

морфогенеза (МС427 с 1,0 мг/л БАП). В следующем пассаже после отрастания неморфогенные каллусные культуры переносили на среду МС427.

Однако линии лаванды, отобранные из устойчивых неморфогенных каллусов, при их дальнейшем переводе на регенерационную среду были не способны к морфогенезу. После холодового стресса индукцию морфогенеза наблюдали только у линий, отобранных из морфогенных каллусов. При этом у выделенных устойчивых линий частота морфогенеза снижалась в 3–5 раз, а развитие почек и побегов было заторможено по сравнению с контролем, что часто отмечали при клеточной селекции других видов растений [1, 2]. Из отобранных устойчивых к низкой температуре каллусных линий лаванды получены растения-регенеранты, которые будут в дальнейшем изучены в полевых условиях.

В результате исследований показана большая эффективность использования для клеточной селекции лаванды на устойчивость к низкотемпературному стрессу морфогенных каллусных культур, чем неморфогенных; определен сублетальный режим обработки; отобраны устойчивые линии, из которых получены растения-регенеранты.

Литература

1. Rai M. K., Kalia R. K., Singh R., Gangola M. P., Dhawan A. K. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – an overview of the recent progress // *Environmental and Experimental Botany*. 2011. Vol. 71(1). P. 89–98.
2. Дубровна О. В., Чугункова Т. В., Бавол А. В., Лялько І. І. Біотехнологічні та цитогенетичні основи створення рослин, стійких до стресів. Київ: Логос, 2012. 428 с.
3. Kondic-Sipka A., Hristov N., Kobiljski B. *In vitro* screening for low temperature tolerance of wheat genotypes // *Genetica*. 2006. Vol. 38. No. 2. P. 137–144.
4. Егорова Н. А., Ставцева И. В. Разработка биотехнологических приемов получения устойчивых к низкотемпературному стрессу форм кориандра *in vitro* // *Масличные культуры*. 2016. Вып. 1 (165). С. 43–50.
5. Егорова Н. А., Ставцева И. В. Разработка селективной системы *in vitro* для получения каллусных линий лаванды, устойчивых к низкой температуре // *Труды Кубанского государственного аграрного университета*. 2017. № 4 (67). С. 48–51.

UDC 633.81:57.085.2

Yegorova N. A., Stavtseva I. V.

Optimization of the methods of lavender cell selection for resistance to low temperature stress

Summary. The influence of low-temperature stress on the callus culture development of *Lavandula angustifolia* was investigated. The use of morphogenic callus is more effective for cell selection than that of non morphogenic one. The sublethal regime of treatment by stress factor for morphogenic callus was determined – freezing during 19 days when air temperature decreases gradually to –14 °C. Resistant lines were selected, then plants were regenerated from them.

Keywords: *Lavandula angustifolia*, selection *in vitro*, low- temperature stress, callus culture.

DOI 10.33952/2542-0720-2020-5-9-10-90

УДК 635.71+ 577.113.083

Загорская Маргарита Сергеевна

Некоторые аспекты выделения геномной ДНК из растений лаванды разного происхождения

ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»
e-mail: zagorskayamargo@gmail.com

Лаванда узколистная (*Lavandula angustifolia* Mill.) – лекарственное, эфиромасличное, пряно-ароматическое многолетнее растение семейства Lamiaceae. Из-за богатого насыщения биологически активными компонентами, используют как само растение, так и эфирное масло. Эфирное масло лаванды узколистной (основные компоненты – линалилацетат и линалоол) обладает противовоспалительным,

антифунгальным, седативным, антиконвульсивным, обезболивающим, антисептическим, антиоксидантным действием [1].

Методика выделения ДНК из растений лаванды, как эфиромасличной культуры, имеет ряд трудностей. При том, в молекулярно-генетических исследованиях часто используется не только свежий материал, но и микропобеги из культуры *in vitro*, замороженный материал. Оптимизация методики выделения ДНК для подобных состояний биоматериала актуальна.

Цель работы: оптимизировать метод выделения геномной ДНК из растений лаванды разного происхождения.

Объектами нашего изучения являются растения лаванды узколистной сортов Синева и Степная а) выращенные в условиях закрытого грунта; б) микрорастения, выращенные в культуре *in vitro*; в) отобранные побеги из поля, сохраненные при -20°C в течение года. В качестве основы мы использовали метод выделения ДНК по J. Doyle [2] на основе детергента СТАВ/ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромид). Качество и количество ДНК определяли, используя электрофорез в 1,5 % агарозном геле и спектрофотометрический анализ.

Самый первый этап при выделении ДНК – это измельчение и разрушение клеточной стенки. Во многих методиках [3–5] для этого используют жидкий азот, но так как это не самый доступный компонент, то в качестве более дешевой и доступной альтернативы мы использовали растирание растительных образцов вместе с оксидом алюминия (Al_2O_3) 5:1 [6]. Мы не использовали меркаптоэтанол. В качестве лизирующего реагента мы использовали СТАВ буфер, так как он наиболее часто применяется и рекомендуется в других публикациях при работе с растениями, в том числе ароматическими [3, 4, 7], а также входит в состав коммерческих наборов для выделения растительной ДНК (NucleoSpin®). Далее мы следовали методике J. Doyle и добавляли хлороформ-изоамиловый спирт (24:1) для очистки от примесей. Однако одного раза было недостаточно, мы повторили эту процедуру дважды, чтобы полностью очистить образцы. Центрифугировали и отбирали верхнюю фазу и вновь, добавляли хлороформ, а не ацетат Na, как рекомендовано в методике J. Doyle. При использовании ацетата Na содержание ДНК было от 3–9 нг/мкл. Использование фенол-хлороформного этапа в выделении этим методом также негативно повлияло на количество ДНК (2 нг/мкл). Далее следовали методике.

