

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского

Биология. Химия. Том 5 (71). 2019. № 3. С. 3–11.

УДК 581.8:577

ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ В ЛИСТЬЯХ ЛАВАНДИНА И КАЧЕСТВО ВЫДЕЛЕННОЙ ДНК В СВЯЗИ С АНАТОМИЧЕСКИМИ ОСОБЕННОСТЯМИ

Булавин И. В., Браилко В. А., Митрофанова И. В.

*ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад –
Национальный научный центр РАН», Ялта, Российская Федерация
E-mail: labgennbs@yandex.ru*

Исследовано накопление включений с эфирными маслами в тканях листовых пластинок лавандина сорта Рабат, культивируемого *in vitro* и *ex situ*. Осуществлено выделение ДНК из листьев микропобегов *in vitro* и растений *ex situ* при помощи двух коммерческих наборов: PureLink® Plant Total DNA Purification Kit (Thermo Scientific™, USA) и NucleoSpin® Plant II Midi kit (Macherey Nagel, Germany). При помощи спектрофотометрического анализа и автоматизированной системы для электрофореза произведена оценка качества и количества ДНК. На основе полученных данных сделаны выводы о предпочтительном методе выделения ДНК из листьев лавандина для молекулярных исследований.

Ключевые слова: лавандин *in vitro* и *ex situ*, листья, эфирное масло, судан III, выделение ДНК.

ВВЕДЕНИЕ

Эфиромасличные растения являются возобновляемым источником сырья, которое используется в медицине и производстве парфюмерно-косметических средств [1]. Общее число эфирномасличных растений мировой флоры оценивается в 2500–3000 видов. Основными семейства, включающими большее число эфирномасличных растений, являются Lamiaceae, Apiaceae, Asteraceae [2]. В Крыму среди представителей эфиромасличных культур из семейства Lamiaceae лаванда входит в число наиболее культивируемых растений [3]. В селекции ароматических культур отбор растений происходит по качественному и количественному выходу эфирных масел [4]. Важным направлением селекции является создание и внедрение высокопродуктивных сортов путем межсортовой и межлинейной гибридизации [5]. Перспективным межвидовым гибридом лаванды является лавандин (лаванда гибридная, *Lavandula × intermedia* Emeric ex Loisel) [6]. По урожаю цветочного сырья и содержанию эфирного масла лучшие клоны лавандина превосходят лаванду в 1,5–2,0, а по сбору эфирного масла с гектара – в 4 раза [5]. Для мультипликации элитных клонов лавандина используются клональное микроразмножение, поскольку

растения являются стерильными [7]. Использование молекулярных методов для генотипирования и секвенирования ДНК наиболее выгодных клонов обуславливает получение высококачественной и чистой ДНК, наряду с ее количественным выходом. Чистота ДНК определяется отсутствием белков, полисахаридов и вторичных метаболитов, которые зачастую препятствуют выделению высокомолекулярной нуклеиновой кислоты (НК) [8, 9] и могут снижать эффективность проведения ПЦР, а также получение качественных библиотек для последующего секвенирования, особенно в случае лекарственных и эфиромасличных культур, которые содержат значительные количества вторичных метаболитов [9, 10]. Поэтому целью данной работы было проведение оценки количества и качества ДНК, выделенной из растительного материала лавандина при помощи коммерческих наборов (китов).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходным материалом служили микропобеги лавандина сорта Рабат, культивируемые *in vitro* в фитокапсулах «БИОТРОНА» и растения, выращиваемые *ex situ* в генофондовой коллекции Никитского ботанического сада.

Для анатомических исследований препараты из листовых пластинок изготавливали согласно общепринятым методам [11]; для выявления локализации эфирных масел в тканях листа срезы окрашивали суданом III и исследовали с помощью светового микроскопа CX41 (Olympus, Japan) и программного обеспечения CellSens Imaging Software version 1.17.

