

УДК 577.212

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ РАСТЕНИЙ ДЛЯ МЕТАГЕНОМНОГО АНАЛИЗА НА ПРИМЕРЕ ВИНОГРАДА *Vitis amurensis* RUPR.

© 2023 г. К. В. Киселев¹, Н. Н. Нитяговский¹, О. А. Алейнова¹, *

¹Федеральный научный центр Биоразнообразия Наземной Биоты Восточной Азии,
ДВО РАН, Владивосток, 690022 Россия

*e-mail: aleynova@biosoil.ru

Поступила в редакцию 04.10.2022 г.

После доработки 16.11.2022 г.

Принята к публикации 29.12.2022 г.

Предложен новый метод выделения ДНК из растений, на примере дикорастущего винограда *Vitis amurensis* Rupr., для дальнейшей подготовки библиотек для метагеномного анализа эндофитов. Метод основан на выделении ДНК недорогостоящим ЦТАБ-методом с дополнительной стадией очистки ДНК с использованием кремнеземных спин-колонок (ЦТАБ-спин метод). Проведен сравнительный анализ результатов метагеномного анализа эндофитов на ДНК, выделенной предложенным ЦТАБ-спин методом и с использованием коммерческого набора ZymoBIOMICS DNA Miniprep (Zymo Research, США). Установлено, что при использовании ЦТАБ-спин метода количество последовательностей участка *16S* рРНК и многообразие родов бактерий было в 2.8 и 1.2 раза больше соответственно, чем при использовании набора ZymoBIOMICS. В то же время, количество последовательностей участка межгенного спейсера *ITS1* и биоразнообразие эндофитных грибов значительно не отличались при экстракции ДНК двумя способами. Таким образом, предложенный метод выделения ДНК для метагеномного анализа является доступной и эффективной альтернативой коммерческим наборам по выделению ДНК растений для методов секвенирования нового поколения.

Ключевые слова: виноград, ДНК, метагеном, секвенирование нового поколения, бактерии, грибы, эндофиты, *Vitis amurensis*, NGS

DOI: 10.31857/S055510992303011X, **EDN:** BBUGBY

Методы секвенирования нового поколения (next-generation of sequencing, NGS) — это технология массового параллельного секвенирования, обеспечивающая сверхвысокую пропускную способность, масштабируемость и скорость [1]. С помощью NGS миллиарды фрагментов нуклеиновых кислот могут быть секвенированы одновременно и независимо. Технология используется для определения последовательности нуклеотидов в геномах или целевых областях ДНК или РНК. NGS произвела революцию в биологических науках, позволив лабораториям выполнять широкий спектр прикладных задач и изучать биологические системы на новом уровне, который выходит за рамки возможностей традиционных технологий секвенирования ДНК [2].

В последнее десятилетие количество публикаций, где используется секвенирование нового поколения выросло в десятки раз, что говорит о востребованности данного метода в науке. Быстрый прогресс в технологии NGS и одновременное развитие инструментов биоинформатики позволили как малым, так и крупным исследовательским группам создавать *de novo* черновики после-

довательностей генома для любого интересующего организма [3]. Помимо использования NGS для крупномасштабного секвенирования всего генома [4], эти технологии могут быть использованы для высокопроизводительного секвенирования всего транскриптома [5], секвенированием всего экзона [6], направленным или кандидатным секвенированием генов [7, 8], секвенирование метилирования генома [9] и метагеномным NGS (Metagenomic Next Generation Sequencing, mNGS) [10].

mNGS — это секвенирование всех нуклеиновых кислот в образце, который может содержать смешанные популяции микроорганизмов. mNGS позволяет определить какие микробы и в каких пропорциях присутствуют в исследуемых образцах. Возможность секвенирования и идентификации нуклеиновых кислот из множества различных таксонов для метагеномного анализа создает новую мощную исследовательскую платформу, которая может одновременно идентифицировать генетический материал из совершенно разных царств организмов [11]. Применение mNGS обладает широкими возможностями, включая диагностику инфекционных заболеваний, отслеживание вспы-

шек, эпиднадзор за инфекционным контролем, обнаружение мутаций и патогенов, а также изучение сообществ микроорганизмов населяющие различные растения и животных [12, 13].

Как правило, успех выполнения mNGS-секвенирования во многом зависит от качества выделенной ДНК. Для выделения геномной ДНК растений обычно используют дорогостоящие коммерческие наборы, такие как DNeasy Plant Mini Kit (50 образцов, “Qiagen”, Германия) [14], QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (50 образцов, “Qiagen”, Германия) [15], PowerSoil® DNA Isolation Kit (50 образцов, “MoBio Inc.”, США) [16], ZymoBIOMICS DNA miniprep kit (50 образцов, “Zymo Research”, США) [17].

Цель работы — сравнительный анализ эндотитных сообществ бактерий и грибов дикорастущего винограда *Vitis amurensis* Rupr. с помощью mNGS секвенирования ДНК, выделенной из разных органов винограда с помощью разработанного в данной работе метода и коммерчески-доступного набора ZymoBIOMICS DNA miniprep kit.

