

САХАРОВА В.Г.^{1✉}, БЛЮМ Р.Я.^{1,2}, РАБОКОНЬ А.М.¹, ПІРКО Я.В.¹, МОСЯКІН С.Л.,³
БЛЮМ Я.Б.¹

¹ Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, ORCID: 0000-0003-1887-5406; 0000-0001-7078-7548

² ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка,

Україна, 03022, м. Київ, просп. Академіка Глушкова, 2, ORCID: 0000-0003-4936-1803

³ Інститут ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України,

Україна, 02000, м. Київ, вул. Терещенківська, 2, ORCID: 0000-0002-3570-3190

✉ vl_saharova@ukr.net

ПОРІВНЯННЯ МЕТОДІВ ВИДІЛЕННЯ ДНК ІЗ ГЕРБАРНИХ ЗРАЗКІВ РИЖІЮ ДРІБНОПЛІДНОГО (*CAMELINA MICROCARPA* ANDRZ. EX DC.)

Мета. Основною метою нашого дослідження було порівняння ефективності методів виділення ДНК з гербарних зразків рослини рижію дрібноплідного (*Camelina microcarpa* Andr. ex DC.), їх подальша модифікація для збільшення виходу ДНК, а також визначення методу, який би забезпечував найкращий вихід виділеної ДНК. **Методи.** Були використані модифікації методу виділення ДНК за допомогою DNeasy Plant Mini Kit (QIAgen) та методу ЦТАБ. ПЛР проводили, використовуючи вроджені праймери для ТВР-аналізу (Tubulin-Based Polymorphism). Амплікони розділяли за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі з подальшою візуалізацією шляхом фарбування нітратом срібла. **Результати.** Проведено виділення ДНК з гербарних зразків *C. microcarpa*, представлених листками і насінням, за допомогою модифікованого методу ЦТАБ та чотирьох модифікацій методу з використанням DNeasy Plant Mini Kit (QIAgen). **Висновки.** Встановлено, що найефективнішою виявилася модифікація методу DNeasy Plant Mini Kit (QIAgen) з подовженням етапу лізису клітин. Нами було помічено, що на успішність виділення ДНК впливав не стільки вік гербарного зразка, скільки методи засушення та зберігання рослин у колекції.

Ключові слова: рижій дрібноплідний, *Camelina microcarpa*, Andr. ex DC., гербарні зразки, виділення ДНК.

Рижій дрібноплідний (*Camelina microcarpa* Andr. ex DC., родина *Brassicaceae*) – прямий предок окультуреного рижію посівного (*C. sativa* (L.) Crantz). Саме тому його молекулярно-генетичні дослідження можуть сприяти

як з'ясуванню процесів еволюції різних видів роду *Camelina*, так і допомогти прояснити роль різних популяцій цього виду в окультуренні *C. sativa*. Це також дозволить залучити нові аельні варіанти до селекції рижію посівного, який є історично важливою олійною культурою Європи та останнім часом привернув увагу як потенційне джерело біопалива [1], але його сорти вирізняються недостатньою генетичною різноманітністю [2].

Гербарні зразки рослин є важливим джерелом інформації для порівняльного молекулярно-генетичного аналізу як на рівні популяцій, так і видів загалом, не кажучи вже про додаткові можливості для оцінки молекулярної еволюції [3]. Зауважимо, що у гербарних зразках, залежно від умов засушення та подальшого зберігання, дуже деградує ДНК [4]. Ще тридцять років тому методи засушення не мали на меті збереження ДНК [5], тому вони переважно включали використання хімічних речовин, а саме формаліну та етанолу, які руйнують ДНК [6]. Крім того, досить часто для збереження зразків і боротьби з гербарними шкідниками (комахами, пліснявими грибами тощо) використовувалися прожарювання або (у недавні десятиліття) обробка у мікрохвильових пічках. Зараз для боротьби з гербарними шкідниками перевага надається глибокому проморожуванню, яке не руйнує ДНК. Основними типами пошкодження гербарної ДНК є наявність AP-сайтів, дезамінованих залишків цитозину, окислених залишків гуаніну [7]. Через наявність пошкоджених нуклеотидів у гербарній ДНК під час її ампліфікації ДНК-полімераза може приєднувати неправильні нуклеотиди [8]. Розриви ланцюгів

