

МІЩЕНКО А. М., АНДРЕЄВ І. О.✉

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150, ORCID: 0009-0003-1310-3703, 0000-0002-3706-8514

✉ i.o.andreev@imbg.org.ua

ПІДБІР ТА ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДУ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ДНК
З ВИДІВ РОДУ *CORYLUS* ДЛЯ ПЛР АНАЛІЗУ

Мета. Застосування методів молекулярно-генетичного аналізу потребує препаратів ДНК високої чистоти. Однак, у випадку рослин ліщини (*Corylus* spp.) отримання ДНК належної якості ускладнене наявністю в листовій тканині значної кількості вторинних метаболітів. Мета роботи полягала у підборі та оптимізації методу виділення та очищення ДНК з ліщини для подальшого використання в ПЛР-аналізі. **Методи.** Використано три методи виділення ДНК з цетавлоном в якості детергенту, які відрізняються особливостями очищення ДНК: загальноприйнятий метод за Doyle, Doyle, 1987, модифікований метод з очищенням на мікрочастинках діоксиду кремнію та метод з екстракцією розчинних метаболітів, яка передуює виділенню ДНК. **Результати.** Показано непридатність перших двох методів для виділення ДНК з сухого листя ліщини внаслідок високої кількості вторинних метаболітів в отриманих препаратах. Встановлено, що останній метод дозволяє видалити значну частину водорозчинних органічних речовин на перших етапах і отримати якісні препарати ДНК. **Висновки.** Підібрано та оптимізовано метод виділення ДНК з рослин видів та гібридів *Corylus* spp., який дозволяє отримати з висушеної листової тканини в достатній кількості якісну високомолекулярну ДНК, придатну для подальшого використання в молекулярно-генетичному аналізі із застосуванням ПЛР.

Ключові слова: *Corylus* spp., виділення ДНК, молекулярно-генетичний аналіз.

Рід *Corylus* належить до родини *Betulaceae* підродина *Coryloideae*. До складу роду входить 11 видів, поширених у північній півкулі. Два з них, зокрема *C. avellana* та *C. colurna*, зустрічаються в Європі та Малій Азії. В Північній Америці ростуть три види, а саме *C. americana*, *C. cornuta* і *C. californica*, а у гімалайських горах – один вид, *C. jacquemontii*. Ще 5 видів, *C. chinensis*, *C. fargesii* і *C. ferox* (дерев-

ні рослини) та *C. heterophylla* і *C. sieboldiana* є ендемічними для Східної Азії [1, 2]. У сільському господарстві найбільшого використання набула ліщина європейська (*C. avellana*), яка є промисловим джерелом деревини та лікарських засобів, а її горіхи відомі як фундук, споживаються у всьому світі в сирому вигляді і як інгредієнт багатьох харчових і кондитерських виробів. Приблизно 70 % світового виробництва фундуку припадає на чорноморський регіон Туреччини (675 тис. тонн), 20 % на Італію (131 тис. тонн), а решту 10 % ділять між собою США, Іспанія, Грузія, Азербайджан і Франція. В Україні виробництво фундука наразі не перевищує 430 тонн на рік, що вказує на великі перспективи цієї культури. Для виробництва горіхів за кордоном використовують спеціально виведені високопродуктивні сорти ліщини, наприклад турецький сорт Томбул та американський сорт Джеферсон. Селекціонерами Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України було створено перспективні сорти з цінними господарськими ознаками, рекомендовані до впровадження у виробництво [3, 4].

Результативність селекції фундука, як і будь-якої іншої культури, залежить від багатьох чинників, з-поміж яких найголовнішими вважаються якість і різноманіття вихідного матеріалу. Останніми десятиріччями важливим інструментом у роботі селекціонерів стали молекулярно-генетичні методи аналізу, які значно пришвидшують добір рослин з необхідними ознаками і тим підвищують ефективність селекційного процесу. Першим важливим кроком більшості молекулярно-генетичних методів аналізу є виділення і очищення геномної ДНК, оскільки від якості і чистоти препаратів ДНК залежить чутливість та достовірність цих методів. Наразі опубліковано чималу кількість методів виділення ДНК з рослинного матеріалу, кожен з яких зазвичай враховує особливості тієї або іншої рослини та тканин, які використовую-

© МІЩЕНКО А. М., АНДРЕЄВ І. О.