МЕТОДИКА

Растительный материал и условия поверхностной стерилизации. Ткани двух лиан дикорастущего винограда *V. amurensis* — молодые стебли длиной 7–8 см с тремя здоровыми листьями и зрелыми ягодами, были отобраны в неохраямой природной зоне в районе г. Владивостока (Россия) в сентябре 2021 г. Образцы растений были доставлены в лабораторию в течение 30 мин.

Образцы винограда промывали под проточной водой с мылом. В стерильных условиях взвешивали 0.2 г каждого органа винограда. Затем взвешенные образцы промывали в 70%-ном этаноле в течение 2 мин, 1 мин в 10%-ном растворе пероксида водорода и затем стерильной водой 5 раз.

Выделение ДНК. Для работы использовали образцы винограда *V. amurensis* из двух лиан, собранных в июле и сентябре 2021 г. (всего 4 биологические повторности). ДНК выделяли из 11 образцов винограда (4 образца листа и 4 образца стебля из двух лиан винограда, 2 образца ягоды и 1 образец семян из одной лианы винограда) с помощью ЦТАБ-спин метода и коммерческого набора ZymoBIOMICS DNA miniprep (“Zymo Research”, США). Один биологический эксперимент имел 2 аналитические повторности.

Взвешивали 30, 50 и 100 мг поверхностно стерилизованного образца винограда, переносили его для измельчения в стерильную ступку. Ступки и пестик стерилизовали автоклавированием (121°C, 0.21 МПа, 20 мин).

После измельчения образца в ступке с помощью набора ZymoBIOMICS DNA miniprep выделяли ДНК в соответствии с протоколом произво-

дителя. В случае ЦТАБ-спин метода к измельченному образцу добавляли 800 мкл ЦТАБ-буфера (100 мМ трис pH 7.5, 1.4 М NaCl, 40 мМ ЭДТА pH 7.5, 1% цетилтриметиламмоний бромид, ЦТАБ), перемешивали до однородного состояния и инкубировали в течение 1 ч при 60°C в термостате “Гном” (“ДНК-технология”, Россия). Затем добавляли 300 мкл хлороформа, осторожно перемешивали и центрифугировали в течение 10 мин при 4°C и 16 100 g (5415R, “Eppendorf”, Германия). Далее, 420 мкл супернатанта отбирали в отдельные пробирки и добавляли 950 мкл 96%-ного этанола, выдерживали при –20°C в течение ночи, а затем центрифугировали 10 мин при 4°C и 16 100 g. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок высушивали до полного испарения этанола при комнатной температуре (30 мин).

Далее осадок растворяли в 100 мкл дистиллированной воды. Важно отметить, что полученный раствор ДНК уже можно использовать для амплификации отдельных генов в случае геноспецифических ПЦР [18] или для изучения метилирования ДНК [19]. Однако попытки использовать ее для получения библиотек участков генов 16S и *ITS1* были безуспешны, мы не наблюдали характерных ПЦР продуктов, поэтому были добавлены стадии очистки ДНК на кремниевых спин-колонках (например, C1002-50 IC-XL, “Zymo Research”). Для одного образца использовали две колонки, на каждую колонку наносили по 50 мкл полученного водного раствора ДНК, центрифугировали 30 с при 4°C и 6900 g. Далее добавляли 200 мкл “Раствора для очистки ДНК” (GuSCN, 5 М; ЭДТА, pH 8.0, 0.1 М) и центрифугировали при тех же условиях. После удаления супернатанта к осадку добавляли 700 мкл промывочного раствора (80%-ный этанол; 10 мМ трис-HCl, pH 7.5) и снова центрифугировали. Следующим шагом переносили колонки в новые 1.5 мл пробирки и центрифугировали 1 мин при 4°C и 6 900 g для удаления промывочного раствора. После колонки переносили в новые 1.5 мл пробирки и оставляли на столе при комнатной температуре на 5 мин для испарения остатка промывочного раствора. Далее на первую колонку наносили 50 мкл элюирующего раствора (5 мМ трис-HCl, pH 7.5), инкубировали 1 мин на столе при комнатной температуре и центрифугировали 30 с при 6900 g, затем полученным элюатом (элюирующим раствором, прошедшим через первую колонку) промывали первую колонку еще раз. После первую колонку удаляли и в ту же пробирку ставили вторую колонку, которую промывали полученным элюатом дважды. В результате ДНК с двух колонок была очищена и элюирована в 50 мкл элюирующего раствора.

Качество и количество ДНК оценивали с помощью спектрофотометра P300 (“IMPLEN”, США).