© САХАРОВА В.Г., БЛЮМ Р.Я., РАБОКОНЬ А.М., ПІРКО Я.В., МОСЯКІН С.Л., БЛЮМ Я.Б.

та інші типи пошкоджень ДНК можуть призводити до блокування ДНК-полімерази та перешкоджати нормальному процесу ампліфікації [5].

Водночас гербарні зразки, зібрані в попередні століття, є не лише науково важливими, але й історично цінними, що обмежує можливість вилучення з них значної кількості матеріалу. Щоб уникнути псування зразків, для виділення ДНК доводиться обмежуватись усього декількома міліграмами гербарного матеріалу [5]. Для невеликих зразків, зокрема таких, як і *C. microcarpa* (рис. 1), зазвичай відбирається частина листка розміром 1x1 мм, однак у гербарних колекціях зберігаються зразки рослин, зібрані на

різних стадіях вегетації, з незначною кількістю листків або взагалі без них. До того ж у процесі зберігання частина рослинного матеріалу може втрачатися. Зразки рижю, зібрані на стадії дозрівання насіння, часто вже не мають основних стеблових листків, окрім малих сидячих листків, які за довготривалого зберігання також часто відламуються та втрачаються (Рис. 1А). Тому, з огляду на обмежені можливості вилучення частини рослинного матеріалу та неможливість використання деяких типів рослинних тканин, оптимізація протоколів виділення ДНК з гербарних зразків (особливо старих) є вкрай необхідною.