ють для екстракції нуклеїнових кислот. Відомо, що тканини рослин роду *Corylus* містять великі кількості вторинних метаболітів [5], що може істотно ускладнювати виділення та подальше очищення нуклеїнових кислот. У цій роботі ми використали три описані раніше методи [6–8], які базуються на використанні цетавлону як детергента, для визначення їхньої придатності для виділення і очищення ДНК з невеликих кількостей сухої листкової тканини ліщини для подальшого використання отриманих препаратів у генетичному аналізі з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), а також провели подальшу оптимізацію методики, яка виявилася найефективнішою з них.

Матеріали і методи

Матеріали. ДНК виділяли з листкової тканини видів та гібридів *Corylus* spp., наданої співробітниками Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України. Листя висушували з силікагелем і далі зберігали в герметичному поліетиленовому пакеті з силікагелем при кімнатній температурі впродовж кількох місяців.

Виділення ДНК. Для екстракції ДНК використали три методи, описані далі.

Модифікований метод виділення ДНК із рослинного матеріалу за Doyle & Doyle, 1987 [6]. Особливістю цього методу є використання як детергенту для екстракції ДНК бромиду цетилтриметиламонія (цетавлон, СТАВ) і осадження ДНК спиртом. Методика широко застосовується впродовж десятиріччя для виділення ДНК з різноманітних рослин. Далі наведено використання в цій роботі модифікований протокол. Рослинний матеріал наважкою 50–100 мг розтирали у фарфоровій ступці зі скляним порошком до порошковидного стану, тканину переносили в пластикову пробірку ємністю 2 мл і додавали 750 мкл СТАВ буферу (2 % СТАВ, 1,4 М NaCl, 20 мМ EDTA, 100 мМ Tris-HCl рН 8,0). Матеріал можна також подрібнювати за допомогою кульового млина і кульок діаметром 3 мм у пластикових пробірках ємністю 2 мл. Суміш старанно перемішували до утворення гомогенної суспензії і інкубували на водяній бані при 65°C 40–60 хв. Далі додавали рівний об'єм суміші хлороформ / ізоаміловий спирт (24 : 1), перемішували до утворення білої емульсії та продовжували екстракцію з перемішуванням протягом 5 хв. Для розділення водної й органічної фаз суспензію центрифугували 5 хв при 10–12 тис.

об./хв. Водну фазу переносили в нову пробірку і повторювали екстракцію хлороформом.

Далі до водної фази додавали рівний об'єм ізопропанолу, швидко перемішували та осаджували ДНК центрифугуванням при 10–12 тис. об./хв впродовж 5 хв. Зливали надосадову рідину, осад двічі промивали 70 % етанолом. Після промивання спиртом осад підсушували 20–30 хв і розчиняли в 200–500 мкл ТЕ буферу рН 8,0, за необхідності нагріваючи при 55°C протягом 10–30 хв. Для видалення РНК розчин обробляли протягом 15–30 хв РНКазою А, додаючи її до кінцевої концентрації 50 мкг/мл. Розчин ДНК двічі екстрагували рівним об'ємом суміші хлороформ / ізоаміловий спирт як описано вище. ДНК осаджували 2-ма об'ємами етанолу з 0,3 М NaCl протягом 1–16 год при кімнатній температурі. Утворений розчин центрифугували при 10–12 тис. об./хв, осад двічі промивали 70 % етанолом, підсушували та розчиняли в 50–100 мкл 1×TE буфера.

