818–2822.
10. Fang G., Hammer S., Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA // *BioTechniques*. 1992. V. 13. P. 52–56.
11. Do N. and Adams R.P. A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA // *BioTechniques*. 1991. V. 10, no. 2. P 162–166.
12. Pandey R.N., Adams R.P., and Flournoy L.E. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides // *Plant Molecular Biology Reporter*. 1996. V. 14, no. 1. P. 17–22.
13. Dilworth E. and Frey J.E. A rapid method for high throughput DNA extraction from plant material for PCR amplification // *Plant Molecular Biology Reporter*. 2000. V. 18(1), P. 61–64.
14. Cheng J., Guo W.W.U., Hua-Lin Y.I., Pang X.M. and Deng X. An efficient protocol for genomic DNA extraction from citrus species // *Plant Molecular Biology Reporter*. 2003. V. 21, no. 2. P. 177–178.

15. Рябушкина Н.А., Омашева М.Е., Галиакпаров Н.Н. Специфика выделения ДНК из растительных объектов // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – № 2. – С. 9–26. (DOI: 10.11134/btp.2.2012.1).
16. Amani J., Kazemi R., Abbasi A.R., Salmanian A.H. A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis // Iran Journal Biotechnology. 2011. V. 9 (1). P. 69–71.
17. Разработка метода получения препарата суммарной ДНК высокого качества из растений рода *Rhododendron* / В.Н. Калаев, О.А. Землянухина, И.Ю. Карпеченко, К.А. Карпеченко, А.М. Кондратьева, В.Н. Вепринцев, Н.А. Карпеченко, С.С. Карпова // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 5. – С. 148–152.
18. Новоселов М.Ю. Клевер луговой (*Trifolium pratense* L.) // Селекция и семеноводство многолетних трав / под ред. А.С. Новоселовой, А.С. Шпакова, З.Ш. Шамсутдинова, И.М. Шатского, Н.И. Георгиади. – М., 2005. – С. 9–64. (ISBN 5-87456-471-3).
19. Люцерна в структуре генофонда кормовых культур / В.А. Трухан, Н.Н. Козлов, В.Л. Коровина, М.А. Макаренков, Т.Н. Комкова // Актуальные направления селекции и использование люцерны в кормопроизводстве. – М. : Угрешская типография, 2014. – С. 97–99.
20. Писковацкий Ю.М. Краткая характеристика основных видов люцерны, возделываемых в стране. В главе: 1.8. Люцерна (*Medicago* L.) // Основные виды и сорта кормовых культур: Итоги научной деятельности Центрального селекционного центра / ФГБНУ ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса. – М. : Наука, 2015. – С. 117–119. (ISBN 978-5-02-039110-9).
21. Сравнительное содержание флавоноидов в клеверах луговом (*Trifolium pratense* L.), открытозевом (*Trifolium apertum* V.) и лядвенце рогатом (*Lotus corniculatus*) / А.Я. Шурыгин, Т.В. Андросова, Л.В. Шурыгина, Н.Н. Лобова, С.И. Сторожик, Э.С. Осецкий, В.П. Крылов // Наука Кубани. – 2010. – № 1. – С. 4–7.
22. Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. – Новосибирск : Наука, 1990. – 327 с.
23. Клименко И.А., Разгуляева Н.В., Козлов Н.Н. ДНК-маркирование клевера лугового по признакам зимостойкости и устойчивости к склеротиниозу [Электронный ресурс] // Адаптивное кормопроизводство. – 2011. – № 4. – С. 20–25. (URL: <https://www.adaptagro.ru>).
24. Tamari F. and Hinkley C.S. Extraction of DNA from Plant Tissue: Review and Protocols // Springer Protocols Handbooks. New York. 2016. P. 245–263. (DOI 10.1007/978-1-4939-3185-9-1).
25. Lazar I., Zwecker-Lazar I., Lazar R.H. GelAnalyzer 2010a: Freeware 1D gel electrophoresis image analysis software // Science Open. Inc.: Burlington, MA, USA, 2010.