Был проведен спектрофотометрический анализ образцов выделенной ДНК. Отношение поглощения при длинах волн 230 нм, 260 нм и 280 нм (260 нм/280 нм и 260 нм/230 нм) показывает чистоту препарата ДНК (таблица). Препарат считается чистым, если отношение значений приблизительно равно 1,8–2,0.

Таблица – Спектрофотометрические показатели эффективности выделенной ДНК растений лаванды

Происхождение	Образец	Концентрация ДНК, нг/мкл	Соотношение 260/280	Соотношение 260/230
а) Растения, выращенные в условиях закрытого грунта	Синева	32,3	1,7	1,7
	Степная	44,4	1,8	2,0
б) Микропобеги, культивируемые в условиях <i>in vitro</i>	Синева	33,6	1,8	1,7
	Степная	57,7	1,7	1,7
в) Отобранные побеги из поля, сохраненные при -20°C в течение года	Синева	16,2	1,6	1,6
	Степная	15,0	1,6	1,6

Во всех вариантах ДНК выделена с концентрацией более 10 нг/мкл, что считается достаточным для выполнения молекулярно-генетических исследований. А соотношение длин волн указывает на чистоту проб. Только образцы (в), сохраненные при -20°C имеют немного заниженные показатели, что свидетельствует о наличии

примесей белка, фенола из-за того, что это не свежие образцы, а значит часть ДНК деградировала.

Электрофоретическое разделение полученных образцов в 1,5 % агарозном геле, дало четкие полосы на уровне 20000 п.н., что свидетельствует о выделенной геномной ДНК.

Таким образом, оптимизированная методика J. Doyle подходит для выделения ДНК из растений лаванды разного происхождения (растения, выращенные в условиях закрытого грунта; микропобеги, культивируемые в условиях *in vitro*; отобранные побеги из поля, сохраненные при -20°C в течение года). Метод основан на СТАВ буфере, без использования жидкого азота, меркаптоэтанола и ацетата натрия, что упрощает и удешевляет его.

Литература

1. Паштецкий В. С., Невкрытая Н. В. Использование эфирных масел в медицине, ароматерапии, ветеринарии и растениеводстве (обзор) // Таврический вестник аграрной науки. 2018. № 1 (13). С. 18–40.
2. Doyle J. J. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. 1990. Vol. 12. P. 13–15.
3. Ghaffariyan S., Mohammadi S. A., Aharizad S. DNA isolation protocol for the medicinal plant lemon balm (*Melissa officinalis*, Lamiaceae) // Genet. Mol. Res. 2012. Vol. 11. P. 1049–1057.
4. 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. 2011. Vol. 23. No. 3. P. 349–357.
5. Булавин И. В., Браилко В. А., Гребенникова О. А., Андреев М. С., Кривенко О. В., Митрофанова И. В. Оценка эффективности коммерческих наборов для выделения ДНК из лавандина (*Lavandula × intermedia emeric ex loisel.*) // Плодоводство и ягодоводство России. 2019. Т. 59. С. 286–293.
6. Великов В. А. Молекулярная биология. Практическое руководство. Саратов: Издательство «Саратовский источник», 2013. С. 84.
7. Рябушкина Н. А., Омашева М. Е., Галиакпаров Н. Н. Специфика выделения ДНК из растительных объектов // Биотехнология. Теория и практика. 2012. № 2. С. 9–26.

UDC 635.71+ 577.113.083

Zagorskaya M. S.

Some aspects of the genomic DNA isolation from lavender plants of different origin.

Summary. The method of DNA extraction from lavender plants has some difficulties. Moreover, molecular genetic studies often use not only fresh materials but also microplants from an *in vitro* culture or frozen material. For all these types of samples, the DNA isolation technique was developed, which is based on the CTAB buffer, but without the use of liquid nitrogen, mercaptoethanol and sodium acetate, which, in turn, simplifies and reduces the cost of the method.

Keywords: lavender, genomic DNA, isolation.

DOI 10.33952/2542-0720-2020-5-9-10-91

УДК 633.63:581.143.6

Землянухина Ольга Александровна¹, Васильченко Елена Николаевна²

Сравнительное изучение физиолого-биохимических свойств гаплоидных линий *Beta vulgaris* L.

¹ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет имени императора Петра I»

²ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени

А. Л. Мазлумова»

e-mail: oz54@mail.ru

В настоящее время создание новых гибридов сахарной свеклы является одним из основных направлений селекции. В этом процессе незаменимы биотехнологические приемы создания гаплоидных, а затем и дигаплоидных линий растений с целью получения гомозиготного материала. Метод гаплоидии позволяет более точно определять действие конкретного гена, связанного с селективными признаками и с характером их проявления. Использование физиолого-биохимических приемов при