

СЕКЦИЯ 5. МЕТОДЫ БИОТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЕКЦИИ

УДК 581.143.6

Оценка засухоустойчивости некоторых генотипов древесно-кустарниковых видов при моделировании осмотического стресса in vitro

Ольга Олеговна Жолобова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук», г. Волгоград, Россия

Аннотация. Представлены результаты исследования устойчивости к осмотическому стрессу трех видов древесно-кустарниковых растений при моделировании водного дефицита в культуре in vitro. Определены общие закономерности адаптации и видоспецифичные реакции исследуемых образцов на осмотический стресс, которые позволили дать оценку толерантности вида к селективному фактору.

Ключевые слова: селекция in vitro, засухоустойчивость, осмотический стресс

Assessment of drought resistance of some genotypes of tree and shrub species when modeling osmotic stress in vitro

Olga Olegovna Zholobova

Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Scientific Center for Agroecology, Integrated Reclamation and Protective Afforestation of the Russian Academy of Sciences", Volgograd, Russia

Abstract. The results of a study of resistance to osmotic stress of three species of tree and shrub plants when modeling water deficiency in in vitro culture are presented. General patterns of adaptation and species-specific reactions of the studied samples to osmotic stress were determined, which made it possible to assess the tolerance of the species to the selective factor.

Key words: in vitro selection, drought resistance, osmotic stress

Введение

В последние годы технология культивирования изолированных тканей и органов растений in vitro стала возможным и экономически эффективным альтернативным инструментом для выведения стрессоустойчивых растений. Этот метод может работать в контролируемых условиях с ограничением пространства и времени культивирования и обладает потенциалом для отбора устойчивых к абиотическим стресс-факторам вариантов с использованием современного лабораторного оборудования.

In vitro культивирование растительных клеток, тканей или органов на питательной среде, содержащей селективные агенты, дает возможность отбирать и регенерировать растения с необходимыми характеристиками. Этот метод эффективно используется для индуцирования толерантности, способные адаптироваться и выдержать селективные условия образцы выживают в долгосрочной перспективе и подвергаются отбору. Клеточная селекция in vitro, позволяющая проводить направленный отбор генотипов с заданными признаками, основана на общих механизмах устойчивости для целых растений и изолированных клеток [5].

В последние годы работы по клеточной селекции in vitro на устойчивость к осмотическому стрессу и получению толерантных к засухе колоний клеток, тканевых структур и регенерантов все чаще применяют для ускорения реализации селекционных программ.

В литературных источниках упоминаются успешные работы in vitro по отбору в условиях абиотического стресса генотипов древесных растений. Например, успешно протестированы in vitro толерантные к засухе соматические клоны чая, полученные индукцией геммогенеза

из каллусной ткани [2]. Разработана клеточная технология создания устойчивых к осмотическому стрессовому фактору *in vitro* форм шалфея мускатного [4]. ВНИИ лесной генетики, селекции и биотехнологии разработали биотест-систему на основе каллусных культур *in vitro* для отбора засухоустойчивых форм сосны обыкновенной [1]. Большим генетическим разнообразием в их коллекции микроклонов представлены рода тополя и березы, которые протестированы на устойчивость к засолению *in vitro* [6]. При этом, в литературе практически отсутствуют две одинаковые схемы клеточной селекции *in vitro*. Схема отбора зависит от вида растения, признака, по которому получают устойчивые формы, особенностей каллусо- и морфогенеза, методики проведения экспериментов, степени изученности действия стрессового фактора и других субъективных причин [3]. Что делает особенно актуальным разработку принципов селективного отбора отдельных видов древесно-кустарниковых растений.

Целью работы являлось изучение влияния ПЭГ 6000 на регенеранты трех видов древесно-кустарниковых растений при моделировании водного дефицита в культуре *in vitro*, и оценка их адаптационных механизмов в условиях осмотического стресса.

Материалы и методы

Работа проводилась на базе молодежной лаборатории биотехнологий ФНЦ агроэкологии РАН в 2022-2023 году. В качестве модельных объектов были выбраны: 1) карликовый подвой для косточковых Krymsk® 5 (cv. VSL 2): *Prunus fruticosa* × *Prunus serrulata* var. *Lannesiana* (далее VSL 2) перспективный для использования в засушливых условиях; 2) Карагана карликовая (*Caragana pumila* L.) – кустарник 0,5 – 1 м, чаще всего встречается на песчаных участках и каменистых склонах; 3) Дрок испанский (*Spartium junceum* L.) – многолетний листопадный кустарник, растущий на крутых каменистых склонах для берегоукрепления.