Подготовка библиотеки и секвенирование. Образцы ДНК были отправлены в компанию “Евроген” (Россия) для высокопроизводительного секвенирования с использованием технологии Illumina. Библиотеки были подготовлены для секвенирования в соответствии с протоколом, описанным в руководстве “Подготовка библиотеки для метагеномного секвенирования 16S” (часть № 15044223 Rev. B; Illumina). Участки бактериальной 16S рНК амплифицировали с использованием праймеров 515F (5'GGT AAT ACG KAG GKK GCD AGC) и 806R (5'RTG GAC TAC CAG GGT ATC TAA), модифицированных для растений *Vitis* sp. [20]. Участки межгенного спейсера *ITS1* эндофитных грибов амплифицировали с использованием праймеров ITS1f (5'CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A) и ITS2 (5'GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC) [21].

Далее библиотеки очищали и эквимоллярно смешивали с использованием набора нормализующих пластин SequalPrep™ (ThermoFisher, Cat № A10510-01). Контроль качества полученных библиотечных пулов проводился с помощью анализатора фрагментов, а количественный анализ проводился с помощью qPCR.

Пул библиотек секвенировали на Illumina MiSeq (2 × 250 парных концов) с использованием набора реагентов MiSeq v2 (500 циклов). Файлы FASTQ были получены с помощью программного обеспечения для преобразования bcl2fastq v2.17.1.14 (Illumina). Библиотека phage PhiX использовалась для управления параметрами секвенирования. Большинство считываний, относящихся к ДНК фага, были удалены во время демультиплексирования.

Последовательности бактерий и грибов были депонированы в NCBI под регистрационными номерами PRJNA813962 и PRJNA874841, также в базе данных лаборатории биотехнологии Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Россия (https://biosoil.ru/downloads/biotech/Vitis%20metagenom/2021-09=Vitis_amurensis_endophytes_16s; https://biosoil.ru/downloads/biotech/Vitis%20metagenom/2021-09=Vitis_amurensis_endophytes_ITS).

Вычислительный анализ. Парные прочтения NGS были предварительно обработаны с использованием программ QIIME 2 [22] и DADA2 [23]. В результате предварительной обработки парные прочтения были объединены, и из данных высокопроизводительного секвенирования были удалены химерные последовательности и оставшиеся последовательности ДНК фага PhiX. Таксономическую идентификацию последовательностей ДНК проводили алгоритмом QIIME 2 Scikit-learn [24] с использованием предварительно обученных классификаторов Silva 138 (99% OTUs из области последовательностей 515F/806R) для эндофитных бактерий

[25] и UNITE (99% OTUs из области последовательностей ITS1f/ITS2) для эндофитных грибов [26]. Далее, из анализа были исключены последовательности хлоропластной и митохондриальной ДНК, не определенные до ранга “отдел” последовательности, и последовательности ДНК, относящиеся к археям и эукариотам.

Полученные данные были обработаны с использованием языка R. Библиотеку phyloseq [27] и пакет tidyverse [28] использовали для предварительной фильтрации и подготовки данных. Таксоны для столбчатой гистограммы и визуализационной диаграммы UpSet были отфильтрованы на основе относительной численности >0.1% для каждого биокомпартамента. На столбчатых графиках объединяли таксономические ранги, которые были относительно малочисленны (<0.1% по каждому фактору), в одну группу, называемую “другие”. Данные о альфа-разнообразии на основе индекса Шеннона и бета-разнообразии на основе статистики “несходство Брея-Кёртиса” были получены с использованием пакета Vegan (доступно онлайн: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>) [29]. Данные о различиях по методу Брея-Кёртиса были преобразованы в равномерную глубину выборки и представлены в виде ординационных диаграмм с помощью метода неметрического многомерного шкалирования (Non-metric multidimensional scaling, NMDS). Для анализа данных альфа-разнообразия между группами был проведен тест суммы рангов Уилкоксона. Статистическая проверка данных о бета-разнообразии была выполнена с использованием теста PerMANOVA (999 перестановок), включенного в пакет Vegan [29]. Для графического представления результатов использовались библиотеки ggplot2 [28] и ComplexHeatmap [30].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Количество и качество выделенной ДНК. Первоначально выделяли ДНК из 30, 50 и 100 мг поверхностно стерилизованного листа винограда *V. amurensis* двумя описанными способами. В итоге все пробы ДНК растворяли в 50 мкл элюирующего раствора, поэтому можно напрямую сравнивать как концентрации, так и количества выделенной ДНК разными способами.

