

Научная статья

УДК 577.2.08

<https://doi.org/10.25686/2306-2827.2022.1.69>

Подбор и оптимизация методов экстракции ДНК из различного растительного материала

А. А. Попова[✉], Т. А. Гродецкая, В. В. Молчанов, П. М. Евлаков

Воронежский государственный лесотехнический университет имени Г.Ф. Морозова,

Российская Федерация, 394087, Воронеж, ул. Тимирязева, 8

E-mail: logachevaaa@rambler.ru[✉]

Введение. ДНК-экстракция из древесных растений может вызывать сложности из-за большого количества метаболитов в образцах. В молекулярно-генетических исследованиях древесных часто в качестве образцов используются не только свежие материалы, но и гербарные образцы, замороженный материал. Листья дубов в качестве материала для экстракции нуклеиновых кислот являются сложным объектом в связи с тем, что в них отмечается высокая интенсивность синтеза вторичных метаболитов. При анализе растений, растущих в природной среде, среди растительных образцов наиболее часто применяемыми являются листья, также используются почки, камбий и различные части семян и проростков. **Целью** исследования явилась апробация коммерческих наборов для выделения ДНК и модификаций СТАВ-метода для разного растительного материала р. *Quercus*. В качестве **объекта исследования** использовали листья, почки и камбиальный слой побегов. **Результаты.** Проведён сравнительный анализ методик экстракции ДНК из образцов дуба различного географического происхождения и видовой принадлежности. Проанализированные методы выделения основаны на использовании СТАВ в качестве основного компонента лизирующего буфера. Основные модификации затронули изменение концентрации действующих компонентов лизирующего буфера и времени инкубации образцов в ходе стадии гомогенизации. **Выводы.** Модификации стандартного протокола позволяют получить более чистые для анализа препараты ДНК по соотношению оптической плотности 260/280 и 260/230. Применение набора колонок на выделенных образцах ДНК способствует избавлению от примесей РНК и полисахаридов, снижающих качество ДНК-препаратов. Апробация модифицированных протоколов СТАВ-метода и коммерческих наборов для выделения показала необходимость увеличения РVP в составе лизирующего буфера и времени инкубации гомогенатов образцов для достижения качественной ПЦР амплификации. Использование модифицированного метода с 7 % РVP в составе лизирующего буфера позволяет проводить амплификацию специфических к ITS-последовательности праймеров для полимеразной цепной реакции.

Ключевые слова: выделение ДНК; ПЦР; оптическая плотность; коммерческие наборы; СТАВ-буфер; р. *Quercus*

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Воронежской области в рамках научного проекта № 19-44-363001\20 и Гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ – 2535.2020.11

Введение. Развитие технологий, позволяющих расшифровывать геномные последовательности растений, привело к возможности уточнения классической систематики растений, открыло новые инструменты селекции растений на основе создания библиотек маркерных генов, уточнять филогенетические связи, открывая возможности для идентификации экотипов и географических культур. В настоящее время ДНК-маркеры имеют широкое применение для улучшения знаний о

© Попова А. А., Гродецкая Т. А., Молчанов В. В., Евлаков П. М., 2022.

Для цитирования: Попова А. А., Гродецкая Т. А., Молчанов В. В., Евлаков П. М. Подбор и оптимизация методов экстракции ДНК из различного растительного материала // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Сер: Лес. Экология. Природопользование. 2022. № 1 (53). С. 69–77. <https://doi.org/10.25686/2306-2827.2022.1.69>

генетической структуре растений, таких как идентификация родителей, оценка изменчивости [1], подтверждение наследования признака и соответственно отбор посадочного материала с улучшенными генетическими свойствами, что является одним из условий интенсификации роста лесных культур [2].

Первым этапом для генотипирования является сбор образцов и экстракция ДНК. При анализе растений среди образцов наиболее часто используются листья, а также почки, камбий и различные части семян и проростков.

Для дуба черешчатого, являющегося ключевой лесобразующей лиственной породой Центральной России, в настоящее время уже достигнуты определённые результаты в области разделения популяций, ценопопуляций, районов географического происхождения [3], экотопов [4]. Развитие направлений генетических исследований позволит выстраивать стратегию формирования искусственных древостоев в зависимости от типа экотопа, гетерозиготности популяции.

Листья дуба как материал экстракции нуклеиновых кислот являются сложным объектом. Это связано с большим содержанием в них вторичных метаболитов фенолпропаноидной структуры – флавонолов и конденсированных танинов [5]. Химический состав среди видов дубов различается, особенно по части содержания танинов (в виде общих фенолов), конденсированных дубильных веществ и способностью к связыванию белка. Уровень танина самый высокий в молодых листьях и снижается в старых листьях [6]. В коре дуба методом хромато-масс-спектрометрии определены 60 соединений, наибольшее содержание приходится на долю стероидов, фенолов, спиртов [7]. Присутствие данных веществ затрудняет получение чистой ДНК, что впоследствии затрудняет проведение полимеразной цепной реакции.

