

## 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 актуальной 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.

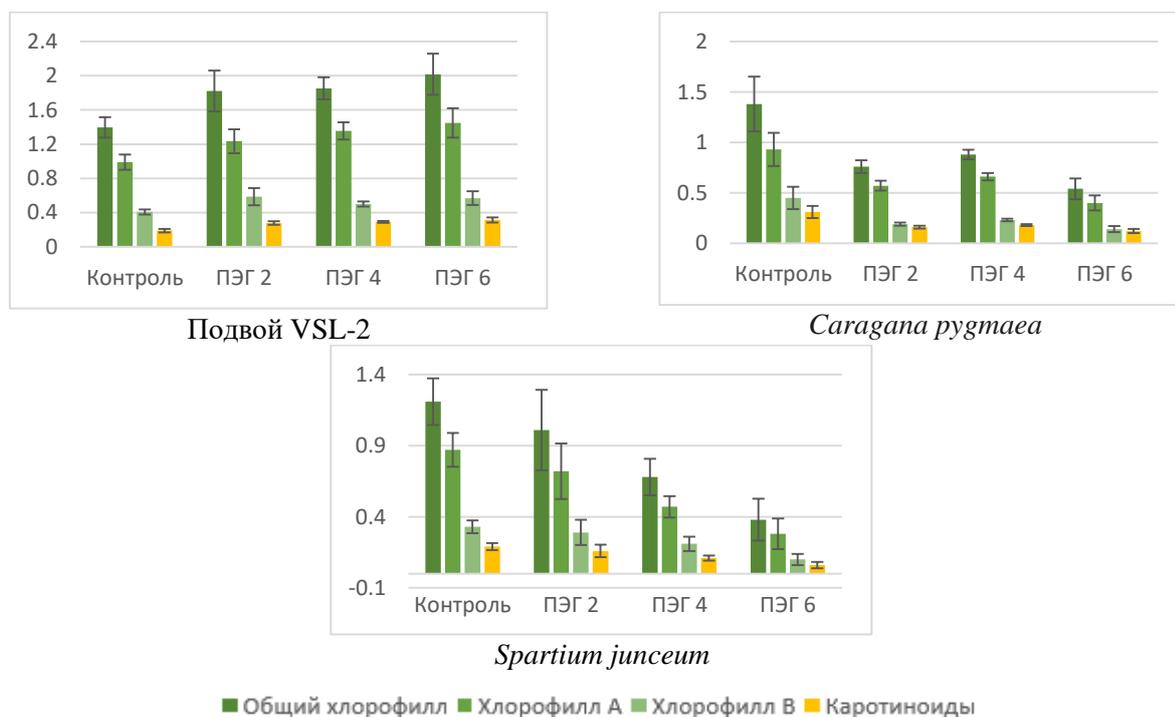
Карликовый подвой для косточковых VSL 2: под влиянием осмотического стресса отмечается уменьшение количества листьев, скручивание листовых пластин, и их частичное засыхание. У эксплантов опытных групп ингибировано развитие корневой системы. В результате эксперимента все растения-регенеранты опытных и 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*).