Оказалось, что при использовании ЦТАБ-спин метода концентрация и количество выделенной ДНК было в 2.2–3.5 раза выше, чем при использовании ZymoBIOMICS (табл. 1). Более того, в обоих методах навеска 50 мг показала наилучшие результаты, поэтому далее в работе использовали именно 50 мг образца. Затем выделяли ДНК из 50 мг стеблей, ягод и семян винограда и было показано, что также ЦТАБ-спин метод был более эффективен (табл. 1). Важно отметить, что во всех пробах, выделенных ЦТАБ-спин ме-

Таблица 1. Концентрация ДНК, выделенной из листьев, стеблей, ягод и семян винограда *Vitis amurensis* разными способами*

Метод выделения	Орган винограда	Концентрация ДНК, мкг/мкл	Количество ДНК, мкг
30 мг, ZymoBIOMICS	Лист	0.006 ± 0.003 ^c	0.30 ± 0.15 ^c
50 мг, ZymoBIOMICS	Лист	0.012 ± 0.005 ^{bc}	0.60 ± 0.25 ^{bc}
50 мг, ZymoBIOMICS	Стебель	0.005 ± 0.002 ^c	0.25 ± 0.10 ^c
50 мг, ZymoBIOMICS	Ягода	0.005 ± 0.003 ^c	0.25 ± 0.15 ^c
50 мг, ZymoBIOMICS	Семена	0.004 ± 0.002 ^c	0.20 ± 0.10 ^c
100 мг, ZymoBIOMICS	Лист	0.007 ± 0.004 ^c	0.35 ± 0.20 ^c
30 мг, ЦТАБ-спин	Лист	0.021 ± 0.005 ^{ab}	1.05 ± 0.25 ^{ab}
50 мг, ЦТАБ-спин	Лист	0.026 ± 0.007 ^a	1.30 ± 0.35 ^a
50 мг, ЦТАБ-спин	Стебель	0.028 ± 0.009 ^a	1.40 ± 0.45 ^a
50 мг, ЦТАБ-спин	Ягода	0.031 ± 0.011 ^a	1.55 ± 0.55 ^a
50 мг, ЦТАБ-спин	Семена	0.030 ± 0.010 ^a	1.50 ± 0.50 ^a
100 мг, ЦТАБ-спин	Лист	0.024 ± 0.006 ^{ab}	1.20 ± 0.30 ^{ab}

* Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. Средние значения в столбцах, за которыми следует одна и та же буква, не различались по *t*-критерию Стьюдента. $p < 0.05$ считали статистически значимым.

тодом и ZymoBIOMICS соотношение поглощения 260/280 было 1.9–2.0, а 260/230 — 0.4–0.6. Известно, что наиболее оптимальным соотношением 260/280 и 260/230 для работы с нуклеиновыми кислотами является 1.8–2.0 и 2.0–2.2 соответственно. Таким образом, оба метода позволяли получить довольно чистые препараты ДНК по примесям белков (260/280), но в образцах ДНК присутствовало довольно много примесей других веществ, поглощающих при 230 нм. Возможно, высокое поглощение при 230 нм объясняется наличием углеводов, что является довольно типичным для работы с растительными тканями. Дополнительная чистка на спин-колонках несколько увеличивала соотношение 260/230, но при этом уменьшалась концентрация ДНК, поэтому в работу решено было взять пробы ДНК без дополнительной очистки.

Сравнение микробных сообществ в образцах ДНК, выделенных разными способами. В общей сложности для ампликонов *16S* рРНК и *ITS1* было получено 3108452 и 3559302 парных прочтений со средним значением 282587 и 323573 парных прочтений на образец соответственно. В результате предварительной обработки данных высокопроизводительного секвенирования с помощью программ QIIME 2 и DADA2 для анализа было оставлено в общей сложности 574207 последовательностей *16S* рРНК в 22 образцах. Для *ITS1* после процедур биоинформатического контроля качества было идентифицировано в общей сложности 2753016 последовательностей в 22 пробах (рис. 1).

Согласно сравнительному анализу количество последовательностей *16S* рРНК эндофитных бактерий было в 2 раза больше в образцах, выделен-

ных ЦТАБ-спин методом (рис. 1а). Сообщество эндофитных бактерий было представлено 11 таксонами уровня класса с относительной представленностью выше 0.1%. В образцах, выделенных двумя способами экстракции ДНК, классы бактерий были одинаковы, но процентное соотношение этих классов значительно варьировалось (рис. 1а). Например, процентное соотношение класса Alphaproteobacteria в образцах, выделенных коммерческим набором, составляло 11%, в то время как в образцах, выделенных ЦТАБ-спин методом — почти 22%. Класс Bacilli в образцах, выделенных при помощи первого способа, был представлен 2.7%, в то время как в образцах, выделенных ZymoBIOMICS DNA miniprep, процентное соотношение этого класса составило 18%. В образцах, выделенных при помощи коммерческого набора, отсутствовали представители трех классов Acidobacteriae, Chlamydiae и Oligoflexia, однако они были идентифицированы в образцах, выделенных предложенным в работе способом, соотношении 0.13, 0.37 и 0.13% соответственно. Кроме того, биоразнообразие родового состава эндофитных бактерий было богаче в образцах, где ДНК была выделена ЦТАБ-спин методом (рис. 1в). При выделении ДНК с помощью коммерческого набора родовой состав эндофитных бактерий был представлен 76 родами, в то время как при выделении ДНК, разработанным нами методом, эндофитное сообщество было представлено 91 родом. 17 родов были уникальными для образцов, выделенных с помощью ЦТАБ-спин метода и 2 рода для образцов, полученных при использовании ZymoBIOMICS DNA miniprep (рис. 1в).