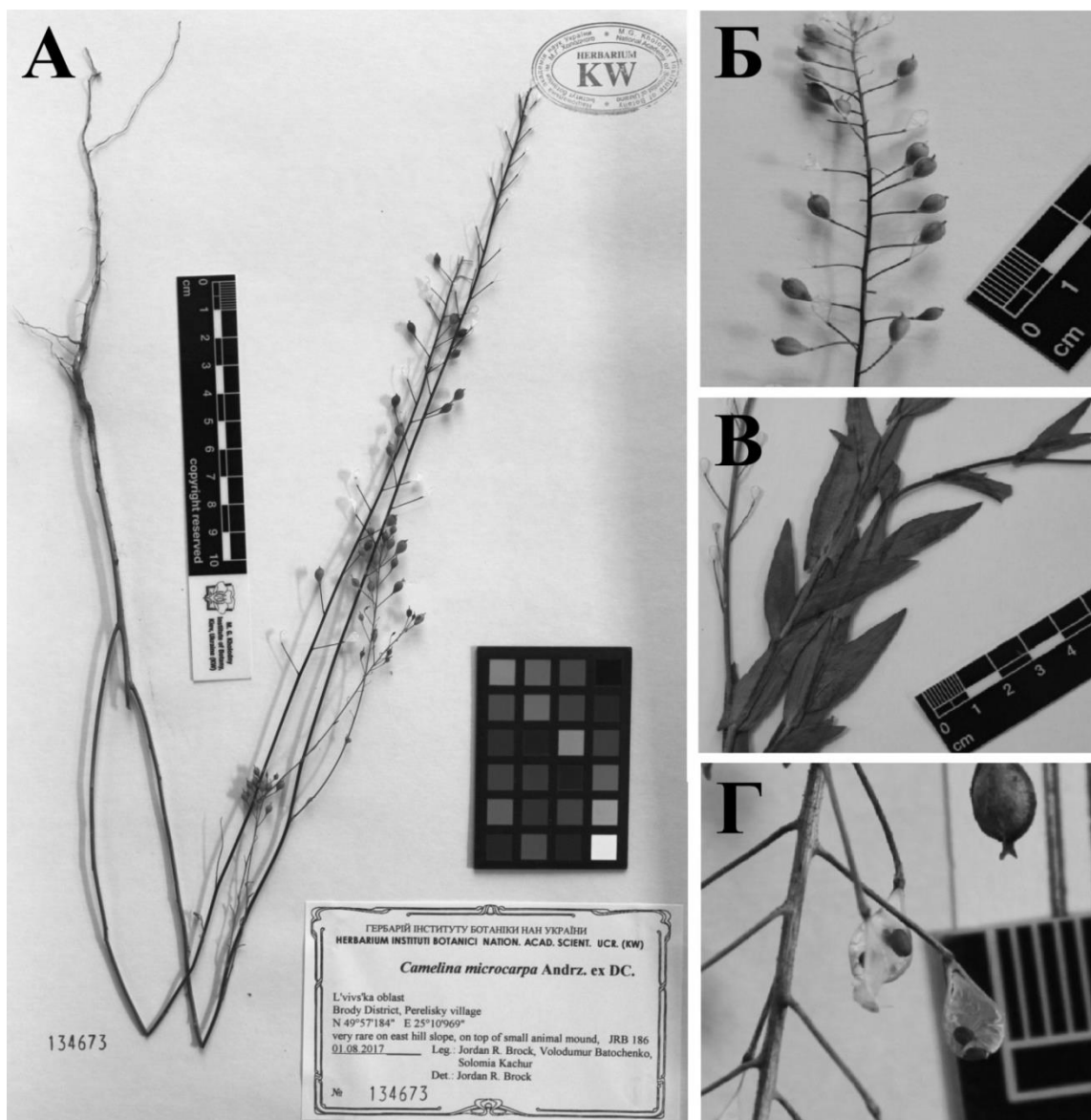


Рис. 1. Загальний вигляд рижю дрібноплідного: А – зразок (KW134673), зібраний на стадії дозрівання насіння, листки повністю відсутні; Б – дозрілі стручечки (KW134674); В – добре обліснений зразок (KW005506); Г – осипані стручечки із залишковими насінинами (KW134674).

Зважаючи на всі вищезгадані особливості молекулярно-генетичного аналізу гербарного матеріалу, метою нашого дослідження було порівняння ефективності методів виділення ДНК з гербарних зразків та їх подальша модифікація для покращення.

Матеріали і методи

Для досліджень були використані зразки рижию дрібноплодою з Національного гербарію України – гербарію Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України (міжнародний акронім KW, за *Index Herbariorum*, <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>): 10 зразків насіння із Львівської, Тернопільської та Івано-Франківської областей, 2017 року збору; 12 зразків листків із Львівської, Тернопільської, Кіро-

воградської, Харківської, Вінницької, Черкаської, Дніпровської, Запорізької, Київської областей та міста Києва різних років збору (найстарший – 1863 року) (табл. 1).

Для виділення ДНК з гербарного матеріалу було використано традиційний метод ЦТАБ та DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), який у багатьох джерелах рекомендується для виділення ДНК з гербарного матеріалу [9]. Оскільки переважна більшість використаних нами зразків була невеликою, вихід ДНК у багатьох випадках був недостатнім для визначення концентрації за допомогою біофотометра «Eppendorf» або шляхом електрофорезу в 1,5% агарозному гелі, тому остаточним критерієм успішного виділення ДНК вважався успішний перебіг ПЛР.