Общепринятым методом экстракции ДНК для растительных материалов, в том числе для р. *Quercus*, является СТАВ

(cetyl trimethylammonium bromide)-метод. Существующие отечественные коммерческие наборы отличаются простотой проведения экстракции и снижением затрат по времени на анализ. Однако коммерческие методики зачастую не позволяют добиться высокоповторяемых результатов, которые могут различаться для образцов различных видов внутри рода. В связи с этим необходима разработка универсального метода выделения ДНК для работы с образцами различных видов древесных растений, в том числе таких пород, как дуб.

Целью исследования явилась апробация двух отечественных коммерческих наборов для выделения ДНК и модификаций СТАВ-метода для разного растительного материала р. *Quercus*.

Объекты и методы исследования. В качестве биоматериала были использованы листья, почки и камбиальный слой побегов.

Сбор биоматериала проводили с взрослых деревьев дуба черешчатого (*Q. robur*) (V55); дуба черешчатого с пирамидальной формой кроны, дуба черешчатого (*Q. robur*) (климатип Дагестана), дуба красного (*Q. rubra*) – Rub, пушистого (*Q. pubescens*) – Pub, монгольского (*Q. mongolica*) – Mong, каштанолистного (*Q. castaneifolia*), отобранных на территории Воронежа и Воронежской области.

Для экстракции использовали ряд коммерческих методик и различные модификации стандартного СТАВ-метода [8]. Состав СТАВ-буфера (Б1): (2 % (масса / объём) ЦТАБ; 0.1 М Tris-HCl (pH 8.0); 1.4 М NaCl; 20 mM EDTA (pH 8.0); 2 % (масса / объём) PVP);

СТАВ-буфера (Б2): (2 % (масса / объём) ЦТАБ; 0.1 М Tris-HCl (pH 8.0); 1.4 М NaCl; 20 mM EDTA (pH 8.0); 7% (масса / объём) PVP (polyvinylpyrrolidone)).

0,1 % β-меркаптоэтанола (МЭ) добавляли в среду выделения непосредственно при гомогенизации образцов.

Стандартный СТАВ-метод

1. Навеску образца ткани (почки, листья или камбий) 100 мг растирали с по-

догретым до 65 °С СТАВ-буфером (Б1) в объёме 1,5 мл с использованием ступки и пестика. Гомогенат переносили в 2 мл пробирку.

2. Инкубировали 15 минут при 65 °С в твердотельном термостате, периодически помешивая.

3. Добавляли равный объём хлороформа, центрифугировали 10 минут 13 000 об/мин при охлаждении до 4 °С.

4. Отобрали надосадок, перенесли в новую пробирку, добавили равный объём смеси хлороформа и изоамилового спирта (24:1).

5. Повторили центрифугирование при тех же параметрах, отобрали надосадок, перенесли в новую пробирку.

6. Добавили 2 объёма холодного 96 % этанола, тщательно перемешали, не допуская энергичного встряхивания

7. Инкубировали пробы при -20 °С в течение 1 ч.

8. Центрифугировали 10 мин 13 000 об/мин при 4 °С.

9. Надосадок удаляли и осадок промывали 70 % этиловым спиртом (800 мкл).

10. Осадок просушивали и растворяли в 50 мкл деионизированной воды. Выделенную ДНК хранили при -80 °С и использовали для дальнейших манипуляций.

Ускоренный СТАВ-метод

Гомогенизацию и инкубацию образцов проводили по стандартной методике с СТАВ-буфером (Б1). Время центрифугирования на стадиях очистки с использованием хлороформа и его смеси с изоамиловым спиртом при 10 000 об/мин снизили до 1 минуты. После очистки сразу центрифугировали пробы без стадии охлаждения при -20 °С. Далее выделение вели по стандартной методике.

Методика с увеличенным временем инкубации СТАВ-буфером

В данной модификации использовали СТАВ-буфер с повышенным содержанием РVP (Б2). После гомогенизации время инкубации проб при 65 °С увеличили до 70 минут. Далее экстракцию вели по стандартной методике.

Модификация СТАВ-буфера

В качестве среды выделения использовали СТАВ-буфер с 7 % РVP (Б2). Выделение проводили по методике с увеличенным временем инкубации (1 ч) образцов после стадии гомогенизации.