Для моделирования условий почвенной засухи в культуре *in vitro* использовали растворимый в воде осмотик – полиэтиленгликоль 6000 (ПЭГ) в концентрациях: 20 г/л (ПЭГ 2), 40 г/л (ПЭГ 4) и 60 г/л (ПЭГ 6). Данный полимер с высокой молекулярной массой представляет собой инертный осмотический компонент, снижающий водный потенциал питательных растворов, не проникающий в растительные ткани и не оказывающий на них токсичное действие. Культивирование регенерантов проводили на питательных средах Мурасиге и Скуга без добавления гормонов, в качестве контроля использовали среду без добавления осмотика.

Для оценки влияния ПЭГ индуцированного стресса изучали следующие показатели: морфологические изменения, содержание пигментов (хлорофилл, каротиноиды), плотность и размер устьиц, размер устьичной щели. Каждый эксперимент был проведен в трехкратной повторности. Одна повторность включала в себя 20 образцов (по 1 образцу в пробирке). Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения STATISTICA StatSoft Inc. (USA).

Результаты

Работа по моделированию осмотического стресса в культуре *in vitro* позволила оценить адаптационные механизмы к условиям засухи изученных древесно-кустарниковых видов. На средах с осмотиком отмечалось угнетение ростовых процессов у всех исследуемых образцов, при этом определялась видоспецифичная реакция на селективный фактор.

Карликовый подвой для косточковых VSL 2: под влиянием осмотического стресса отмечается уменьшение количества листьев, скручивание листовых пластин, и их частичное засыхание. У эксплантов опытных групп ингибировано развитие корневой системы. В результате эксперимента все растения-регенеранты опытных и контрольных групп были жизнеспособны. Осмотический стресс отрицательно повлиял на массу листа и площадь листовой пластины. Плотность устьиц достоверно увеличивалась, а общее содержание хлорофилла и соотношение хлорофилла А к хлорофиллу В у листьев опытных групп в сравнении с контролем не имело статистически значимых различий, что позволяет сделать

вывод о нормальной работе фотосинтетического аппарата в условиях дефицита доступной воды. Проведенная оценка влияния моделируемой засухи на экспланты подвоя VSL-2 позволила определить механизмы адаптации к дефициту доступной воды, характерные для ксерофитного растения.

Caragana pugnata в данном эксперименте была представлена несколькими генотипами, несмотря на статистическую обработку и представление средних арифметических данных необходимо отметить реакцию отдельных генотипов. Только те генотипы которые сохранили способность к ризогенезу на питательных средах с ПЭГ-индуцированным стрессом были жизнеспособны. Отмечалось уменьшение площади устьиц и смыкание устьичной щели. Достоверно уменьшалось содержание хлорофилла и каротиноидов в листовых пластинах.

У *Spartium junceum* одним из адаптационных механизмов для сохранения воды в растениях являлось утолщение стебля и образование светлого воскового налета. При этом отсутствовал прирост побега и образование корней. Экспланты оказались восприимчивы к селективному фактору. Концентрация пигментов в листьях также существенно снижалась.

Если провести сравнительный анализ изменения содержания пигментов в листовых пластинах, влияющих на работу фотосинтетической системы трех изученных видов, то можно отметить определенные закономерности между этим показателем и толерантностью к моделируемой засухе *in vitro* (рисунок 1). Экспланты подвоя VSL-2, несмотря на ингибирование ростовых процессов, оказались все жизнеспособными и адаптированными к новым условиям. При этом достоверных различий в содержании хлорофилла и каротиноидов между контрольной группой и экспериментальными не зафиксировано, что говорит о стабильной работе фотосинтетического аппарата. Диапазон концентрации хлорофилла в листьях *C. pugnata* составлял 1,38-0,54 мкг/мг и снизился на 60 % по сравнению с контролем, а каротиноидов 0,31-0,12 мкг/мг. Адаптировались к условиям осмотического стресса только укорененные экспланты. У *Spartium junceum* хлорофилл варьировал в диапазоне 1,21-0,38 мкг/мг и снизился на 70 % по сравнению с контролем, каротиноиды в диапазоне 0,19-0,06. Активность фотосинтетической системы была снижена, жизнеспособные экспланты на высоких концентрациях ПЭГ 6 отсутствовали.