Таблиця 1. Зразки, використані у дослідженні, їх місце походження та дата збору

№	Тип матеріалу	Назва зразка	Код зразка	Місце походження	Дата збору
1	Насіння	JRB 184	134672	3 км на схід від с. Куровичі, Золочівський район (Львівська обл.)	2017
2	Насіння	JRB 186	134673	с. Переліски, Бродівський район (Львівська обл.)	2017
3	Насіння	JRB 187	134674	с. Підгайчики, Золочівський район (Львівська обл.)	2017
4	Насіння	JRB 189	134675	м. Кременець, (Тернопільська обл.)	2017
5	Насіння	JRB 191	134676	м. Тальне (Черкаська обл.)	2017
6	Насіння	JRB 192	134677	6 км на південний захід від м. Жашків (Черкаська обл.)	2017
7	Насіння	JRB 193	134678	між с. Городок та с. Леухи (Вінницька обл.)	2017
8	Насіння	JRB 194	134679	сmt. Теплик (Вінницька обл.)	2017
9	Насіння	JRB 196	134680	між с. Шляхова та с. Джулинка (Вінницька обл.)	2017
10	Насіння	JRB 197	134681	с. Станіславове, Благовіщенський район (Кіровоградська обл.)	2017
11	Листок	-*	140071	західна околиця с. Куликівське, Бердянський район (Запорізька обл.)	2013
12	Листок	-	140096	Південно-західна околиця с. Добровілля, Васильківський район (Дніпровська обл.)	2019
13	Листок	-	133416	сmt. Ков'яги (Харківська обл.)	2014
14	Листок	-	1461	3,2 км на північний схід від м. Куп'янськ (Харківська обл.)	1912
15	Листок	-	-	Околиця м. Харків (Харківська обл.)	1921
16	Листок	-	-	с. Бірки, Зміївський район (Харківська обл.)	1922
17	Листок	-	-	с. Бірки, Зміївський район (Харківська обл.)	1922
18	Листок	-	-	м. Харків (нинішній район Журавлівка), (Харківська обл.)	1863
19	Листок	-	005505	м. Київ (залізниця біля Байкового кладовища)	1921
20	Листок	-	005506	м. Київ (залізниця біля Байкового кладовища)	1921
21	Листок	-	-	м. Київ (залізниця біля Байкового кладовища)	1921
22	Листок	-	-	Правобережний Лісостеп	1921

Примітка. * – інформація відсутня.

ПЛР проводили за допомогою ампліфікатора Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, США), використовуючи вироджені праймери для ТВР-аналізу (Tubulin-Based Polymorphism). Ці вироджені праймери підібрані до ділянок генів тубуліну, що фланкують І інтрон, та є консервативними у всіх квіткових рослин [10]. Раніше нами ТВР-метод було застосовано для молекулярно-генетичного аналізу рижію посівного [11].

Реакційна суміш (об'ємом 10 мкл) містила 1–5 мкл рослинної ДНК, виділеної з насіння, листків тощо. Умови проведення ампліфікації вже були опрацьовані на низці інших рослинних об'єктів, у тому числі й на *C. sativa*, тому реакцію проводили за таким протоколом: початкова денатурація (94°C) – 3 хв; 40 циклів ампліфікації (94°C – 30 с, 55°C – 40 с, 72°C – 1 хв 30 с); кінцеве подовження за 72°C протягом 8 хв, утримання за 15°C [10]. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 6% неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1xTBE-буфері. Фрагменти ДНК візуалізували шляхом фарбування гелю нітратом срібла [11]. Довжину відтворених фрагментів ДНК визначали, використовуючи ДНК-маркер O'Gene Ruler™ 50 bp та 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва).

Результати та обговорення

Одним із найважливіших етапів виділення ДНК з гербарних зразків є правильна гомогенізація рослинного матеріалу, що особливо важливо у випадках, коли планується виділення ДНК з частково відмерлих ще на етапі збирання тканин – таких, як стулки стручечків рижію (рис. 1). Неправильна гомогенізація такого матеріалу унеможливило нормальний лізис цих тканин, що призводить до суттєвого зниження виходу ДНК. Також у тих випадках, коли використовується невелика кількість зразка, рекомендується використовувати тривалішу або повторну інкубацію [9, 12].