Выделение с использованием коммерческого набора «Проба ГС» (ДНК-технология, Россия)

Гомогенизировали 50 мг пробы с 200 мкл подогретого при 50 °С в течение 15–20 мин лизирующего буфера, отобрали 50 мкл в новую пробирку. Добавили 150 мкл лизирующего буфера и 20 мкл сорбента, перемешали на вортексе. Центрифугировали при 16 000 g 1 мин. Надосадок удалили, осадок растворили в 200 мкл промывочного раствора № 1, перемешали. Центрифугировали при 16 000 g 1 мин. Надосадок удалили, к осадку добавили 200 мкл промывочного раствора № 2, перемешали, центрифугировали 13 000 g 1 мин. Надосадок отобрали, осадок растворили в промывочном растворе № 3, перемешивая на вортексе. Центрифугировали при 16 000 g 1 мин. Надосадок удалили, осадок просушили в термостате при 50 °С 5 минут.

Доочистка ДНК на колонках

Выделенную с использованием СТАВ-буфера (Б1 и Б2) по стандартной методике ДНК очищали с использованием набора спин-колонок diaGene (Диаэм, Россия). Доводили пробы в объёме 50 мкл до 100 мкл путём внесения буфера для выделения РLV-1 от коммерческого производителя и добавляли 350 мкл РВВ-1 буфера. Смесь перенесли на колонки и центрифугировали 13 000 об/мин в течение 1 мин. Фильтрат удалили. Далее микроколонки перенесли в новые пробирки. Нанесли 500 мкл РWВ-1 буфера, повторили центрифугирование. Фильтрат удалили, на колонки наслоили 650 мкл РWВ-1 буфера и повторили центрифугирование. Фильтрат удалили, повторили стадию с добавлением РWВ-1 буфера. После удаления фильтрата центрифугировали пустые колонки для удаления остатков промывочного раствора. Перенесли колонки в

новые пробирки 1,5, наслоили 50 мкл деионизированной воды. Инкубировали 2 минуты при комнатной температуре, затем элюировали ДНК центрифугированием в течение 1 мин при 13 000 об/мин. Полученную ДНК хранили при -80 °С и использовали в ходе дальнейшего анализа.

Проведение полимеразной цепной реакции. Для амплификации участка ДНК, содержащего участки ITS1 и ITS2 эукариотических микроорганизмов, использовали праймеры:

- 1) прямой ITS1 –
TCCGTAGGTGAACCTGCGG;
- 2) обратный ITS4 –
TCCTCCGCTTATTGATATGC.

Смешивали в пробирке на 0,2 мл следующие компоненты:

деионизированная вода – 16 мкл;

ДНК-матрица – 2 мкл;

прямой праймер – 1 мкл (из раствора с концентрацией праймера 10 мкМ);

обратный праймер – 1 мкл (из раствора с концентрацией праймера 10 мкМ);

5x ScreenMix-HS буфер (Евроген, Россия) – 5 мкл.

Помещали пробирки в амплификатор (Eppendorf MasterCycler Personal), запускали программу: первоначальный прогрев при 95 °С – 5 мин; 37 циклов: денатурация при 95 °С в течение 30 сек; отжиг праймеров при 54 °С в течение 30 сек; элонгация цепи при 72 °С в течение 45 сек; инкубирование смеси при 72 °С в течение 5 мин.

После окончания реакции проверяли наличие продукта ПЦР при помощи электрофореза в агарозном геле.

Электрофорез в агарозном геле. Для анализа продуктов ПЦР использовался электрофорез в 2 % агарозном геле.

Визуализацию результатов электрофореза проводили на трансиллюминаторе при длине волны 312 нм.

Результаты и их обсуждение. Метод выделения ДНК с использованием СТАВ-буфера, изначально предложенный Doyle J.J. и Doyle J.L. [8], в настоящее время претерпел значительное количество модификаций. Изменения заключаются,

прежде всего, в варьировании компонентов лизирующего буфера, изменения времени температурной инкубации и стадий очистки. Нарастающую популярность приобретают комбинированные (с использованием традиционных методов и коммерческих наборов) методы.

Ряд методов был апробирован для выделения ДНК из образцов дуба, относящихся к различным видам или являющихся географическими культурами. Результат выделения представлен на рис. 1.

Выделение нуклеиновых кислот из травянистых растений легко осуществимо с помощью коммерческих наборов, использующих силикатные мембраны, однако для многих древесных растительных видов они оказываются практически неприменимыми. Для древесных растительных объектов наиболее применимым оказался метод с использованием СТАВ и PVP в составе лизирующего буфера [9]. PVP обычно используется как абсорбент ПЦР-ингибирующих веществ, таких как полифенолы [10].

Использование стандартного метода выделения, а также модификации лизирующего буфера и увеличение времени инкубации гомогената не позволяют провести полную очистку от примесей РНК и полисахаридов для образцов дуба, в то же время их количество значительно снижается. Использование набора колонок позволяет получить свободную от примесей ДНК, что отражается на показателях оптической плотности, однако также сказывается на концентрации, в сторону её снижения (см. табл., стр. 73).