Для выделения ДНК неповрежденные молодые листья отделяли от микропобегов и стеблей. Навески переносили в ступки, замораживали в жидком азоте и гомогенизировали с использованием пестика. Измельченные ткани, не допуская их оттаивания, переносили в пробирки с необходимым лизирующим (экстрагирующим) буфером. Далее проводили процедуру выделения согласно протоколам производителей наборов PureLink® Plant Total DNA Purification Kit (Thermo Scientific™, USA) и NucleoSpin® Plant II Midi kit (Macherey Nagel, Germany). Количество и качество ДНК анализировали спектрофотометрически (Implen NanoPhotometer NP80, Germany) при длинах волн A_{260} , A_{280} и A_{230} . Степень фрагментации ДНК оценивали с использованием автоматизированной системы для электрофореза Agilent 4200 TapeStation (Agilent Technologies, Germany). Эксперименты проводили в трех биологических повторностях, результаты обрабатывали статистически с использованием программного обеспечения PAST [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анатомо-морфологической оценки состояния изучаемого растительного объекта, на поперечных срезах листовых пластинок лавандина *in vitro* и *ex situ* (рис. 1) различали эпидерму, покрытую кутикулой. Под эпидермой находился дифференцированный мезофилл с губчатой и столбчатой паренхимой. Во внутренних тканях листовой пластинки четко выделялись проводящие пучки от средней и боковых жилок, в которых легко дифференцировали элементы ксилемы и флоэмы. Трихомы и устьица были с двух сторон листовой пластинки.

При окрашивании суданом III установлено накопление эфирного масла в железках, клетках покровной ткани и мезофилле (рис. 2). Визуально в листьях микропобегов лавандина, культивируемого *in vitro*, количество включений с эфирными маслами было меньшим, по сравнению с листьям растений, выращиваемых *ex situ*.

Исходя из вышеизложенного, осуществляли подбор коммерческих наборов для получения "чистой" ДНК из листьев лавандина. Согласно нашим данным, полученным при помощи спектрофотометрического анализа, набор NucleoSpin® Plant II Midi kit давал лучший результат по чистоте и количественному выходу ДНК, по сравнению с PureLink® Plant Total DNA Purification Kit, касательно как листьев от растений *in vitro* так и *ex situ* (таблица). Результаты, полученные спектрофотометрически, подтверждены электрофореграммами (рис. 3). Показатель целостности ДНК (DNA Integrity Number (DIN)) для образцов НК, выделенных из листьев, отделенных от микропобегов *in vitro* и растений *ex situ* при помощи набора PureLink® составлял $8,1 \pm 0,12$ и $8,1 \pm 0,15$, а для NucleoSpin® $9,1 \pm 0,12$ и $9 \pm 0,15$, соответственно.