Раніше було встановлено, що ДНК, виділену з гербарних зразків, на кінцевому етапі краще ампліфікувати у буфері для елюювання (TE або AE буфер), ніж у воді, тоді як ДНК зі свіжих листків – краще у воді [13]. Також зазначають, що виділену гербарну ДНК краще зберігати короткочасно за -20°C (-25°C) у AE або TE буфері, а довготривало – за -80°C [9, 14]. Враховуючи це все, нами були використані та част-

ково модифіковані такі методи виділення ДНК з гербарних зразків [12, 14–16]:

1) ЦТАБ метод, модифікований для виділення ДНК з гербарних зразків [12]. Застосування модифікації такого методу не дало позитивних результатів під час виділення ДНК з усіх проаналізованих нами зразків;

2) DNeasy Plant Mini Kit (QIAgen) – модифікація № 1.

Порівняно зі стандартним протоколом, у цій модифікації було збільшено час інкубації до 30 хв, а кількість використовуваного буфера AP1 (тут і далі назви реагентів відповідають зазначеним у наборі DNeasy) до 450 мкл (замість 400 мкл), зменшено кількість AE буфера до 30 мкл (замість 100 мкл) та збільшено час елюювання до 10 хв (замість 5 хв);

3) DNeasy Plant Mini Kit (QIAgen) – модифікація № 2.

Час інкубації становив 60 хв, 450 мкл AP1 буфера, 4 мкл RNaseA додавали у пробірку перемішували на вортексі. Після етапу лізису додавали 130 мкл P3 буфера та інкубували 60 хв (замість 5 хв) за 4°C. Попередні дослідження встановили, що подібна модифікація цього етапу сприяє кращому осадженню білків та полісахаридів [15]. Для елюювання ДНК додавали 30 мкл AE буфера на 10 хв;

4) DNeasy Plant Mini Kit (QIAgen) – модифікація № 3.

Етап лізису та інкубація на льоду тривали по 60 хв кожний. У проби додавали по 450 мкл AP1 буфера. Елюювання здійснювали 2 рази (перед центрифугуванням) по 30 хв з додаванням 30 мкл AE буфера. Збільшення загального часу елюювання до 60 хв було рекомендовано раніше [16];

5) DNeasy Plant Mini Kit (QIAgen) – модифікація № 4.

У гомогенізовані у рідкому азоті проби додавали по 500 мкл буфера AP1 [14] (замість 400 мкл із зазначених у стандартному протоколі). Інкубували за 60°C протягом 60 хв. На останньому етапі елюювання перед використанням AE буфера (30 мкл) останній нагрівали до 60°C.

У результаті виділення зразків ДНК за допомогою методів 2–5 отримано схожі результати: амплікони всіх зразків добре ідентифікувалися на електрофореграмі (рис. 2). Серед 12 зразків листків, ДНК з яких було виділено за допомогою методу DNeasy Plant Mini Kit (QIAgen) № 1, чіткі смуги ампліконів були ви-

явлені лише у пробах зразків 11, 12, 18, 20, що свідчить про успішність виділення з них ДНК у високій концентрації (рис. 3).

Ампліфіковані фрагменти інтронів β -тубуліну зразків 13, 16, 22 були не зовсім чіткими, що також свідчить про успішне виділення ДНК, хоча і у дещо нижчій концентрації. Водночас для проб 14, 15, 17, 19, 21 за електрофоретичного розділення продуктів ПЛР не було виявлено жодного амплікону, що вказує на відсутність ДНК у цих пробах. Варто відзначити, що використаний підхід дозволив виділити ДНК із найстарішого гербарного зразка серед використаних нами (зразок 18 у табл. 1 – 1863 р. збору), а також з декількох зразків віком понад 100 років (20 та 22, обидва 1921 р. збору). Разом із тим не було отримано ДНК із зразків 15, 19, 21 (також 1921 р.), тому можна дійти висновку, що вік зібраного зразка не завжди однозначно впливає на кількість та якість виділеної ДНК.