Модифікований метод виділення ДНК із використанням цетавлонового буферу із наступною очисткою ДНК на мікрочастинках діоксиду кремнію за Rohland & Hofreiter 2007 [7]. У цьому методі також використовують бромід цетилтриметиламонія (цетавлон, СТАВ) як детергент для екстракції ДНК, але на кінцевих етапах для очищення ДНК застосовують мікрочастинки діоксиду кремнію (SiO₂), які за певних умов здатні вибірково зв'язувати ДНК, що дозволяє провести додаткове очищення препаратів. Початкові етапи цього методу такі ж, як і в попередньому, до моменту осадження ДНК ізопропанолом. Замість цього після екстракції хлороформом до водної фази додавали 2 об'єми 4 М NaCl та 10–20 мкл суспензії SiO₂ (виходячи з того, що 1 мг діоксиду кремнію здатний зв'язувати 2,5–3,5 мкг ДНК) старанно перемішували та інкубували впродовж 5–15 хв при кімнатній температурі за постійного перемішування. Далі частинки SiO₂ осаджували коротким центрифугуванням 5–10 с при 10–12 тис. об./хв. Осад промивали 4 М NaCl, ресуспендували та повторно осаджували. До осаду додавали 0,5–1 мл буферу для відмивання (52 % етанол, 10 мМ Tris-HCl рН 8,0, 125 мМ NaCl, 1 мМ EDTA) і ресуспендували, SiO₂ осаджували і після видалення супернатанту повторювали процедуру промивки. Осад підсушували 15 хв при кімнатній температурі, додавали 10–20 мкл 1×TE залежно від кількості осаду, та інкубували впродовж 5–15 хв при кімнатній температурі. Далі,

діоксид кремнію осаджували центрифугуванням при 10–12 тис. об./хв 1–2 хв. Супернатант перенесли в чисту пробірку та повторювали процедуру змивання ДНК з діоксиду кремнію з половинним від попереднього об'ємом $1 \times TE$. Супернатанти об'єднували та додатково центрифугували 2–4 хв при 10–12 тис. об./хв для видалення залишків діоксиду кремнію.

Модифікований метод виділення ДНК із використанням цетавлонового буферу за Wang et al. 2013 [8]. Принциповою відмінністю цього методу від попередніх є екстракція розчинних речовин з розтертого матеріалу охолодженим сольовим буфером, яка передує виділенню ДНК з детергентом. Наважку сухої листкової тканини масою 30–120 мг розтирали в ступці, розтертий матеріал перенесли в пластикову пробірку ємністю 2 мл. Матеріал можна також подрібнювати за допомогою кульового млина і кульок діаметром 3 мм в пластикових пробірках ємністю 2 мл. Додавали 1–1,6 мл буфера TNE (200 mM TrisHCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 50 mM EDTA), охолодженого до $+4^{\circ}C$, ретельно перемішували та інкубували на льодяній бані протягом 5–10 хв з періодичним інтенсивним перемішуванням. Після цього пробірки центрифугували 5 хв при 10–12 тис. об./хв. Надосадову рідину зливали і повторно промивали осад буфером TNE. У випадку великої в'язкості надосадової рідини, процедуру повторювали ще раз. Після цього до осаду додавали 800 мкл $2 \times STAB$ буферу, ретельно перемішували та інкубували 40–90 хв при $65^{\circ}C$ з періодичним обережним перемішуванням. Після інкубації до розчину додавали приблизно 750 мкл суміші хлороформ / ізоаміловий спирт (24 : 1) і перемішували впродовж 3–5 хвилин. Пробірки центрифугували 10 хв при 10–12 тис. об./хв, після чого водну фазу відбирали в чисту пробірку. До супернатанту додавали РНКазу А (до кінцевої концентрації 15–50 мкг/мл) й інкубували 30 хв при $37^{\circ}C$. Повторно проводили процедуру екстракції хлороформом. У пробірку з відібраною водною фазою додавали 0,5 об'єму 5 M NaCl та 0,7 об'єму холодного ізопропанолу. Вміст пробірок ретельно перемішували перевертанням і залишали на 40 хв при $4^{\circ}C$. Після цього пробірки центрифугували 10 хв при 10–12 тис. об./хв і обережно зливали надосадову рідину. Осад двічі промивали 500 мкл холодного 70 % етанолу (на цьому етапі потрібна обережність, бо осад легко відстає від стінки пробірки) і підсушували 20–30 хв. Далі осад старанно розчиняли в 200

мкл TES буфера (10 mM TrisHCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) (можна підігріти) і осаджували ДНК додаванням двох об'ємів охолодженого 96 % етанолу з наступним перемішуванням шляхом перевертання. Пробірки одразу центрифугували 10 хв при 10–12 тис. об./хв, осад двічі промивали 300–500 мкл холодного 70 % етанолу і підсушували при кімнатній температурі. Осад розчиняли в 50–100 мкл $1 \times TE$ буфера.