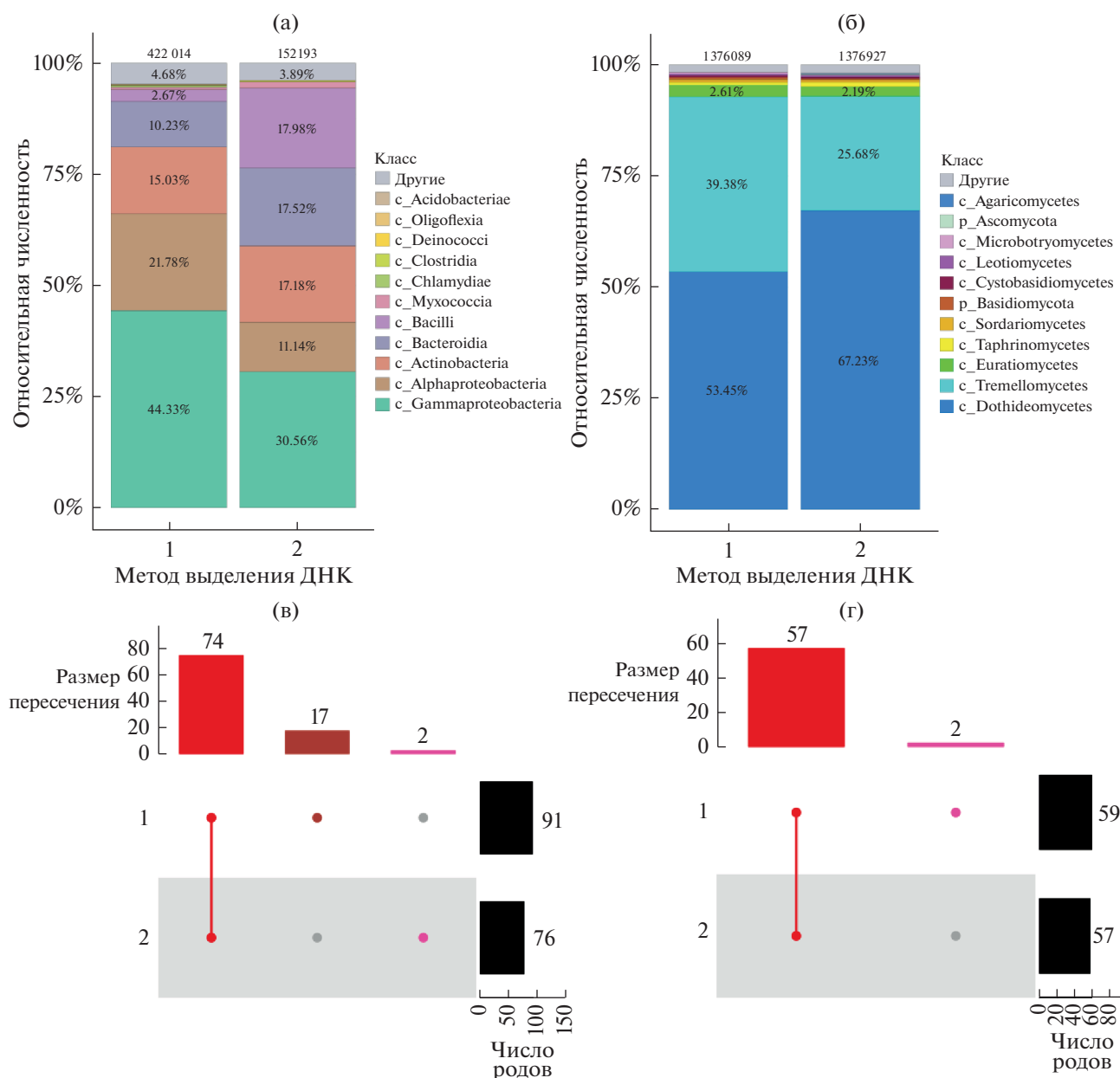


Рис. 1. Сравнительный анализ состава эндофитных бактерий (а, в) и грибов (б, г) в результате секвенирования следующего поколения (NGS) образцов, выделенных двумя способами: 1 – методом ЦТАБ-спин и 2 – коммерческим набором ZymoBIOMICS DNA miniprep. Таксономические столбчатые диаграммы уровня класса для состава бактериального и грибного сообщества *Vitis amurensis* (а, б, %); (в, г – количество родов), диаграммы расслоения (UpSet) на уровне рода, изображающие перекрывающиеся таксоны в образцах, выделенных двумя способами (1, 2). Таксоны фильтровались на основе относительной численности >0.1% для каждого биокомпартамента. Отфильтрованные таксоны на столбчатых графиках помещены в категорию “другие” и удалены с диаграммы UpSet. Количество последовательностей ДНК указано над таксономическими столбчатыми участками.