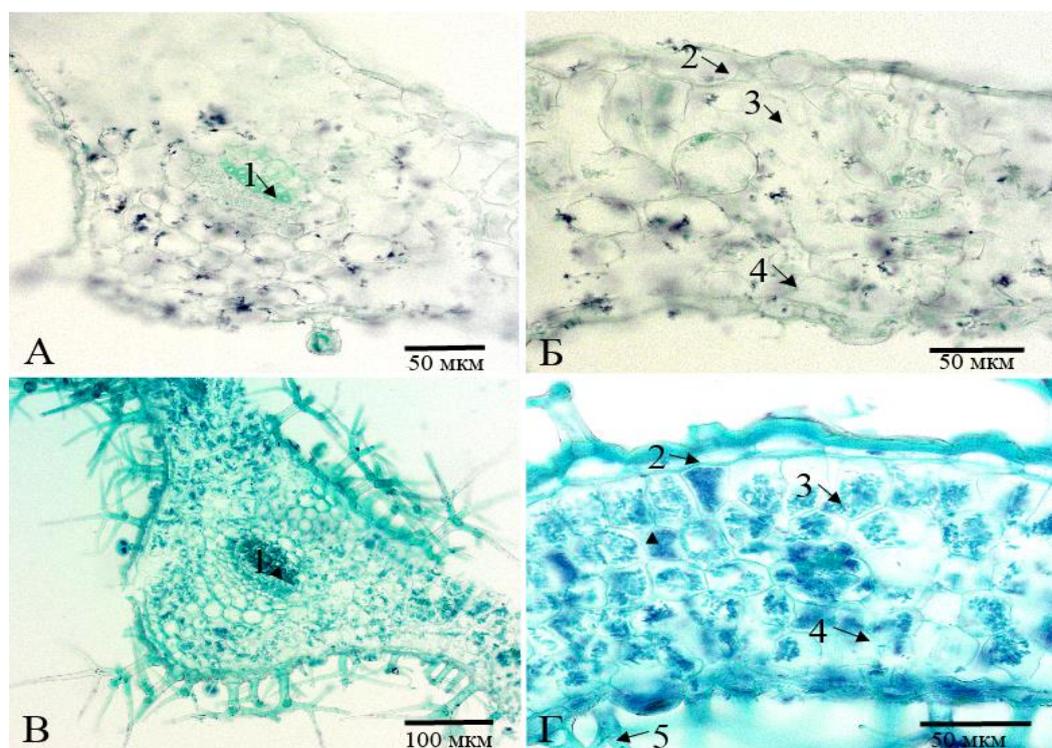


Рис. 1. Анатомия листовой пластинки лавандина сорта Рабат *in vitro* (А, Б) и *ex situ* (В, Г); 1 – проводящий пучок, 2 – эпидерма, 3 – столбчатый мезофилл, 4 – губчатый мезофилл, 5 – трихома.

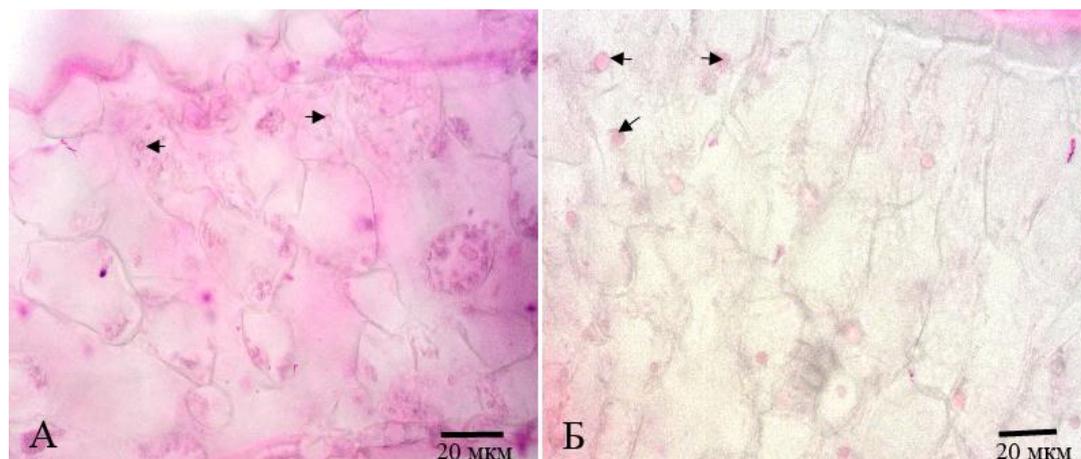


Рис. 2. Гистохимическое окрашивание включений с эфирными маслами (показано стрелками) в листьях лавандина сорта Рабат *in vitro* (А) и *ex situ* (Б).

Таблица

Показатели эффективности выделения ДНК из листьев лавандина, культивируемого *in vitro* и *ex situ*

Культивирование Набор Показатели	<i>In vitro</i>		<i>Ex situ</i>	
	Pure Link	Nucleospin	Pure Link	Nucleospin
Вес материала (мг)	101±2	203	102±4,5	206±1
A _{260/280}	1,7±0,03	1,9	1,8±0,01	1,8±0,02
A _{260/230}	1,6±0,08	2,1	1,2±0,1	2,3±0,11
Концентрация ДНК (нг/мкл)	12,3±1,5	34,6	22,7±1,4	67,5±11,0

При использовании набора PureLink® основная часть 96–98 % и 98–99 % от общей концентрации выделенной ДНК составляли последовательности 18981–21967 и 18338–24766 п.н. с концентрацией 11,1–12,4 и 13,8–18,7 нг/мкл для образцов из листьев, отделенных от микропобегов *in vitro* и растений *ex situ*, соответственно. Для набора NucleoSpin® 98–99 % от общей концентрации составляли последовательности длиной 52836–>60000 и 47477–59252 п.н. с концентрацией 17,2–48,1 и 18,8–25,6 нг/мкл для образцов *in vitro* и *ex situ*.