Якість і кількість виділеної ДНК оцінювали за допомогою спектрофотометра NanoDrop або після електрофоретичного фракціонування в агарозному гелі шляхом порівнянням з ДНК фага лямбда з відомою концентрацією.

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в реакційній суміші об'ємом 20 мкл, яка містила $1 \times$ буфер для ПЛР з $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 mM дНТФ, 2 mM $MgCl_2$, 0,5–1 mM праймера, 1 од Taq-полімерази та 30–50 нг ДНК. Для ампліфікації ДНК використовували універсальні iPBS праймери [9] або специфічні до ліщини SSR праймери [10]. Реакцію проводили в термоциклері Techne Prime (Cole-Parmer, United States) в умовах, рекомендованих розробниками праймерів.

Фракціонування продуктів ПЛР в агарозному гелі. Продукти ПЛР фракціонували електрофорезом у постійному електричному полі з градієнтом напруги 4 В/см, у 1,5 % агарозному гелі в $1 \times SB$ буфері (5 mM $Na_2B_4O_7$, pH 8,5) протягом 5 годин. ДНК візуалізували забарвленням бромистим етидієм і фотографували в УФ-світлі. В якості стандарту для визначення розміру фрагментів ДНК використовували ДНК Marker 100 bp (100 bp + 1,5 Kbp; SibEnzyme).

Результати та обговорення

Перші спроби виділення ДНК зі свіжої і висушеної при $37^{\circ}C$ листкової тканини *C. avellana* за допомогою модифікованого методу екстракції з бромідом цетилтриметиламонію (СТАВ) [6], який ми раніше використовували для інших видів рослин, виявилися невдалими. При інкубації подрібненого листкового матеріалу в $2 \times$ СТАВ буфері для екстракції утворювався надзвичайно в'язкий розчин, який було важко перемішувати піпеткою. Цей розчин погано перемішувався з хлороформом, а після центрифугування водна фаза містила слизові тяжі, які тягнулися в інтерфазу і під нею, що ускладнювало відбирання матеріалу. Після осадження ізопропиловим або етиловим спиртами утворю-

валася значна кількість осаду, який погано розчинявся в ТЕ-буфері. Після розчинення утворювався дуже в'язкий розчин, який містив мізерні кількості ДНК.

Щоб позбавитися розчинних сполук, які співосаджуються разом з ДНК при додаванні спирту, була зроблена спроба додаткового очищення ДНК після екстракції 2×СТАВ буфером шляхом зв'язування з мікрочастинками SiO_2 в присутності 5М NaCl з використанням модифікованої методики [7]. Ця методика успішно застосовувалася нами для виділення невеликих кількостей ДНК з сухого рослинного матеріалу інших видів, але у випадку висушеного листя ліщини вона виявилася неефективною, оскільки незважаючи на високу в'язкість розчину, отриманого після екстракції ДНК, зв'язаної з SiO_2 , концентрація ДНК в отриманому розчині була дуже низькою. Склалося враження, що розчинні метаболіти, які осаджуються спиртом разом із ДНК, так само успішно зв'язуються з мікрочастинками SiO_2 у стандартних умовах зв'язування ДНК.

Висновком з цих двох невдалих спроб стало розуміння необхідності видалення розчинних метаболітів, що містяться у листовій тканині ліщини, ще до етапу екстракції ДНК СТАВ-буфером. У випадку свіжого рослинного матеріалу це можливо зробити шляхом розтирання матеріалу в буфері відповідного складу для виділення клітинних ядер з наступною екстракцією розчинних компонентів клітини достатньою кількістю буферу і центрифугуванням перед подальшим лізисом з детергентом. Водночас, ми були зацікавлені у пошуку універсальної методики, яка б дозволяла працювати з невеликими кількостями сухого матеріалу, який є більш зручним для транспортування і зберігання. Тому нашу увагу привернув метод, застосований для виділення ДНК із замороженої листової та камбіальної тканини видів роду *Betula*, який належить до одного сімейства з ліщиною (*Betulaceae*) [8]. Особливістю цього методу є багаторазова попередня екстракція розчинних речовин з розтертого рослинного матеріалу льодяним буфером з NaCl та проміжне осадження ДНК ізопропанолом у присутності 1М NaCl після екстракції з цетавлоном.