Анализ данных метагеномного секвенирования последовательностей межгенного спейсера *ITS1* эндофитных грибов показал, что экстракция и очистка ДНК обоими способами имеет сходные результаты по количеству последовательностей (1214521 и 1230181 последовательностей) (рис. 16). Процентное соотношение классов эндофитных грибов варьировалось, но не так значительно, как

в случае бактериального сообщества. Класс Dothideomycetes в образцах, выделенных ЦТАБ-спин методом, составлял 52% от общей численности эндофитных грибов, в то время как при использовании коммерческого набора процентное соотношение этого класса составило 66% (рис. 16). Процентное соотношение класса Tremellomycetes составило 41 и 27% в образцах, выделенных при

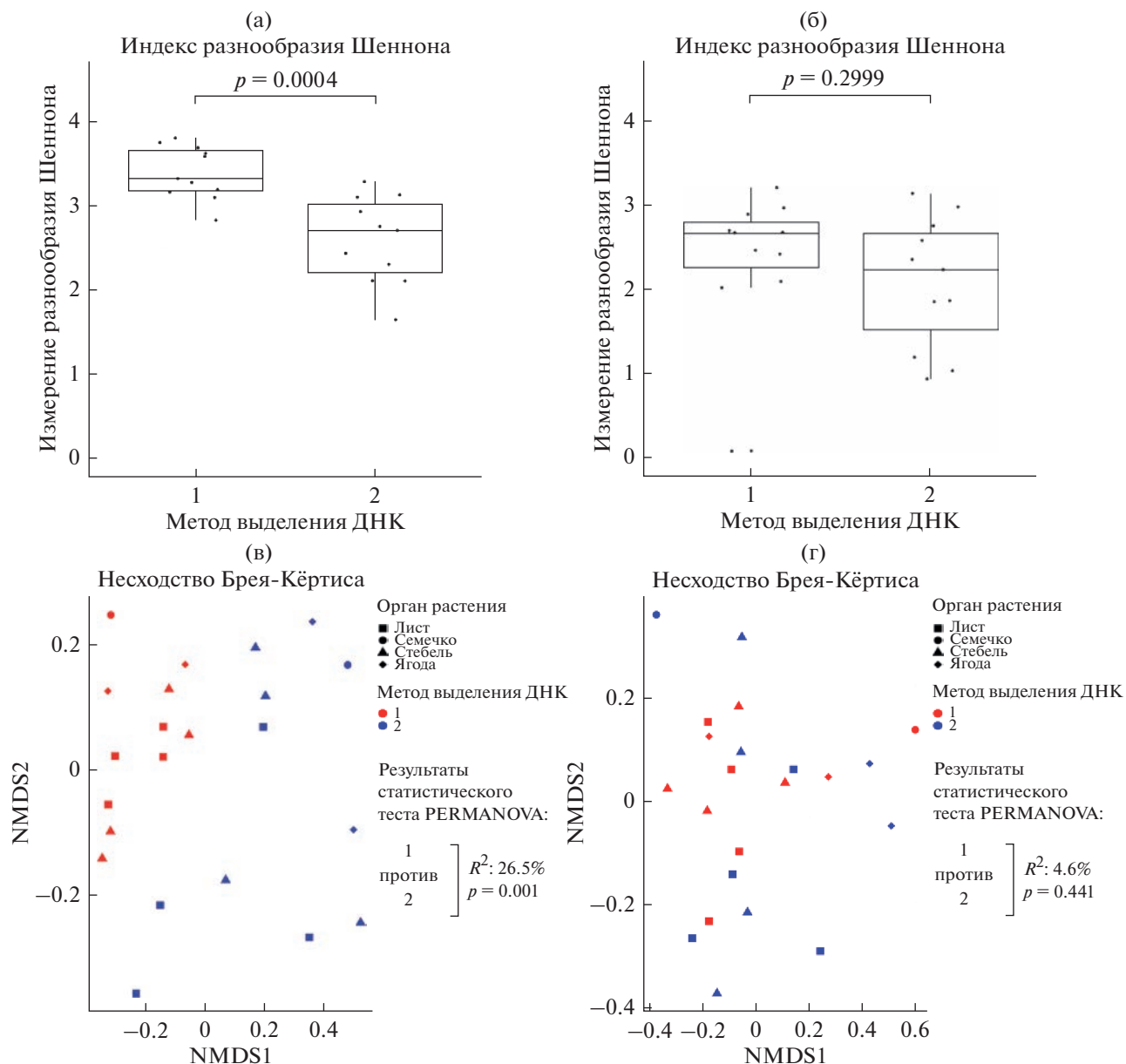


Рис. 2. Альфа-разнообразие по Шеннону и бета-разнообразие по Брей-Кёртису эндофитных бактерий (а, в) и грибов (б, г) в результате секвенирования следующего поколения (NGS) образцов, выделенных двумя способами: 1 – ЦТАБ-спин методом и 2 – коммерческим набором ZymoBIOMICS DNA miniprep. Данные по бета-разнообразию представлены с помощью неметрического многомерного шкалирования (Non-metric multidimensional scaling, NMDS).