Измерение оптической плотности образцов показало сниженные значения (ниже 1,8) всех образцов для соотношения 260/280 и значительно более низкие значения для 260/230 [11] (см. табл., стр. 73).

Ускоренный метод выделения с использованием СТАВ-буфера значительно сокращает время экстракции, однако качество образцов также снижается по сравнению со стандартным методом. Спектрофотометрический анализ показывает наличие значительного количества примесей в образцах (см. табл., стр. 73).

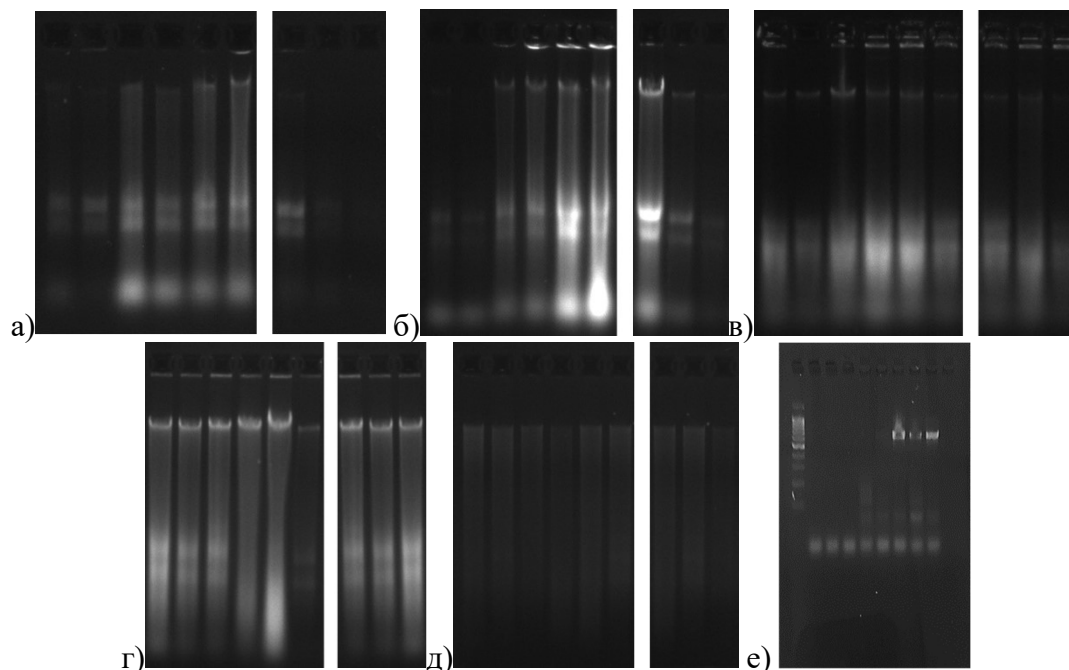


Рис. 1. Электрофореграммы образцов ДНК, выделенных: а) по стандартной методике; б) по ускоренной методике без охлаждения; в) увеличение времени инкубации; г) модификация СТАВ-буфера; д) доочистка на колонках; е) проба ГС. Слева направо ДНК образцов: *Q. robur* Pyramidalis, *Q. robur* (Дагестанский), *Q. rubra*, *Q. pubescens*, *Q. mongolica*, *Q. castaneifolia*, *Q. robur* V55 (листья), *Q. robur* V55 (почки), *Q. robur* V55 (камбий)

Fig. 1. Electropherogram of DNA samples, extracted using а) a standard procedure; б) an accelerated procedure without cooling; в) an incubation time increase; г) a CTAB buffer modification; д) afterpurification in columns; е) GS proба. From left to right (DNA samples): *Q. robur* Pyramidalis, *Q. robur* (Daghestanian), *Q. rubra*, *Q. pubescens*, *Q. mongolica*, *Q. castaneifolia*, *Q. robur* V55 (leaves), *Q. robur* V55 (buds), *Q. robur* V55 (cambium)

Сравнительная оценка соотношений 260/280 и 260/230 для ДНК, выделенной из различных образцов и тканей дуба

Comparative evaluation of the 260/280 and 260/230 ratios for DNA, extracted from various oak samples tissues