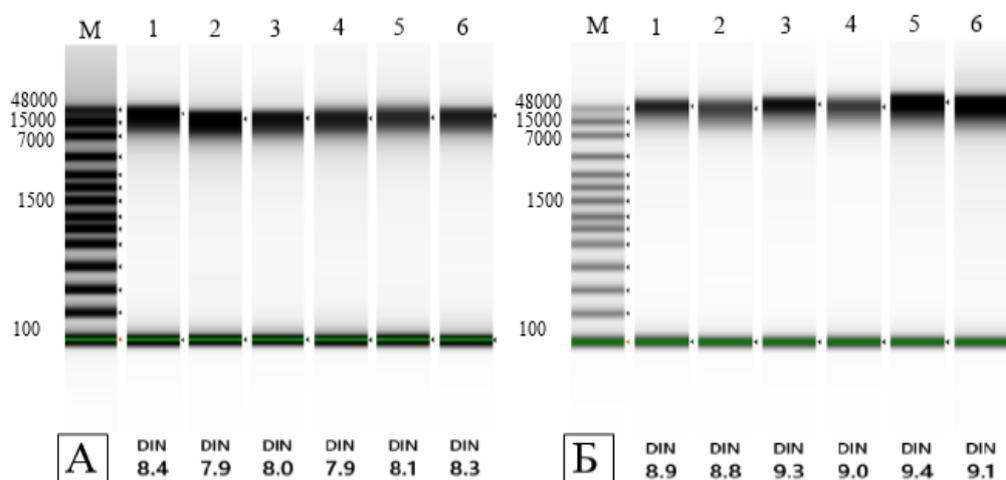


Рис. 3. Электрофореграммы ДНК, выделенной из листьев лавандина: А – набор PureLink® Plant Total DNA Purification Kit, Б – набор NucleoSpin® Plant II Midi kit; М – маркер, 1–3 – образцы ДНК из листьев растений, выращиваемых *ex situ*, 4–6 – образцы ДНК из листьев растений, культивируемых *in vitro*.

Исследования анатомии листьев лавандина сорта Рабат показали накопление эфирных масел в тканях листовых пластинок, что является типичным для данного типа растений. В качестве материала для получения ДНК использовали молодые листья лавандина, поскольку ювенильные органы содержат меньшие количества полисахаридов и других вторичных метаболитов, что способствует получению более качественной ДНК. Спектрофотометрически чистота ДНК определяется при соотношении $A_{260/280}$, характеризующим отсутствие контаминации белками в диапазоне значений 1,8–2,0, и $A_{260/230}$ подтверждающим отсутствие полисахаридов и других вторичных метаболитов в диапазоне значений 2,0–2,2 [9, 13]. Допустимые пороговые значения для $A_{260/230}$ – 1,7, для $A_{260/230}$ – 1,8 [14]. Наши результаты показали, что при использовании набора PureLink® Plant Total DNA Purification Kit значения $A_{260/280}$ находились в допустимых пределах, в то время как $A_{260/230}$ были снижены для листьев растений *ex situ* в 1,33 раза, сравнительно с листьями от микропобегов *in vitro*. NucleoSpin® Plant II Midi kit демонстрировал более стабильные показатели для материала, полученного как *in vitro* так и *ex situ*. Расхождения в чистоте полученной ДНК, возможно, связаны с отличным компонентным составом лизирующих/экстрагирующих буферов. Буфер набора PureLink® содержит SDS/ДСН (додецилсульфат натрия), а NucleoSpin® – СТАВ/ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромид). СТАВ является неионогенным детергентом, способным осаждать НК и кислые полисахариды из растворов [13, 15]. Детергент образует стабильные, но растворимые комплексы при высоких концентрациях солей (0,7М NaCl). При низких концентрациях соли (4М NaCl) формирует комплекс СТАВ/НК в виде осадка, при этом большая часть

полисахаридов остается в растворе [16, 17]. SDS, в отличие от СТАВ, осаждает белки и полисахариды как нерастворимый комплекс [18]. Наши данные также показали, что использование набора NucleoSpin® позволило получить больший количественный выход высокомолекулярной ДНК, что крайне важно в процессе секвенирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате анатомических исследований отмечено большее количество включений с эфирными маслами в тканях листьев лавандина сорта Рабат, культивируемого *ex situ*.
2. Чистота ДНК, выделенной из листьев лавандина, отделенных от микропобегов *in vitro* и растений *ex situ*, находится в зависимости от накопления эфирных масел в листовой пластике.
3. Для получения стабильного качественного и количественного выхода высокомолекулярной ДНК из листьев лавандина сорта Рабат предпочтительнее использовать коммерческие наборы в состав которых входит СТАВ.