На Рис. 4 видно, що за допомогою методу DNeasy Plant Mini Kit (QIAgen) (модифікація № 2) вдалося виділити ДНК у значній концентрації зі зразка 16, оскільки його амплікони видно набагато чіткіше на електрофореграмі (рис. 4), на відміну від проби цього ж зразка, з якої ДНК було екстраговано за допомогою методу № 1. Подібна різниця свідчить про те, що подовження попередньої інкубації засушеної рослинної тканини позитивно впливає на ефективність виділення ДНК. Незважаючи на це, за допомогою методу DNeasy Plant Mini Kit (QIAgen) №2

не вдалося виділити ДНК із зразків 13–15, 17–19, 21 та 22. Оскільки переважна частина цих зразків погано підлягала виділенню ДНК за допомогою й інших методів, можна зробити висновок, що ДНК у зазначених зразках зазнала більш суттєвої деградації. Це явище можна пояснити або відмінностями в умовах зберігання колекції, або ж використанням, можливо, іншого способу засушення зразків, оскільки серед зазначених вище проб є не надто старий зразок, 2014 р. збору (13 проба). Однією з можливих причин поганої збереженості ДНК може бути проведена раніше термічна дезінсекція, або термічне підсушування зразків.

Збільшення часу інкубування засушених тканин до 12–16 год за 45°C у термостаті не надало суттєвих переваг у виділенні ДНК з проб, у яких вона, імовірно, була деградована. Під час використання методу із суттєво подовженим інкубуванням для виділення ДНК з «неуспішних» проб (наведених на рис. 4) вдалося отримати позитивний результат лише для зразка 22. Метод DNeasy Plant Mini Kit № 3 та № 4, за якого був збільшений час інкубування на льоду та час елюювання відповідно, не призводив до виділення зразків із деградованою ДНК. Інші зразки, виділення ДНК з яких було успішним за використання інших методів, так само ефективно були використані для екстрагування ДНК за допомогою модифікацій № 3 та № 4 методу DNeasy Plant Mini Kit.

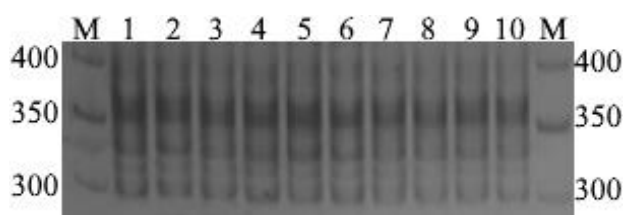


Рис. 2. Електрофореграма зразків насіння *C. microcarpa*: 1–10 – відповідні гербарні зразки (з табл. 1), виділені за методом DNeasy Plant Mini Kit № 1; М – ДНК-маркер «50bp Ladder».

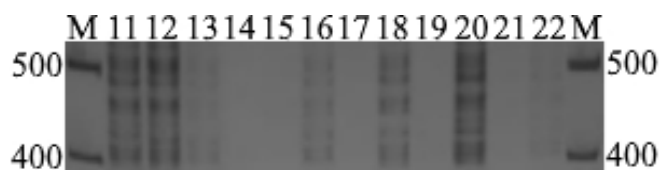


Рис. 3. Електрофореграма зразків листків *C. microcarpa*: 11–22 – гербарні зразки, виділені за методом DNeasy Plant Mini Kit № 1; М – ДНК-маркер «100bp Plus Ladder».