Образец	Стандартный СТАВ-метод	Ускоренный СТАВ-метод	Увеличение времени инкубации	Модификация СТАВ-буфера 7% PVP	«Проба ГС»	Доочистка ДНК на колонках
A260/280						
<i>Q. robur</i> Pyramidalis	1,42	0,95	1,57	1,80	1,01	2,00
<i>Q. robur</i> (Дагестанский)	1,74	0,85	1,80	1,82	1,08	2,00
<i>Q. rubra</i>	1,59	0,94	1,78	1,71	1,03	2,00
<i>Q. pubescens</i>	1,58	0,63	1,78	1,80	0,85	2,00
<i>Q. mongolica</i>	1,62	0,65	1,58	1,75	0,68	4,00
<i>Q. castaneifolia</i>	1,41	0,71	1,65	1,64	0,77	3,00
<i>Q. robur</i> (V55)	1,25	1,19	1,75	1,75	1,2	2,00
<i>Q. robur</i> (V55)*	1,69	1,19	1,80	1,85	1,4	2,00
<i>Q. robur</i> (V55)**	1,60	1,17	1,78	1,78	1,25	2,00
260/230						
<i>Q. robur</i> Pyramidalis	1,42	0,95	0,61	0,82	1,1	0,29
<i>Q. robur</i> (Дагестанский)	1,62	0,85	0,75	0,80	1,25	2,00
<i>Q. rubra</i>	1,80	0,88	1,58	0,89	1,03	2,00

Окончание таблицы

Образец	Стандартный СТАВ-метод	Ускоренный СТАВ-метод	Увеличение времени инкубации	Модификация СТАВ-буфера 7% PVP	«Проба ГС»	Доочистка ДНК на колонках
<i>Q. pubescens</i>	0,90	0,91	1,26	0,90	0,85	0,67
<i>Q. mongolica</i>	0,59	0,65	1,12	1,17	0,75	4,00
<i>Q. castaneifolia</i>	0,73	0,75	1,04	0,82	0,68	0,38
<i>Q. robur</i> (V55)	0,63	2,44	1,27	0,57	1,10	0,67
<i>Q. robur</i> (V55)*	0,95	2,60	1,35	0,65	0,68	0,67
<i>Q. robur</i> (V55)**	0,80	2,80	1,33	0,63	0,67	0,67

Примечание: в таблице представлены данные для ДНК-образцов, полученных из листьев, *почек, **камбия

Выделение ДНК из листьев, почек и камбияльного слоя образцов дуба, проведенное по ускоренной методике без охлаждения, показало наличие ДНК с высокой примесью РНК в пробах для всех образцов и типов растительной ткани (см. рис. 1).

Выделение с модификацией СТАВ-буфера (Б2) путём добавления 7 % PVP показало, что в данном варианте происходит стабилизация препарата ДНК, итоговое качество препарата и выход ДНК выше. Далее стандартный метод был модифицирован путём увеличения времени инкубации при 65 °С в течение 1 часа.

Результаты амплификации полученных препаратов ДНК к последовательности ITS представлен на рис. 2. Для продуктов, выделенных с модификацией СТАВ-буфера (рис. 2, з) и с доочисткой на колонках (рис. 2, д), наблюдалось логарифмическое повышение уровня флуоресценции в канале FAM амплификатора до 38 цикла, при этом в других вариантах (рис. 2 а, б) не наблюдалось повышение флуоресценции. Для варианта с увеличением времени инкубации продукт ПЦР образовывался лишь для нескольких проб (рис. 2, в).