Исследования выполнены на базе Уникальной научной установки «Научный центр биотехнологии, геномики и депонирования растений» (УНУ «ФИТОБИОГЕН») в рамках госзадания № 0829-2019-0038 ФГБУН «НБС-ННЦ».

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторский коллектив благодарит куратора генофондовой коллекции лаванды н.с. лаборатории эфиромасличных растений ФГБУН «НБС-ННЦ» Хохлова Ю. С. за предоставленные для исследования растения, выращиваемые в открытом грунте, и м.н.с. лаборатории биотехнологии и вирусологии растений Челомбит С. В. и Жданову И. В. за предоставленные для исследований микропобеги лавандина *in vitro*.

Список литературы

1. Аббасова З. Г. Интродукция некоторых перспективных лекарственных и эфиромасличных растений в Мардакянском дендрарии / З. Г. Аббасова, З. А. Мамедова, Р. М. Мамедов // Химия растительного сырья. – 2009. – №1. – С. 121–124.
2. Ткаченко К. Г. Эфирномасличные растения и эфирные масла: достижения и перспективы, современные тенденции изучения и применения / К. Г. Ткаченко // Вестник удмуртского университета. – 2011. – Вып. 1 Биология. Науки о земле. – С. 88–100.
3. Пегушина А. А. Исследование факторов развития предприятий эфиромасличной отрасли Республики Крым / А. А. Пегушина // КАНТ. – 2017. – С. 198–201.
4. Невкрытая Н. В. Актуальные направления биохимических исследований эфиромасличных растений (Обзор. Часть I) / Н. В. Невкрытая, А. В. Мишнев // Таврический вестник аграрной науки. – 2018. – № 4(16). – С. 102–124.
5. Работягов В. Д. Селекция лаванды и классификация ее межвидовых гибридов / В. Д. Работягов, Л. В. Свиденко // Труды никитского ботанического сада. – 2011. – Т. 133. – С. 197–208.
6. Палий А. Е. Биологически активные вещества *Lavandula × intermedia* Emeric ex Loisel (Lamiaceae) / А. Е. Палий, В. Д. Работягов // Фармация и фармакология. – 2016. – №4. – С. 46–54.

7. Panizza M. Clonal propagation, callus formation and plant regeneration of lavandin / M. Panizza, F. Tognoni // *Scientia Horticulturae*. – 1988. – Vol. 37, Issue 1-2. – P. 157–163.
8. Ghaffariyan S. DNA isolation protocol for the medicinal plant lemon balm (*Melissa officinalis*, Lamiaceae) / S. Ghaffariyan, S. A. Mohammadi, S. Aharizad // *Genet. Mol. Res.* – 2012. – Vol. 11. – P. 1049–1057.
9. Vega-Vela N. E. Isolation of high-quality DNA in 16 aromatic and medicinal Colombian species using silica-based extraction columns / N. E. Vega-Vela, M. I. Chacon-Sanchez // *Agronomia Colombiana*. – 2011. – Vol. 23, No 3. – P. 349–357.
10. Sharma P. Isolation of genomic DNA from medicinal plants without liquid nitrogen / P. Sharma, N. Joshi, A. Sharma // *Indian Journal of Experimental Biology*. – 2010. – Vol. 48, No 6. – P. 610–614.
11. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений / З. П. Паушева – М.: Колос, 1980. – 304 с.
12. Hammer Ø. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis / Ø. Hammer, D. A. T. Harper, P. D. Ryan // *Palaeontologia Electronica*. – 2001. – Vol. 4, No 1. – 9 p.
13. Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, vol. 1 / J. Sambrook, D. Russel – 3rd edition – NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – 2100 p.
14. Tiwari S. Modified Protocol for Plant Genomic DNA Isolation / S. Tiwari, R. S. Tomar, M. K. Tripathi, A. Ahuja. // *Indian Res. J. Genet. & Biotech.* – 2017 – V. 9, No 4. – P. 478–485.
15. Tan S. C. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present / S. C. Tan, B. C. Yiap. // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. – 2009. – Vol. 2009. – Article ID 574398. – 7 p.
16. Poms R. E. Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat / R. E. Poms, J. Glossl, H. Foissy // *European Food Research and Technology*. – 2001. – Vol. 213. – P. 361–365.
17. Остроумов Л. А. Метод выделения растительной ДНК из растений и продуктов питания на их основе / Л. А. Остроумов, А. Ю. Просеков, А. Н. Архипов, О. В. Мудрикова // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. – 2010. – Т. 12, №4(3). – С. 722–724.
18. Рябушкина Н. А. Специфика выделения ДНК из растительных объектов / Н. А. Рябушкина, М. Е. Омашева, Н. Н. Галиакпаров // *Биотехнология. Теория и практика*. – 2012. – № 2. – С. 9–26.