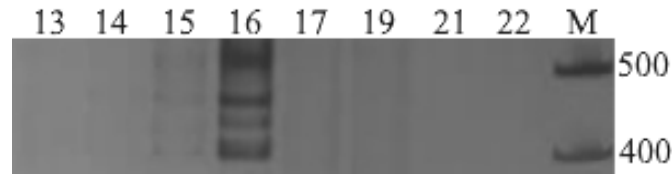


Рис. 4. Електрофореграма зразків листків *C. microcarpa*: 13–17, 19, 21, 22 – гербарні зразки, виділені за методом DNeasy Plant Mini Kit № 2, М – ДНК-маркер «100bp Plus Ladder».

Висновки

Отже, нами були проаналізовані п'ять модифікацій різних методів виділення ДНК з гербарного матеріалу *C. microcarpa*, найефективнішим із яких виявився метод DNeasy Plant Mini Kit (QIAgen) № 2, за якого був збільшений час інкубування рослинного матеріалу до 1 год (замість стандартних 10 хв, зазначених у протоколі цього набору). Успішність виділення ДНК не залежала безпосередньо лише від віку зразка. ДНК була успішно виділена як із зразків, зібраних у 20–21 ст., так і зі зразка 1863 р. збору. Водночас виділення ДНК з великої кількості зразків 1921–1922 рр. давало як позитивний, так

і негативний результати. Це додатково підтверджує думку про те, що на якість збереження ДНК у гербарних зразках більшою мірою впливають методи засушення рослин чи умови зберігання (у тому числі проведена раніше можлива термічна обробка з метою боротьби з гербарними шкідниками), а не лише тривалість зберігання матеріалу у колекції. Найкраще на вихід ДНК вплинуло подовження етапу лізису.

Робота виконана в рамках проекту для дослідницьких груп молодих учених НАН України «Генетичне різноманіття та популяційно-генетична структура рижю дрібноплідного в українській частині його центру походження» (2022–2023 рр.).

References

1. Brock J.R., Scott T., Lee A.Y., Mosyakin S.L., Olsen K.M. Interactions between genetics and environment shape *Camelina* seed oil composition. *BMC Plant Biol.* 2020. Vol. 20 (1). P. 1–15. doi: 10.1186/s12870-020-02641-8.
2. Brock J.R., Dönmez A.A., Beilstein M.A., Olsen K.M. Phylogenetics of *Camelina* Crantz. (*Brassicaceae*) and insights on the origin of gold-of-pleasure (*Camelina sativa*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 2018. Vol. 127. P. 834–842. doi: 10.1016/j.ympev.2018.06.031.
3. Andreassen K., Manktelow M., Razafimandimbison S.G. Successful DNA amplification of a more than 200-year-old herbarium specimen: recovering genetic material from the Linnaean era. *Taxon.* 2009. Vol. 58 (3). P. 959–962. doi: 10.1002/tax.583023.
4. Telle S., Thines M. Amplification of *cox2* (~ 620 bp) from 2 mg of up to 129 years old herbarium specimens, comparing 19 extraction methods and 15 polymerases. *PLoS One.* 2008. Vol. 3 (10). P. e3584. doi: 10.1371/journal.pone.0003584.
5. Staats M., Cuenca A., Richardson J. E., Vrieland-van Ginkel R., Petersen G., Seberg O., Bakker F.T. DNA damage in plant herbarium tissue. *PLoS One.* 2011. Vol. 6 (12). P. e28448. doi: 10.1371/journal.pone.0028448.
6. Srinivansan M., Sedmak D., Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am. J. Pathol.* 2002. Vol. 161 (6). P. 1961–1971. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64472-0.
7. Pääbo S., Poinar H., Serre D., Jaenicke-Despres V., Hebler J., et al. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.* 2004. Vol. 38. P. 645–679. doi: 10.1146/annurev.genet.37.110801.143214.
8. Stiller M., Green R.E., Ronan M., Simons J.F., Du L., et al. Patterns of nucleotide misincorporations during enzymatic amplification and direct largescale sequencing of ancient DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2006. Vol. 103. P. 13578–13584. doi: 10.1073/pnas.0605327103.
9. Drábková L.Z. DNA extraction from herbarium specimens. In: Besse P. (ed.). *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols*. New York: Springer, 2014. [Methods in Molecular Biology series. Vol. 1115. P. 69–84. doi: 10.1007/978-1-62703-767-9_4.
10. Bardini M., Lee D., Donini P., Mariani A., Giani S., Toschi M., Lowe C., Breviario D. Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. *Genome.* 2004. Vol. 47. P. 281–291.
11. Blume R.Y., Rabokon' A.M., Postovoitova A.S., Demkovich A.Ye., Pirkov Ya.V., Yemets A.I., Rakhmetov D.B., Blume Ya.B. Evaluating the diversity and breeding prospects of Ukrainian spring camelina genotypes. *Cytol. Genet.* 2020. Vol. 54 (5). P. 420–436.
12. Drábková L., Kirschner J., Vlček Č. Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of *Juncaceae*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2002. Vol. 20 (2). P. 161–175. doi: 10.1007/BF02799431.
13. Zviahin A.S. Extraction of DNA from herbarium leaves of *Vitis vinifera* L. *Polythematic Network Electronic Sci. J. Kuban State Agr. Univ.* 2010. Vol. (58). P. 436–447. [in Russian]
14. Lambertini C., Frydenberg J., Gustafsson M.H.G., Brix H. Herbarium specimens as a source of DNA for AFLP fingerprinting of *Phragmites* (Poaceae): possibilities and limitations. *Plant Syst. Evol.* 2008. Vol. 272 (1). P. 223–231. doi: 10.1007/s00606-007-0633-z.