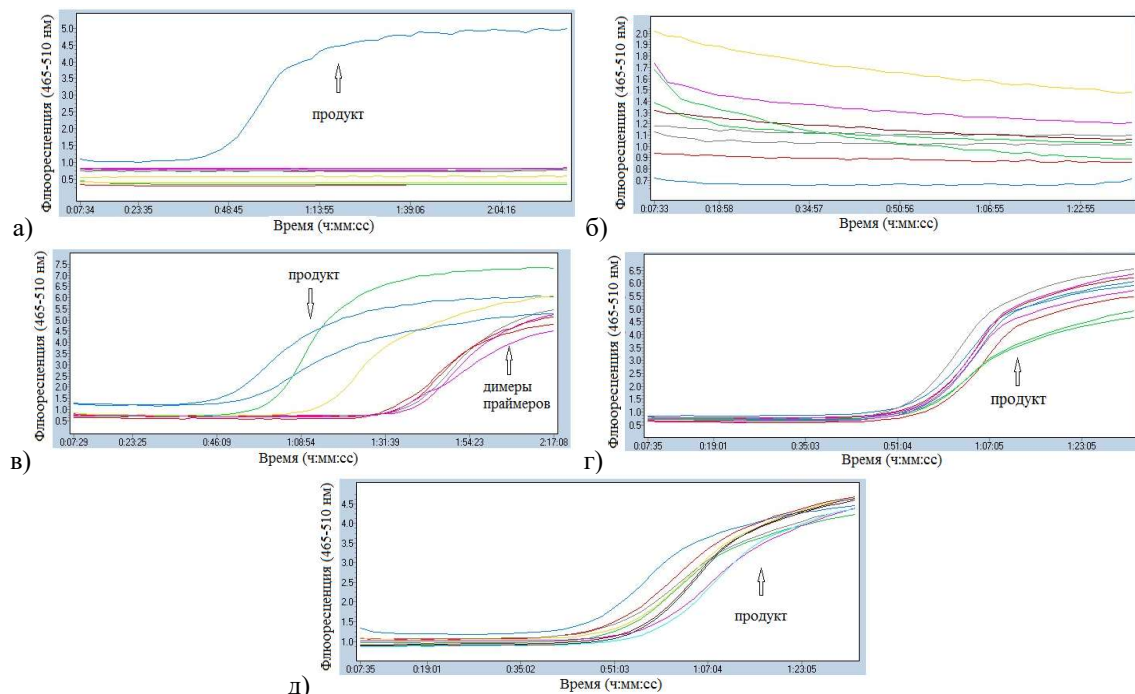


Рис. 2. Кривые амплификации продукта ITS последовательности с использованием ДНК, выделенной: а) стандартным методом; б) по ускоренной методике без охлаждения; в) с увеличением времени инкубации; г) с модификацией СТАВ-буфера; д) с доочисткой на колонках

Fig. 2. Amplifications of product of ITS sequences using DNA extracted with: a) a standard procedure; b) an accelerated procedure without cooling; c) an incubation time increase; d) a STAB buffer modification; e) afterpurification in columns

Заключение. Таким образом, СТАВ-метод показал высокую эффективность при модификации протокола с увеличением концентрации РVP в составе лизирующего буфера и времени инкубации на стадии гомогенизации образцов. Дополнительная очистка образцов с использованием коммерческого набора колонок позволяет выделить более качественные препараты ДНК, свободные от РНК и по-

лисахаридов, однако способствует снижению выхода конечного продукта. Модифицированный СТАВ-протокол может быть использован для работы с образцами тканей древесных растений, богатых полифенолами и полисахаридами, и позволит проводить ПЦР-амплификацию ДНК с целью видовой идентификации и проведения других качественных и количественных исследований.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Molecular Markers Improve Abiotic Stress Tolerance in Crops: A Review / A. Younis, F. Ramzan, Y. Ramzan, et al. // *Plants*. 2020. № 9(10). P. 1374. <https://doi.org/10.3390/plants9101374>
2. Романов Е.М. Воспроизводство лесов в новой стратегии перехода к устойчивому развитию лесного сектора России // *Вестник Поволжского государственного технологического университета. Сер.: Лес. Экология. Природопользование*. 2021. № 1 (49). С. 5-22.
3. Генетическое разнообразие локусов SNP в популяциях дуба черешчатого юга лесостепной зоны России / Б. Деген, Ю. А. Янбаев, Р. Ю. Янбаев и др. // *Вестник Пермского университета. Серия «Биология»*. 2020. № 3. С. 198-203.
4. Эколого-генетическая дифференциация ценопопуляций *Quercus robur* L. на территории Ростовской области с применением ISSR-маркеров / В.А. Чохели, Д.И. Каган, Т.В. Вардуни и др. // *Turczaninowia*. 2018. Т. 21. № 4. С. 161-167.
5. Полякова Л.В., Литвиненко В.И. Значение вторичных метаболитов в формировании устойчивости к мучнистой росе деревьев 16-летних культур дуба черешчатого // *Лесоведение*. 2019. № 2. С. 128-137.
6. Pandey R.K. Variation of Tannins in Oak Leaves // *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. 1991. 1991187(5):392-394 DOI:10.1016/S0015-3796(11)80045-4
7. Хромато-масс-спектрометрия коры дуба обыкновенного-черешчатого (*Quercus robur* L; семейство Буковые - Fagaceae) / В.В. Платонов, А.А. Хадарцев, Г.Т. Сухих и др. // *Вестник новых медицинских технологий. [Электронное издание]*. 2019. № 1. С. 117-133.
8. Doyle, J.J. and Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus*. 1990. № 12. Pp. 13-15.
9. A phenol/chloroform-free method to extract nucleic acids from recalcitrant, woody tropical species for gene expression and sequencing / F.F. Barbier, T.G. Chabikwa, M.U. Ahsan et al. // *Plant Methods*. 2019. № 15. Pp. 62. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0447-3>
10. Forensic science international / T. Yamamuro, Y.T. Iwata, H. Segawa et al. // *Pharmaceutical Society of Japan*. 2019. 139(5):685-691. DOI:10.1248/yakushi.18-00166-1 2018. Vol. 287, pp. 176-182.
11. Desjardins P., Conklin D. NanoDrop micro-volume quantitation of nucleic acids // *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2010. №. 45. С. e2565.