26. Park S. MStools v. 3. Excel Spreadsheet Toolkit for Data Conversion. Dublin: Trinity College; 2001.
27. Michelmore R.W., Paran I., and Kesseli R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations // Genetics. 1991. V. 88. P. 9828–9832.
28. Fu Y.B. Applications of bulking in molecular characterization of plant germplasm: a critical review // Plant Genet. Resour. 2003. 1 (2–3). С. 161–167. (doi: 10.1079/PGR200324).
29. Liu S., Feuerstein U., Luesink W., Schulze S., Asp T., Studer B., Becker H.C., and Dehmer K.J. DArT, SNP, and SSR analyses of genetic diversity in *Lolium perenne* L. using bulk sampling // BMC Genetics. 2018. V. 19 (10). P. 1–13. (DOI 10.1186/s 12863-017-0589-0).
30. Crossa J. Methodologies for estimating the sample-size required for genetic conservation of outbreeding crops // Theoretical and Applied Genetics. 1989. V. 77. P. 153–161.
31. Semerikov V.L., Belyaev A.Y., Lascoux M. The origin of Russian cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) and their genetic relationships to wild populations in the Urals // Theoretical and Applied Genetics. 2002. V. 106. P. 127–132.
32. Edwards K., Johnstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // Nucleic Acids Research. 1991. V. 19, no. 6. P. 1349.



33. Kirby K.S. and Cook E.A. Isolation of deoxyribonucleic acid from mammalian tissues // *Biochemical Journal*. 1967. V. 104 (1). P. 254–257. (doi: 10.1042/bj1040254).
34. Pushpa D., Samantaray S., Maiti S. Genomic DNA Isolation Protocol for Aloe Barbadensis Miller: Using Leaf Gel for Genetic Characterization // *International Journal of Scientific and Research Publications*. 2014. V. 4 (5). P. 1–5. (ISSN 2250-3153).
35. Bošeřová D., Žiarovská J., Hlavačková L., Ražná K., Bežo M. Comparative analysis of different methods of *Hedera helix* DNA extraction and molecular evidence of the functionality in PCR // *Acta fytotechn. zootechn.* 2016. V. 19 (4). P. 144–149. (DOI: 10.15414/afz.2016.19.04.144-149).
36. Sharma A.D., Gill P.K. and Singh P. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants // *Plant Molecular Biology Reports*. 2002. V. 20. P. 415.
37. Вербицкая Л.П. Люцерна на корм и семена в Краснодарском крае. – Краснодар, 2007. – 238 с.
38. Paterson A.H., Brubaker C.L., and Wendel J.F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis // *Plant Molecular Biology Reporter*. 1993. V. 11 (2). P. 122–127.
39. Suman P.S.K., Ajit K.S., Darokar M.P. and Sushil K. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils // *Plant Molecular Biology Reporter*. 1999. V. 17. P. 1–7.
40. Sato S., Isobe S., Asamizu E., Ohmido N., Kataoka R., Nakamura Y. et al. Comprehensive structural analysis of the genome of red clover (*Trifolium pratense* L.) // *DNA Research*. 2005. V. 12 (5). P. 301–364. (DOI: 10.1093/dnares/dsi018).
41. Li G., Quiros C.F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica // *Theoretical and Applied Genetics*. 2001. V. 103, no. 2–3. P. 455–461.
42. Шамустакимова А.О., Мавлютов Ю.М., Клименко И.А. Применение SRAP-маркеров для ДНК-идентификации российских сортов люцерны // *Генетика*. – 2021. – Т. 57, № 5. – С. 536–543. (DOI: 10.31857/S0016675821050118).
43. Kalendar R., Schulman A.H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting // *Nature Protocols*. 2006. V. 1, no. 5. P. 2478–2484.
44. Kalendar R., Antonius K., Smýkal P. Schulman A.H. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation // *Theoretical Applied Genetic*. 2010. V. 121. P. 1419–1430. (DOI: 10.1007/s00122-010-1398-2).