15. Costa C.M., Roberts R.P. Techniques for improving the quality and quantity of DNA extracted from herbarium specimens. *Phytoneuron*. 2014. Vol. 2014–2048. P. 1–8. Retrieved from: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/177125#page/1/mode/1up>.
16. Marinček P., Wagner N.D., Tomasello S. Using herbarium samples for NGS methods – a methodological comparison. *bioRxiv*. 2021. doi: 10.1101/2021.08.26.457828.

SAKHAROVA V.H.¹, BLUME R.Ya.^{1,2}, RABOKON A.N.¹, PIRKO Ya.V.¹, MOSYAKIN S.L.³, BLUME Ya.B.¹

¹ *Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskogo str., 2a*

² *Educational and Scientific Center "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine, 03022, Kyiv, Akademika Glushkova ave., 2*

³ *M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine, Ukraine, 01004, Kyiv, Tereshchenkivska str., 2*

COMPARISON OF METHODS OF DNA EXTRACTION FROM HERBARIUM SPECIMENS OF LITTLE-POD FALSE FLAX (*CAMELINA MICROCARPA* Andr. ex DC.)

Aim. The aim of this research was to compare the efficiency of DNA isolation methods from herbarium specimens of *Camelina microcarpa* Andr. Ex DC., further modification of these methods to increase DNA yield, and determine the method that would provide the best yield of isolated DNA. **Methods.** Modifications of the DNA isolation methods using the DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) and the CTAB method were used. PCR was performed using degenerate primers for method of β -tubulin intron length polymorphism (TBP). Amplicons were fractionated in polyacrylamide gel followed by visualization by silver nitrate staining. **Results.** DNA was successfully extracted from *C. microcarpa* herbarium specimens sampled with leaf parts and seeds, using the modified by CTAB method, and four modified methods using DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). **Conclusions.** The study revealed that the most effective method tested was the DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) No. 2. Prolongation of the cell lysis stage had the best effect on the increase of DNA yield. We found that the success of DNA isolation was influenced not so much by the age of the herbarium specimen as by the methods of drying and storing the plants in the collection.

Keywords: *Camelina microcarpa*, Andr. ex DC., little-pod false flax, DNA isolation, herbarium DNA, herbarium specimens.