помощи ЦТАБ-спин метода и коммерческого набора соответственно (рис. 1б). В образцах, выделенных при помощи предложенного подхода, были обнаружены грибы рода *Acremonium* и *Acrospertum*, в то время как они не были детектированы в образцах, выделенных при помощи ZymoBIOMICS DNA miniprep (рис. 1г).

Чтобы измерить альфа-разнообразие (то есть локальное разнообразие сообщества), был выполнен расчет двух оценочных показателей: Индекс разнообразия Шеннона и количество родов

бактерий. Согласно данным медианное значение индекса Шеннона, представляющего собой измерение энтропии, которое увеличивается в зависимости от количества родов в образце, было статистически достоверно выше в образцах эндофитных бактерий, ДНК которых выделена с помощью ЦТАБ-спин метода, по сравнению с ДНК, выделенной с использованием коммерческого набора (рис. 2а). В пробах эндофитных грибов значения индекса Шеннона достоверно не отличались при сравнении двух способов выделения ДНК (рис. 2б). Также количество бактериальных и грибных родов,

обнаруженных в образцах, выделенных ЦТАБ-методом с модификациями было выше по сравнению с образцами, полученными с использованием коммерческого набора (рис. 1в, 1г).

Бета-разнообразие (сравнение микробных сообществ на основе их состава) оценивает расстояние или степень несходства между каждой парой образцов. Значения бета-разнообразия были вычислены с использованием статистики “несходство Брея-Кёртиса” и представлены в виде ординационных диаграмм с помощью метода NMDS. На диаграмме бета-разнообразия в образцах эндофитных бактерий пробы в зависимости от выбранной методики выделения ДНК группировались в отдельные кластеры (рис. 2в) и согласно тесту Перманова статистически значимо различались. Однако образцы эндофитных грибов независимо от методики выделения ДНК были расположены в пределах одного кластера, что подтверждало результаты теста Перманова (рис. 2г).

Со стремительным развитием современных технологий секвенирования ДНК все чаще в научных и диагностических целях используются методы секвенирования нового поколения (NGS), которые предъявляют новые высокие требования к количеству и качеству выделенной ДНК.

Сегодня большинство существующих методов выделения ДНК растений не позволяют получить ДНК, пригодную для целей NGS, поэтому в этой работе был модифицирован существующий метод на основе ЦТАБ-экстракции путем добавления дополнительных этапов очистки на спин-колонках или ЦТАБ-спин метод. Себестоимость предложенного в работе подхода по расчетам была в 6 раз и более ниже по сравнению с использованием коммерческими наборами.

Итоговый результат анализа многообразия эндофитных бактерий и грибов на ДНК, выделенной с помощью ЦТАБ-спин метода, показал, что были получены высокие значения количества прочтений и определенных родов, что превышало значения, полученные на ДНК, выделенной с помощью широко известного набора Zymo Research.

Таким образом, в работе представлен подробный протокол для эффективного выделения ДНК для последующего NGS анализа из клеток растений на основе ЦТАБ-экстракции с последующей очисткой на спин-колонках. Эффективность подтверждена результатами метагеномного анализа с высокими значениями полученных выборок прочтений. Данный протокол будет полезен для исследований в области молекулярной биологии и биотехнологии растений с применением методов NGS.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-74-10001, <https://rscf.ru/project/22-74-10001>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Behjati S., Tarpey P.S.* // *ADS – Education and Practice*. 2013. V. 98. P. 236–238.
2. *Slatko B.E., Gardner A.F., Ausubel F.M.* // *Current Protocols in Mol. Biol.* 2018. V. 122. P. e59. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
3. *Kulski J.K.* Next-Generation Sequencing – An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. / Ed. J.K. Kulski. IntechOpen. 2016. P. 60. <https://doi.org/10.5772/61964>
4. *Lam H.Y.K., Clark M.J., Chen R., Chen R., Natsoulis G., O’Huallachain M. et al.* // *Nat Biotechnol.* 2012. V. 30. P. 78–82.
5. *Wang Z., Gerstein M., Snyder M.* // *Nat. Rev. Genet.* 2009. V. 10. P. 57–63.
6. *Rabbani B., Tekin M., Mahdieh N.* // *J. Hum. Genet.* 2014. V. 59. P. 5–15.
7. *Leo V.C., Morgan N.V., Bem D., Jones M.L., Lowe G.C., Lordkipanidzé M. et al.* // *J. Thrombosis and Haemostasis*. 2015. V. 13. P. 643–650.
8. *Kulski J.K., Suzuki S., Ozaki Y., Mitsunaga S., Inoko H., Shiina T.* Phase HLA Genotyping by NGS – A Comparison Between two Massively Parallel Sequencing Bench-top Systems, the Roche GS Junior and Ion Torrent PGM. / Ed. Y. Xi. IntechOpen. 2014. P. 141–181.
9. *Pelizzola M., Ecker J.R.* // *FEBS Letters*. 2011. V. 585. P. 1994–2000.
10. *Simner P.J., Miller S., Carroll K.C.* // *Clin. Infect. Dis.* 2018. V. 66. P. 778–788.
11. *Boers S.A., Jansen R., Hays J.P.* // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2019. V. 38. P. 1059–1070.
12. *Chiu C.Y., Miller S.A.* // *Nat. Rev. Genet.* 2019. V. 20. P. 341–355.
13. *Iqbal M.A., Jagannadham J., Jaiswal S., Prabha R., Rai A., Kumar D.* // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. P. 708335. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.708335>
14. *Fan Y., Gao L., Chang P., Li Z.* // *Annals of Microbiology*. 2020. V. 70. P. 30. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01574-9>
15. *Cureau N., Threlfall R., Marasini D., Lavefve L., Carbonero F.* // *Microb. Ecol.* 2021. V. 82. P. 845–858.
16. *Marasco R., Rolli E., Fusi M., Michoud G., Daffonchio D.* // *Microbiome*. 2018. V. 6. P. 3. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0391-2>
17. *Deyett E., Rolshausen P.E.* // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 1246. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01246>
18. *Kiselev K.V., Tyunin A.P., Karetin Y.A.* // *Plant Cell Rep.* 2015. V. 34. P. 311–320.
19. *Ogneva Z.V., Dubrovina A.S., Kiselev K.V.* // *Biol. Plant.* 2016. V. 60. P. 628–634.
20. *Aleynova O.A., Nityagovsky N.N., Dubrovina A.S., Kiselev K.V.* // *Plants*. 2022. V. 11. P. 1128. <https://doi.org/10.3390/plants10071276>