Після кількох успішних спроб виділення ДНК з ліщини із застосуванням цього методу ми внесли в нього кілька змін з метою пристосування до власних умов. В оригінальному протоколі зразки подрібнювали у рідкому азоті, однак враховуючи те, що в нашій роботі вихідним матеріалом було сухе листя, ми застосували розтирання у ступці із скляним порошком або в пластикових пробірках з металевими кульками на кульовому млині. Такий спосіб подрібнення зразків виявився достатньо ефективним та позбавив залежності від наявності рідкого азоту. Крім того, в оригінальному протоколі разом з СТАВ буфером до зразку з метою додаткової депротеїнізації додавали 100 мкл 10 % розчину N-лауроїлсаркозинату натрію і 20 мкл протейнази К. Цю обробку було виключено з модифікованого протоколу, оскільки вона не впливала істотно на якість отриманої ДНК. Це дозволило скоротити час інкубації при 65°C з 3 год до 45–60 хв і тривалість виділення ДНК у цілому. Крім того, ми встановили, що зниження концентрації РНКаз в 5–10 разів, порівняно з вихідною методикою, також не впливає на ефективність очищення зразків від РНК.

Як показали наші дослідження, оптимізована методика може бути успішно застосована для виділення ДНК з висушених зразків молодого листя видів *Corylus*. З 80–120 мг сухої листової тканини може бути виділено 1,5–2,5 мкг ДНК. Електрофоретичне розділення показало, що отримані препарати мають показники (розмір фрагментів ДНК) порівнювані з комерційними препаратами ДНК фага λ (рис. А). Спектрофотометричний аналіз чистоти виділених препаратів показав, що вони мають значення співвідношення поглинання A_{260} / A_{280} у межах 1,8–1,9, а A_{260} / A_{230} – близько 2,2, які свідчать про достатньо високий рівень очищення від білків та полісахаридів. Для виділення високомолекулярної ДНК найкраще придатна тканина молодих листків, зібраних не пізніше червня, оскільки вихід ДНК із зібраного пізніше матеріалу знижується. Для виділення ДНК в іншу пору року потенційно може бути використана камбіальна тканина або суцвіття після відповідного адаптування перших кроків методики.

Використання препаратів виділеної ДНК у мультиплексній ПЛР з SSR-праймерами [10] та в ПЛР з iPBS-праймерами [9] (рис. Б, В) показало, що застосована методика забезпечує отримання препаратів ДНК ліщини, цілком придатних для використання в ПЛР-аналізі.