ESSENTIAL OIL HISTOCHEMICAL STAINING IN THE LAVANDIN LEAVES AND ISOLATED DNA QUALITY REGARD TO ANATOMY

Bulavin I. V., Brailko V. A., Mitrofanova I. V.

*FSBSI "Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center" Yalta, Russian Federation
E-mail: labgennbs@yandex.ru*

The use of molecular methods for genotyping and DNA sequencing leads to the production of high-quality and pure DNA, along with its quantitative yield. DNA purity is determined by the absence of proteins, polysaccharides and secondary metabolites, which often impede the release of a high molecular weight nucleic acid and can reduce the efficiency of PCR, as well as obtaining high-quality libraries for subsequent sequencing, especially in the case of medicinal and essential oil plants that contain significant amounts of secondary metabolites. Therefore, the objective of this work was to assess the quantity and quality of DNA, isolated from lavandin plant material, using commercial kits.

In our investigation we used the leaves of lavandin 'Rabat' cultivars, growing *in vitro* in BIOTRON phytocapsules and *ex situ* from the collection of the Nikita Botanical Gardens. For anatomical observations, the samples from leaf blades were made according to generally accepted methods. To identify the localization of essential oils in leaf tissues,

the sections were stained with Sudan III and examined, using a CX41 light microscope (Olympus, Japon) equipped with CellSens Imaging Software version 1.17.

For DNA isolation, intact young leaves were cut off from microshoots *in vitro* and plants *ex situ*. The samples were transferred to mortars, frozen in a liquid nitrogen, and homogenized using a pestle. Obtained powder, preventing their thawing, was transferred to tubes with the necessary lysing (extracting) buffer. Then, the isolation procedure was carried out according to the protocols of PureLink® Plant Total DNA Purification Kit (Thermo Scientific™, USA) and NucleoSpin® Plant II Midi kit (Macherey Nagel, Germany). The quantity and quality of DNA was evaluated with using nanophotometer (Implen NanoPhotometer NP80, Germany) at wavelengths A_{260} , A_{280} and A_{230} . The degree of DNA fragmentation was evaluated using an Agilent 4200 TapeStation automated electrophoresis system (Agilent Technologies, Germany). The experiments were performed in three biological replicates, the results were statistically processed using PAST software.

According to an anatomical observation, the cuticle, coated epidermis, was distinguished in cross sections of lavandin leaf blades *in vitro* and *ex situ*. Under the epidermis differentiated mesophyll was revealed. In the internal tissues of the leaf blade, the bundles from the middle and lateral veins were clearly distinguished, in which the elements of xylem and phloem were easily differentiated. Trichomes and stomata revealed on both sides of the leaf blade. Accumulation of essential oil was established in the glands, epidermis cells and mesophyll with Sudan III staining. Visually, the number of inclusions with essential oils was lower in the leaves of the microshoots *in vitro*, compared to the same *ex situ*.

Based on the data described above, we performed the selection of commercial kits to obtain "pure" DNA from lavandin leaves. It was shown by spectrophotometrically that NucleoSpin® Plant II Midi kit gave the best results for the purity and quantitative DNA yield compared to the PureLink® Plant Total DNA Purification Kit, for both for *in vitro* and *ex situ* leaves. The obtained results were confirmed by electrophoregrams. DNA Integrity Number (DIN) for NA samples isolated from leaves cut off from *in vitro* microshoots and *ex situ* plants using the PureLink® kit was $8,1 \pm 0,12$ and $8,1 \pm 0,15$, and for NucleoSpin® $9,1 \pm 0,12$ and $9 \pm 0,15$, respectively.