45. Хапилина О.Н., Райзер О.Б. Молекулярно-генетическая идентификация сортов мягкой пшеницы с использованием ретротранспозонов // *Биотехнология. Теория и практика*. 2013. № 4. С. 29–35. (DOI: 10.11134/btp.4.2013.4).

## References

1. Agbagwa I.O., Datta S., Patil P.G., Singh P., Nadarajan N. A protocol for high-quality genomic DNA extraction from legumes. *Genetic Molecular Research*. 2012. V. 11 (4). P. 4632–4639. (doi: 10.4238/2012).
2. Petrov D.G., Makarova E.D., Germash N.N., Antifeev I.E. Metody vydeleniya i ochistki DNK [Methods for DNA isolation and purification]. *Nauchnoye priborostroyeniye [Scientific Instrument Engineering]*, 2019, V. 29, no. 4, p. 28–50.
3. Ansari I.A., Khan M.S. An efficient protocol for isolation of high quality genomic DNA from seeds of apple cultivars (*Malus domestica*) for random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Pharm. Crop*. 2012. V. 3. P. 78–83.
4. Kumari V., Bansal A., Aminedi R., Taneja D. and Das N. Simplified extraction of good quality genomic DNA from a variety of plant materials. *African Journal Biotechnology*. 2012. V. 1 (24). P. 6420–6427. (DOI:10.5897/AJB11.2366).

5. Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1983. V. 1 (4). P. 19–21. (DOI: 10.1007/BF02712670).
6. Doyle J.J. and Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 1990. V. 12. P. 13–15.
7. Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1997. V. 15. P. 8–15.
8. Sahu S.K., Thangaraj M., and Kathiresan K. DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid nitrogen and Phenol. *ISRN Molecular Biology*. 2012. P. 1–6. (doi: 10.5402/2012/205049).
9. Niu C., Kebede H., Auld D.L., Woodward J.E., Burow G., Wright R.J. A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment. *African Journal of Biotechnology*. 2008. V. 7. P. 2818–2822.
10. Fang G., Hammer S., Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *BioTechniques*. 1992. V. 13. P. 52–56.
11. Do N. and Adams R.P. A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. *BioTechniques*. 1991. V. 10, no. 2. P. 162–166.
12. Pandey R.N., Adams R.P., and Flournoy L.E. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1996. V. 14, no. 1. P. 17–22.
13. Dilworth E. and Frey J.E. A rapid method for high throughput DNA extraction from plant material for PCR amplification. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2000. V. 18(1), P. 61–64.
14. Cheng J., Guo W.W.U., Hua-Lin Y.I., Pang X.M. and Deng X. An efficient protocol for genomic DNA extraction from citrus species. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2003. V. 21, no. 2. P. 177–178.
15. Ryabushkina N.A., Omasheva M.E., Galiakparov N.N. Spetsifika vydeleniya DNK iz rastitel'nykh ob"yektov [Specificity of DNA extraction from plant objects]. *Biotekhnologiya. Teoriya i praktika [Biotechnology. Theory and practice]*, 2012, no. 2, pp. 9–26. (DOI: 10.11134/btp.2.2012.1).
16. Amani J., Kazemi R., Abbasi A.R., Salmanian A.H. A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis. *Iran Journal Biotechnology*. 2011. V. 9 (1). P. 69–71.
17. Kalayev V.N., Zemlyanukhina O.A., Karpechenko I.Yu., Karpechenko K.A., Kondratyeva A.M., Veprintsev V.N., Karpechenko N.A., Karpova S.S. Razrabotka metoda polucheniya preparata summarnoy DNK vysokogo kachestva iz rasteniy roda *Rhododendron* [Development of a method for obtaining a high quality total DNA preparation from plants of the genus *Rhododendron*]. *Fundamental'nyye issledovaniya [Fundamental research]*, 2012, no. 5, pp. 148–152.