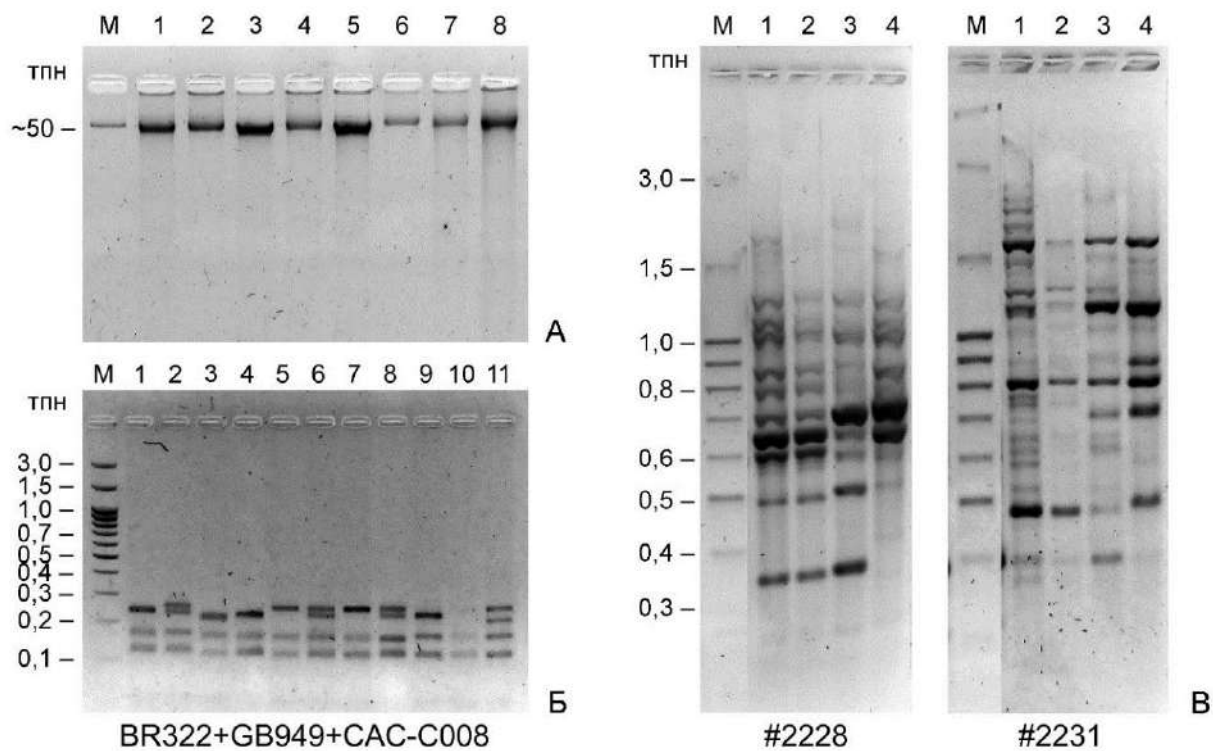


Рис. Електрофоретичні спектри препаратів ДНК, виділеної із висушених листків *Corylus* spp. (А), та ПЛР-продуктів, отриманих з ДНК *Corylus* spp. у мультиплексній ПЛР трьома SSR праймерами [10] (Б) та звичайній ПЛР з іPBS праймерами [9] (В). Назви праймерів вказано під електрофореграмами. М – стандарти ДНК: ДНК фага λ , 20 нг (А) та маркер 100 bp (100 bp + 1,5 Kbp; SibEnzyme) (Б, В).

Отримані результати свідчать, що модифікований метод дозволяє отримати препарати ДНК, придатні для проведення молекулярно-генетичного аналізу сортів та видів ліщини із використанням ПЛР, та може бути використаний при проведенні селекційно-генетичних досліджень, а також генетичної паспортизації та ідентифікації сортів ліщини.

Висновки

Проведено аналіз можливості застосування для виділення ДНК з листкової тканини ліщини (*Corylus*) трьох методів з цетавлоном в якості детергенту, які відрізняються особливостями очищення ДНК: загальноприйнятий метод за Doyle, Doyle, 1987; модифікований метод з очищенням на мікрочастинках діоксиду кремнію; метод з етапом екстракції розчинних клі-

тинних речовин, який передуює екстракції ДНК. Встановлено, що перші два методи не дозволяють позбутися в препаратах ДНК розчинних вторинних метаболітів, які осаджуються спиртом або зв'язуються з діоксидом кремнію одночасно з ДНК. Показано, що останній метод дозволяє видалити значну частину водорозчинних органічних речовин на перших етапах і отримати якісні препарати ДНК. Таким чином, було підібрано та оптимізовано метод виділення ДНК з рослин видів і гібридів *Corylus* spp., який дозволяє отримати з висушеної листкової тканини в достатній кількості якісну високомолекулярну ДНК, придатну для подальшого використання в молекулярно-генетичному аналізі із застосуванням ПЛР.