Статья поступила в редакцию 18.11.2021; одобрена после рецензирования 31.01.2022; принята к публикации 10.02.2022

Информация об авторах

ПОПОВА Анна Александровна – кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и физиологии растений, Воронежский государственный лесотехнический университет имени Г.Ф. Морозова. Область научных интересов – физиология растений, генетика и селекция лесобразующих пород, р. *Quercus*, молекулярная биология. Автор 60 научных публикаций, в том числе двух учебных пособий. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4711-5277>

ГРОДЕЦКАЯ Татьяна Александровна – научный сотрудник НИИ ИТЛК, Воронежский государственный лесотехнический университет имени Г.Ф. Морозова. Область научных интересов – молекулярная биология, генетика. Автор 31 научной публикации. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5448-2792>

МОЛЧАНОВ Владимир Владимирович – студент лесного факультета, Воронежский государственный лесотехнический университет имени Г.Ф. Морозова, направление подготовки – лесное дело. Область научных интересов – лесные культуры, селекция и интродукция древесных р. *Quercus*. Автор пяти научных публикаций.

ЕВЛАКОВ Пётр Михайлович – кандидат биологических наук, главный научный сотрудник НИИ ИТЛК, Воронежский государственный лесотехнический университет имени Г.Ф. Морозова; заведующий лабораторией ПЦР. Область научных интересов – физиология, биохимия растений, технологии выращивания посадочного материала. Автор 50 научных публикаций. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0138-2410>

Вклад авторов:

Попова А. А. – научное руководство, участие в сборе биоматериала, проведении лабораторных исследований и анализе данных, написание статьи.

Гродецкая Т. А. – проведение лабораторных исследований, анализ данных, написание статьи.

Молчанов В.В. – участие в сборе биоматериала, проведение лабораторных исследований.

Евлаков П.М. – участие в сборе биоматериала и анализе данных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Scientific article

UDC 577.2.08

<https://doi.org/10.25686/2306-2827.2022.1.69>

Selection and Optimization of DNA Extraction Methods from Various Plant Materials

A. A. Popova[✉], *T. A. Grodetskaia*, *V. V. Molchanov*, *P. M. Evlakov*

Voronezh State University of Forestry and Technologies named after G. F. Morozov,

8, Timiryazeva st., Voronezh, 394087, Russian Federation

logachevaaa@rambler.ru[✉]

ABSTRACT

Introduction. DNA extraction from woody plants can be difficult due to a large amount of metabolites in samples. In molecular genetic studies of trees both fresh products and herbarium samples are often used. Oak leaves as a material for the extraction of nucleic acids are a complex object due to the fact that they have a high intensity of synthesis of secondary metabolites. In the analysis of plants in the natural environment, leaves are most often used. However, buds, cambium and various parts of seeds and plantlets can also be useful. **The goal** of the study was to test commercial kits for DNA extraction and modifications of the CTAB method for various plant material of the *Quercus*. Leaves, buds, and the cambial layer of shoots were used as the **object** of study. **Results.** A comparative analysis of DNA extraction methods from oak samples of various geographical origin and species was carried out. The analyzed methods are based on the use of CTAB as the main component of the lysis buffer. Major modifications affected the change in the concentration of active components of the lysis buffer and the incubation time of the samples during the homogenization stage. **Conclusion.** Modifications of the standard protocol make it possible to obtain DNA preparations that are purer in terms of optical density ratios of 260/280 and 260/230. The use of a set of columns on isolated DNA samples helps to get rid of RNA impurities and polysaccharides that reduce the quality of DNA preparations. Approbation of modified protocols of the CTAB method and commercial kits for isolation proved the need in PVP increase in the composition of the lysis buffer and the incubation time of sample homogenates to achieve high-quality PCR amplification. The use of a modified method with 7% PVP in the lysis buffer allows amplification of ITS-specific primer sequences for polymerase chain reaction.

Keywords: DNA extraction; PCR; optical density; commercial kits; CTAB buffer; *Quercus*

Funding: The study was carried out with the financial support of The Russian Foundation for Basic Research and the Voronezh region within the scientific project № 19-44-363001\20 and the Grant of the President of the Russian Federation for the State Support of Leading Scientific Schools of the Russian Federation III – 2535.2020.11.

REFERENCES

1. Younis A., Ramzan F., Ramzan Y., et al. Molecular Markers Improve Abiotic Stress Tolerance in Crops: A Review. *Plants*. 2020. № 9(10). P. 1374. <https://doi.org/10.3390/plants9101374>
2. Romanov E.M. *Vosproizvodstvo lesov v novoy strategii perekhoda k ustoychivomu razvitiyu lesnogo sektora Rossii* [Regeneration of forests in a new strategy for the transition to sustainable development of Russian forest sector]. *Vestnik Povolzhskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta. Ser.: Les. Ekologiya. Prirodopol'zovanie* [Vestnik of Volga State University of Technology. Ser.: Forest. Ecology.

Nature Management]. 2021. № 1 (49). Pp. 5-22. (In Russ.).