18. Novoselov M.Yu. Klever lugovoy (*Trifolium pratense* L.) [Meadow clover (*Trifolium pratense* L.)]. *Selektsiya i semenovodstvo mnogoletnikh trav [Selection and seed production of perennial grasses]*. Eds.: A.S. Novoselova, A.S. Shpakov, Z.Sh. Shamsutdinov, I.M. Shatskiy, N.I. Georgiadi. Moscow, 2005, pp 9–64. (ISBN 5-87456-471-3).
19. Trukhan V.A., Kozlov N.N., Korovina V.L., Makarenkov M.A., Komkova T.N. Lyutserna v strukture genofonda kormovykh kul'tur [Alfalfa in the structure of the gene pool of fodder crops]. *Aktual'nyye napravleniya selektsii i ispol'zovaniye lyutserny v kormoproizvodstve [Actual directions of breeding and the use of alfalfa in fodder production]*. Moscow, Ugreshskaya tipografiyaPubl., 2014, pp. 97–99.
20. Piskovatskiy Yu.M. Kratkaya kharakteristika osnovnykh vidov lyutserny, vzdelyvayemykh v strane. V glave: 1.8. Lyutserna (*Medicago* L.) [Brief description of the main types of alfalfa cultivated in the country. In chapter: 1.8. Lucerne (*Medicago* L.)]. *Osnovnyye vidy i sorta kormovykh kul'tur: Itogi nauchnoy deyatel'nosti Tsentral'nogo selektsionnogo tsentra [Main types and varieties of forage crops: Results of scientific activities of the Central Breeding Center]*. All-Russian Williams Fodder Research Institute. Moscow, Nauka Publ., 2015, pp. 117–119. (ISBN 978-5-02-039110-9).
21. Shurygin A.Ya., Androsova T.V., Shurygina L.V., Lobova N.N., Storozhik S.I., Osetskiy E.S., Krylov V.P. Sravnitel'noye sodержaniye flavonoidov v kleverakh lugovom (*Trifolium pratense* L.),

- otkrytozevom (*Trifolium apertum* B.) i lyadventse rogom (*Lotus corniculatus*) [Comparative content of flavonoids in meadow clovers (*Trifolium pratense* L.), open-throated (*Trifolium apertum* B.) and birds-foot trefoil (*Lotus corniculatus*)]. *Nauka Kubani [Science of Kuban]*, 2010, no. 1, pp. 4–7.
22. Georgiyevskiy V.P., Komissarenko N.F., Dmitruk S.E. Biologicheski aktivnyye veshchestva lekarstvennykh rasteniy [Biologically active substances of medicinal plants]. Novosibirsk, Nauka Publ., 1990, 327 p.
  23. Klimenko I.A., Razgulyaeva N.V., Kozlov N.N. DNK-markirovaniye klevera lugovogo po priznakam zimostoykosti i ustoychivosti k sklerotiniozu [DNA-marking of meadow clover according to the characteristics of winter hardiness and resistance to sclerotinosis]. *Adaptivnoye kormoproizvodstvo [Adaptive forage production]*, 2011, no. 4, pp. 20–25. (URL: <https://www.adaptagro.ru>).
  24. Tamari F. and Hinkley C.S. Extraction of DNA from Plant Tissue: Review and Protocols. *Springer Protocols Handbooks*. New York. 2016. P. 245–263. (DOI 10.1007/978-1-4939-3185-9-1).
  25. Lazar I., Zwecker-Lazar I., Lazar R.H. GelAnalyzer 2010a: Freeware 1D gel electrophoresis image analysis software. *Science Open*. Inc.: Burlington, MA, USA, 2010.
  26. Park S. MStools v. 3. Excel Spreadsheet Toolkit for Data Conversion. Dublin: Trinity College; 2001.
  27. Michelmore R.W., Paran I., and Kesseli R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Genetics*. 1991. V. 88. P. 9828–9832.
  28. Fu Y.B. Applications of bulking in molecular characterization of plant germplasm: a critical review. *Plant Genet. Resour.* 2003. 1 (2–3). C. 161–167. (doi: 10.1079/PGR200324).