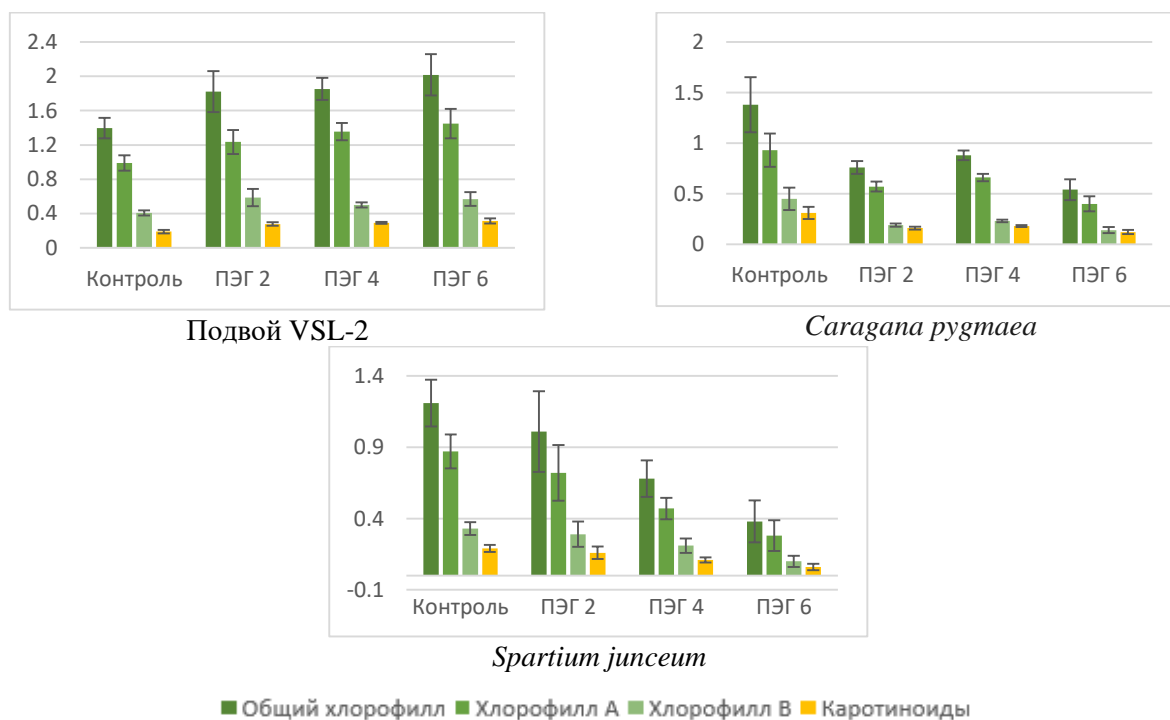


Рисунок 1. Концентрация пигментов в 1 мг листа (мкг/мг) при моделировании водного дефицита в культуре *in vitro*

Выводы

Моделирование условий засухи в культуре *in vitro* при использовании в качестве осмотика ПЭГ 6000 оказалось эффективным для оценки адапционных механизмов трех изученных древесно-кустарниковых видов. В условиях осмотического стресса отмечалось угнетение ростовых процессов, уменьшение листовых пластин при увеличении плотности устьичных клеток и постепенное смыкание устьичных щелей у всех исследуемых образцов. Информативным показателем для прогноза адаптации к осмотическому стрессу является концентрация пигментов в листовых пластинах, отсутствие изменений этого показателя говорит о стабильной работе фотосинтетического аппарата и успешной адаптации к моделируемой засухе *in vitro*. Среди изученных видов можно условно выделить засухоустойчивый подвой для косточковых VSL-2, частично адаптированный вид *C. rugosa*, в зависимости от генотипа и его способности к укоренению, и чувствительный к водному дефициту кустарник *Spartium junceum*.

Список литературы

1. Аминова Е.Ю. Оценка засухоустойчивости отдельных генотипов *Pinus sylvestris* L. на основе метода культуры ткани *in vitro* в моделируемых стрессовых условиях / Е.Ю. Аминова, Т.М. Табацкая, О.С. Машкина, В.Н. Попов // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. – 2017. – № 1. – С. 14–22.
2. Гвасалия М.В. Отбор на засухоустойчивость соматических клонов растений чая (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) в культуре *in vitro* / М.В. Гвасалия // Новые технологии. – 2020. – №3. – С.114–121.
3. Дубровная О.В. Селекция *in vitro* пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессовым факторам / О.В. Дубровная // Физиология растений и генетика. – 2017. – Т. 49, № 4. – С. 279–292.
4. Егорова Н.А. Использование эмбриокультуры для отбора устойчивых к осмотическому стрессу форм шалфея мускатного *in vitro* / Н.А. Егорова, И.В. Ставцева // Таврический вестник аграрной науки. – 2022. – № 1(29). – С. 41–56.
5. Калашникова Е.А. Клеточная инженерия растений / Е.А. Калашникова. – М.: Юрайт. – 2020. – 333 с.
6. Табацкая Т.М. Биотехнологическая оценка коллекционного материала березы и тополя в условиях солевого стресса в культуре *in vitro* / Т.М. Табацкая, Е.Ю. Аминова, О.С. Машкина // Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки. – 2020. – С. 190–191.

УДК 575.13:633.521

Создание *in vitro* устойчивых к болезням генотипов льна для экологизации сельскохозяйственного производства льнопродукции

Наталья Викторовна Пролётова, Людмила Платоновна Кудрявцева, Вероника Сергеевна Зотова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр лубяных культур», г. Тверь

Аннотация. В статье представлены схемы селекции льна *in vitro* на устойчивость к наиболее вредоносным болезням – фузариозному увяданию (*Fusarium oxysporum*) и антракнозу (*Colletotrichum lini*).