3. Degen B. I., Anbaev Iu. A., Ianbaev R. Iu. et al. Genetycheskoe raznoobrazie lokusov SNP v populyatsiyakh duba chereschatogo yuga lesostepnoy zony Rossii [Genetic diversity of SNP loci in the English oak populations in the south of forest-steppe zone of Russia]. *Vestnik Permskogo universiteta. Seriya «Biologiya»* [Bulletin of Perm University. Biology]. 2020. № 3. Pp. 198-203. (In Russ.).

4. Chokheli V. A., Kagan D. I., Varduni T. V. et al. Ekologo-geneticheskaya differentsiatsiya tsenopopulyatsiy *Quercus robur* L. na territorii Rostovskoy oblasti s primeneniem ISSR-markerov [Ecological and genetic differentiation of *Quercus robur* L. populations in the Rostov region with the use of ISSR-markers]. *Turczaninowia*. 2018. Vol. 21. № 4. Pp. 161-167. (In Russ.).

5. Poliakova L.V., Litvinenko V.Y. Znachenye vtorychnyykh metabolytov v formirovaniu ustoychivosti k muchnistoy rose derev'ev 16-letnikh kul'tur duba chereschatogo [The role of secondary metabolites in the development of resistance to powdery mildew on trees of 16-year old plantations of English oak]. *Lesovedenie* [Russian Journal of Forest Science]. 2019. № 2. Pp. 128-137. (In Russ.).

6. Pandey R.K. Variation of Tannins in Oak Leaves // *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. 1991. 1991187(5):392-394 DOI:10.1016/S0015-3796(11)80045-4

7. Platonov V. V., Khadartsev A. A., Sukhikh G. T. et al. Khromato-mass-spektrometriya kory duba obyknovennogo-chereshchatogo (*Quercus robur* L.; semeystvo Bukovye - *Fagaceae*) [Chromato-mass-spectrometry of the bark of English oak (*Quercus robur* L.; family-*Fagaceae*)]. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. Elektronnoe izdaniye*. [Journal of New Medical Technologies. eEdition]. 2019. № 1. Pp. 117-133. (In Russ.).

8. Doyle J.J. and Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus*. 1990. № 12. Pp. 13-15.

9. Barbier F.F., Chabikwa T.G., Ahsan M.U. et al. A phenol/chloroform-free method to extract nucleic acids from recalcitrant, woody tropical species for gene expression and sequencing. *Plant Methods*. 2019. № 15. Pp. 62. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0447-3>

10. Yamamuro T., Iwata Y.T., Segawa H., et al. Forensic science international. *Pharmaceutical Society of Japan*. 2019. 139(5):685-691. DOI:10.1248/yakushi.18-00166-1 2018. Vol. 287, pp. 176-182.

11. Desjardins P., Conklin D. NanoDrop micro-volume quantitation of nucleic acids. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2010. №. 45. C. e2565.

The article was submitted 18.11.2021; approved after reviewing 31.01.2022; accepted for publication 10.02.2022

For citation: Popova A. A., Grodetskaia T. A., Molchanov V. V., Evlakov P. M. Selection and Optimization of DNA Extraction Methods from Various Plant Materials. *Vestnik of Volga State University of Technology. Ser.: Forest. Ecology. Nature Management*. 2022. № 1 (53). Pp. 69–77. (In Russ.). <https://doi.org/10.25686/2306-2827.2022.1.69>

Information about the authors

Anna A. Popova – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Chair of Botany and Plant Physiology, Voronezh State University of Forestry and Technologies named after G. F. Morozov. Research interests – physiology of plants, genetics and selection of forest forming species of *Quercus*, molecular biology. Author of 60 scientific publications, including two study guides. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4711-5277>

Tatiana A. Grodetskaia – Researcher at the Research institute “Innovative Technologies of Timber Complex”, Voronezh State University of Forestry and Technologies named after G. F. Morozov. Research interests – molecular biology, genetics. Author of 31 scientific publications. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5448-2792>

Vladimir V. Molchanov – Student of Forest Faculty, Voronezh State University of Forestry and Technologies named after G. F. Morozov, training program – forestry. Research interests – forest plantations, selection and introduction of *Quercus*. Author of five scientific publications.

Petr M. Evlakov – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher at the Research institute “Innovative Technologies of Timber Complex”, Voronezh State University of Forestry and Technologies named after G. F. Morozov; Head of the Laboratory of PCR. Research interests – physiology, phytochemistry, technology of planting material growing. Author of 50 scientific publications. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0138-2410>

Contribution of the authors:

Popova A. A. – academic advising, biomaterial collection, laboratory researches, data analysis, writing an article.

Grodetskaia T. A. – laboratory researches, data analysis, writing an article.

Molchanov V. V. – biomaterial collection and laboratory researches.

Evlakov P. M. – biomaterial collection and data analysis.

The authors declare that they have no conflict of interest.

All authors read and approved the final manuscript.