References

- Whitcher I. N., Wen J. Phylogeny and biogeography of *Corylus* (Betulaceae): Inferences from ITS sequences. *Syst. Bot.* 2001. Vol. 26 (2). P. 283–298. doi: 10.1043/0363-6445-26.2.283.
- Mohammadzede M., Fattahi R., Zamani Z., Khadivi-Khub A. Genetic identity and relationships of hazelnut (*Corylus avellana* L.) landraces as revealed by morphological characteristics and molecular markers. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 2014. Vol. 167. P. 17–26. doi: 10.1016/j.scienta.2013.12.025.

3. Kosenko I. S., Opalko A. I., Balabak O. A., Opalko O. A., Balabak A. V. Hazelnut (*Corylus domestica* Kos. et Opal.) research and breeding at National Dendrological Park (NDP) “Sofiyivka” of the National Academy of Sciences (NAS) of Ukraine. In: Temperate horticulture for sustainable development and environment. Apple Academic Press, 2018. P. 237–267. doi: 10.1201/9781351249393-27.
4. Kosenko I. S., Opalko A. I., Balabak O. A., Opalko O. A. Use of chinese hazel (*Corylus chinese* French.) in hazelnut breeding (*Corylus domestica* Kos. et Opal.). *Fakt. Eksp. Evol. Org.* 2020. Vol. 27. P. 113–118. doi: 10.7124/feeo.v27.1312. [in Ukrainian]
5. Riethmüller E., Alberti Á., Tóth G., Béni S., Ortolano F., Kéry Á. Characterisation of diarylheptanoid- and flavonoid-type phenolics in *Corylus avellana* L. leaves and bark by HPLC/DAD-ESI/MS. *Phytochem. Anal.* 2013. Vol. 24 (5). P. 493–503. doi: 10.1002/pca.2452.
6. Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 1987. Vol. 11. P. 11–15.
7. Rohland N., Hofreiter M. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *Biotechniques.* 2007. Vol. 42 (3). P. 343–352. doi: 10.2144/000112383.
8. Wang N., Thomson M., Bodles W. J. A., Crawford R. M. M., Hunt H. V., Featherstone A. W. et al. Genome sequence of dwarf birch (*Betula nana*) and cross-species RAD markers. *Mol. Ecol.* 2013. Vol. 22 (11). P. 3098–3111. doi: 10.1111/MEC.12131.
9. Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman A. H. iPBS: A universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theor. Appl. Genet.* 2010. Vol. 121 (8). P. 1419–1430. doi: 10.1007/s00122-010-1398-2.
10. Akin M., Nyberg A., Postman J., Mehlenbacher S., Bassil N. V. A multiplexed microsatellite fingerprinting set for hazelnut cultivar identification. *Eur. J. Hort. Sci.* 2016. Vol. 81 (6). P. 327–338. doi: 10.17660/eJHS.2016/81.6.6.

MISHCHENKO A. M., ANDREEV I. O.

Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 150

SELECTION AND OPTIMIZATION OF THE METHOD FOR DNA ISOLATION AND PURIFICATION FROM *CORYLUS* SPECIES FOR PCR ANALYSIS

Aim. The use of molecular genetic analysis tools requires DNA preparations of high purity. However, in the case of hazelnut plants (*Corylus* spp.), obtaining quality DNA is complicated by the presence of a significant amount of secondary metabolites in the leaf tissue. The aim of the study was to select and optimize the method for isolation and purification of hazelnut DNA for further use in PCR analysis. **Methods.** Three methods of DNA isolation using cetavlon as a detergent were used, which differ in the DNA purification steps: the commonly used protocol by Doyle, Doyle, 1987; a modified method with purification using silicon dioxide microparticles; and a method using the extraction of soluble metabolites, which precedes the DNA isolation step. **Results.** The first two methods were shown to be unsuitable for DNA isolation from dry hazelnut leaves due to a high amount of impurities. The last method allowed to remove a significant part of water-soluble organic substances at the first stage and obtain high-quality DNA preparations. **Conclusions.** The method for DNA isolation from *Corylus* spp. plants and hybrids was selected and optimized, which allows isolation of a sufficient amount of high-quality DNA from dried leaf tissue, suitable for further molecular genetic analysis using PCR.

Keywords: *Corylus* spp., DNA isolation, molecular genetic analysis.