21. Deyett E., Rolshausen P.E. // FEMS Microbiol Ecol. 2020. V. 96. P. f1aa053. <https://doi.org/10.1093/femsec/f1aa053>
22. Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith M. et al. Nat. Biotechnol. 2019. V. 37. P. 852–857.
23. Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J.A., Holmes S.P. // Nat. Methods. 2016. V. 13. P. 581–583.
24. Pedregosa F., Varoquaux G., Gramfort A., Michel V., Thirion B., Grisel O., et al. // J. Machine Learn. Research. 2011. V. 12. P. 2825–2830.
25. Bokulich N.A., Kaehler B.D., Rideout J.R., Dillon M., Bolyen E. et al // Microbiome. 2018. V. 6. P. 90. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>
26. Nilsson R.H., Larsson K.-H., Taylor A.F.S., Bengtsson-Palme J., Jeppesen T.S., Schigel D. et al // Nucleic Acids Research. 2019. V. 47. P. D259–D264.
27. McMurdie P.J., Holmes S. // PLOS ONE. 2013. V. 8. P. e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
28. Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., McGowan L.D., François R. et al. // J. Open Source Software. 2019. V. 4. P. 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
29. Oksanen J., Blanchet F.G., Friendly M., Kindt R., Legendre P., McGlinn D. et al // Vegan: Community Ecology Package. R Package Version 2.5-7. 2020. Доступно онлайн: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf> (дата обращения 9 января 2023).
30. Gu Z., Eils R., Schlesner M. // Bioinformatics. 2016. V. 32. P. 2847–2849.

Method of DNA Extraction from Plant for Metagenomic Analysis as Example from Grape *Vitis amurensis* Rupr.

K. V. Kiselev^a, N. N. Nityagovsky^a, and O. A. Aleynova^{a, *}

^a Federal Scientific Center of the Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Laboratory of Biotechnology, Vladivostok, 690022 Russia

*e-mail: aleynova@biosoil.ru

A new method for extracting DNA from plants is proposed, using the example of wild grapes *Vitis amurensis* Rupr., for further preparation of libraries for metagenomic analysis. The method is based on the isolation of DNA by an inexpensive CTAB method with an additional stage of DNA purification using silica spin columns (CTAB spin method). A comparative analysis of the results of metagenomic analysis of endophytes on DNA isolated using the proposed CTAB-spin method and using the commercial set ZymoBIOMICS DNA Miniprep (Zymo Research). It was found that when using the CTAB-spin method, the number of sequences of the 16S rRNA site and the diversity of bacterial genera were 2.8 and 1.2 times greater, respectively, than when using the ZymoBIOMICS kit. At the same time, the number of sequences of the internal transcribed spacer 1 (*ITS1*) and the biodiversity of endophytic fungi did not differ significantly during DNA extraction by two methods. Thus, the proposed method of DNA isolation for metagenomic analysis is an available and effective alternative to commercial kits for the isolation of plant DNA for new generation sequencing methods.

Keywords: grapes, DNA, metagenome, new-generation sequencing (NGS), bacteria, fungi, endophytes, *Vitis amurensis*