When PureLink® kit was used, 96–98 % and 98–99 % sequences from the total extracted DNA were in range 18,981–21,967 and 18,338–24,766 bp with a concentration of 11,1–12,4 and 13,8–18,7 ng/μl for samples *in vitro* and *ex situ*, respectively. For the NucleoSpin® kit, 98–99 % sequences of the total DNA were in range 52,836–>60,000 and 47,477–59,252 bp with a concentration of 17,2–48,1 and 18,8–25,6 ng/μl for samples *in vitro* and *ex situ*.

Our data have demonstrated that for DNA isolation from leaves of the 'Rabat' cultivars, it is preferable to use commercial kits that include CTAB, which provide a stable qualitative and quantitative yield of high molecular weight DNA.

Keywords: lavandin *in vitro* and *ex situ*, leaves, essential oil, Sudan III, DNA isolation.

References

1. Abbasova Z. G., Mamedova Z. A., Mamedov R. M., Introdukciya nekotoryh perspektivnyh lekarstvennyh i efiromaslichnyh rastenij v Mardakyanskom dendrarii, *Himija rastitel'nogo syr'ja*, **1**, 121 (2009).
2. Tkachenko K. G., Essential oils plants and essential oils: progress and perspectives, modern tendencies of research and application, *Bulletin of Udmurt University. Series Biology. Earth Sciences*, **1**, 88 (2011).
3. Pegushina A. A., Investigation of factors of enterprise development of enterprises of the ethical industry of the Republic of Crimea, *KANT*, 198 (2017).
4. Nevkrytaya N. V., Mishnev A. V., Actual and contemporary directions of biochemical research of oil-bearing plants (Review, Part I), *Taurida herald of the agrarian sciences*, **4(16)**, 102 (2018).
5. Rabotyagov V. D., Svydenko L. V., Selection of *Lavandula L.* is the classification of its interspecific hybrids, *Works Nikit. Botan. Gard.*, **133**, 197 (2011).
6. Paliy A. E., Rabotyagov V. D., Biologically active substances of *Lavandula × intermedia* Emeric ex Loisel (Lamiaceae), *Pharmacy & pharmacology*, **4(1)**, 46 (2016).
7. Panizza M., Tognoni F., Clonal propagation, callus formation and plant regeneration of lavandin, *Scientia Horticulturae*, **37(1-2)**, 157 (1988).
8. Ghaffariyan S., Mohammadi S. A., Aharizad S., DNA isolation protocol for the medicinal plant lemon balm (*Melissa officinalis*, Lamiaceae), *Genet. Mol. Res*, **11**, 1049 (2012).
9. Vega-Vela N. E., Chacon-Sanchez M. I., Isolation of high-quality DNA in 16 aromatic and medicinal Colombian species using silica-based extraction columns, *Agronomía Colombiana*, **23(3)**, 349 (2011).
10. Sharma P., Joshi N., Sharma A., Isolation of genomic DNA from medicinal plants without liquid nitrogen, *Indian Journal of Experimental Biology*, **48(6)**, 610 (2010).
11. Pausheva Z. P., *Praktikum po citologii rastenij*, 304 p., (Kolos, Moscow, 1980).
12. Hammer O., Harper D. A. T., Ryan P. D., PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis, *Palaeontologia Electronica*, **4(1)**, 1 (2001).
13. Sambrook J., Russel D., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, vol. 1*, 2100 p., (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001).
14. Tiwari S., Tomar R. S., Tripathi M. K., Ahuja A., Modified Protocol for Plant Genomic DNA Isolation, *Indian Res. J. Genet. & Biotech.*, **9(4)**, 478 (2017).
15. Tan S. C., Yiap B. C., DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 574398, **2009**, 7 (2009).
16. Poms R. E., Glossl J., Foissy H., Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat, *European Food Reseach and Technology*, **213**, 361 (2001).
17. Ostroumov L. A., Prosekov A. Yu., Arhipov A. N., Mudrikova O. V., Method of vegetative DNA isolation from plants and food stuffs on their basis, *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*, **12, 4(3)**, 722 (2010).
18. Ryabushkina N. A., Omasheva M. E., Galiakparov N. N., Specifika vydeleniya DNK iz rastitel'nyh ob'ektov, *Biotehnologiya. Teoriya i praktika*, **2**, 9 (2012).