  29. Liu S., Feuerstein U., Luesink W., Schulze S., Asp T., Studer B., Becker H.C., and Dehmer K.J. DArT, SNP, and SSR analyses of genetic diversity in *Lolium perenne* L. using bulk sampling. *BMC Genetics*. 2018. V. 19 (10). P. 1–13. (DOI 10.1186/s 12863-017-0589-0).
  30. Crossa J. Methodologies for estimating the sample-size required for genetic conservation of outbreeding crops. *Theoretical and Applied Genetics*. 1989. V. 77. P. 153–161.
  31. Semerikov V.L., Belyaev A.Y., Lascoux M. The origin of Russian cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) and their genetic relationships to wild populations in the Urals. *Theoretical and Applied Genetics*. 2002. V. 106. P. 127–132.
  32. Edwards K., Johnstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*. 1991. V. 19, no. 6. P. 1349.
  33. Kirby K.S. and Cook E.A. Isolation of deoxyribonucleic acid from mammalian tissues. *Biochemical Journal*. 1967. V. 104 (1). P. 254–257. (doi: 10.1042/bj1040254).
  34. Pushpa D., Samantaray S., Maiti S. Genomic DNA Isolation Protocol for Aloe Barbadensis Miller: Using Leaf Gel for Genetic Characterization. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 2014. V. 4 (5). P. 1–5. (ISSN 2250-3153).
  35. Bošelořová D., Žiarovská J., Hlavačková L., Ražná K., Bežo M. Comparative analysis of different methods of *Hedera helix* DNA extraction and molecular evidence of the functionality in PCR. *Acta fyto-techn. zootechn.* 2016. V. 19 (4). P. 144–149. (DOI: 10.15414/afz.2016.19.04.144-149).
  36. Sharma A.D., Gill P.K. and Singh P. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant Molecular Biology Reports*. 2002. V. 20. P. 415.
  37. Verbitskaya L.P. Lyutserna na korm i semena v Krasnodarskom kraje [Alfalfa for feed and seeds in the Krasnodar Territory]. Krasnodar, 2007, 238 p.
  38. Paterson A.H., Brubaker C.L., and Wendel J.F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1993. V. 11 (2). P. 122–127.
  39. Suman P.S.K., Ajit K.S., Darokar M.P. and Sushil K. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1999. V. 17. P. 1–7.

40. Sato S., Isobe S., Asamizu E., Ohmido N., Kataoka R., Nakamura Y. et al. Comprehensive structural analysis of the genome of red clover (*Trifolium pratense* L.). *DNA Research*. 2005. V. 12 (5). P. 301–364. (DOI: 10.1093/dnares/dsi018).
41. Li G., Quiros C.F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics*. 2001. V. 103, no. 2–3. P. 455–461.
42. Shamustakimova A.O., Mavlyutov Yu.M., Klimenko I.A. Primeneniye SRAP-markeroy dlya DNK-identifikatsii rossiyskikh sortov lyutserny [Application of SRAP markers for DNA identification of Russian alfalfa varieties]. *Genetika [Genetics]*, 2021, V. 57, no. 5, pp. 536–543. (DOI: 10.31857/S0016675821050118).
43. Kalendar R., Schulman A.H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols*. 2006. V. 1, no. 5. P. 2478–2484.
44. Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman A.H. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical Applied Genetic*. 2010. V. 121. P. 1419–1430. (DOI: 10.1007/s00122-010-1398-2).
45. Khapilina O.N., Rayzer O.B. Molekulyarno-geneticheskaya identifikatsiya sortov myagkoy pshenitsy s ispol'zovaniyem retrotranspozonoov [Molecular genetic identification of common wheat varieties using retrotransposons]. *Biotekhnologiya. Teoriya i praktika [Biotechnology. Theory and practice]*, 2013, no. 4, pp. 29–35. (DOI: 10.11134/btp.4.2013.4).