

УДК 57.085.2:633.81

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ ФОРМ ШАЛФЕЯ, УСТОЙЧИВЫХ К ОСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ *IN VITRO*

Егорова Н. А., Ставцева И. В.

Институт сельского хозяйства Крыма, Симферополь, yegorova.na@mail.ru

Изучены особенности влияния осмотического стресса на развитие изолированных зародышей шалфея (*Salvia sclarea* L.). Выявлена зависимость между засухоустойчивостью сорта и различными показателями развития зиготических зародышей *in vitro*. Определены сублетальные концентрации маннита и NaCl в питательной среде, при которых отобраны устойчивые к стрессу формы шалфея.

Ключевые слова: *Salvia sclarea*, культура зародышей, селекция *in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия в растениеводстве в связи с глобальными изменениями климата и неблагоприятной экологической обстановкой возникает много проблем, связанных с недостаточной устойчивостью растений к абиотическим стрессам. Среди различных факторов окружающей среды, негативно влияющих на развитие сельскохозяйственных культур, особенно важным для юга Украины является засуха. Поэтому одной из основных задач селекции является создание сортов, устойчивых к водному дефициту. Использование биотехнологических методов может повысить эффективность традиционных селекционных подходов при создании новых генотипов – доноров устойчивости к этому стрессовому фактору. Достаточно перспективным методом клеточной инженерии, позволяющим проводить в условиях *in vitro* направленный отбор генотипов с заранее заданными свойствами, является клеточная селекция [4, 7, 12]. При получении форм, устойчивых к засолению, засухе, болезням, гербицидам, солям тяжелых металлов, обычно используется метод прямой селекции, при котором в питательную среду для моделирования действия стресса вводится определенный селективный фактор. Для имитации действия засухи во многих работах были использованы неионные осмотики – маннит, полиэтиленгликоль, сорбит, а иногда ионный осмотик NaCl [4, 9, 12, 15, 22]. В последнем случае можно получить соле- и засухоустойчивые формы [12]. В клеточной селекции очень важную роль играет выбор объектов для отбора в условиях изолированной культуры. Чаще всего для этой цели используется каллусная ткань [2, 14, 15, 21] или клеточная суспензия [9, 11, 13]. Значительно реже в качестве объектов для отбора *in vitro* применяют изолированные органы. В частности, в селекционных схемах у ячменя, кокосовой пальмы, пшеницы на селективном фоне культивировали зиготические зародыши [3, 7, 12, 20]. У *Ipomoea batatas* отбор устойчивых к хлоридному засолению форм проводили с использованием стеблевых апексов [16]. Достаточно эффективным является последовательное применение различных

объектов, которое было продемонстрировано при получении форм люцерны, устойчивых к фузариозу [4].

Шалфей мускатный, занимающий одно из ведущих мест среди возделываемых в Украине эфиромасличных растений, выращивается для получения эфирного и экстрактового масел, склареола и других продуктов, которые широко используются в медицине, парфюмерно-косметической и пищевой промышленности [8]. Для создания конкурентоспособных сортов у шалфея, также как и у других сельскохозяйственных растений, необходимо дополнение традиционных методов селекции современными биотехнологическими подходами. Разработка таких методов основана на оптимизации режимов культивирования тканей и органов *in vitro*. Для различных видов рода *Salvia* в последние два десятилетия были проведены отдельные исследования, направленные на усовершенствование методов регенерации растений из каллусов [17, 23], разработку протоколов микроразмножения [18, 19], а также получения отдаленных гибридов в эмбриокультуре [10]. В наших работах ранее была показана возможность получения соматональных вариантов в каллусных культурах *Salvia sclarea* [6]. Однако исследований по клеточной селекции у шалфея, судя по имеющимся литературным сведениям, ранее не проводилось. Поэтому в задачи нашей работы входило изучение закономерностей действия NaCl и маннита на развитие изолированных зародышей с целью разработки биотехнологических приемов получения форм шалфея мускатного, устойчивых к осмотическому стрессу.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили сорта шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.), различающиеся по степени полевой засухоустойчивости, – С-785, Ай-Тодор, Тайган. Приготовление питательных сред, введение в культуру *in vitro* и культивирование проводили с применением традиционных методик, принятых в работах по культуре тканей [5]. В качестве эксплантов использовали зиготические зародыши, вычлененные из зрелых семян. При изучении влияния осмотического стресса зародыши культивировали на среде Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением NaCl (0,1–1,5 %) или маннита (1–12 %). Контролем служило выращивание зародышей на среде без осмотиков. Культивирование проводили в пробирках при температуре 26°C, 70%-ой влажности и освещенности 2-3 клк с фотопериодом 16 часов.

Зародыши выращивали на средах с осмотиками в течение 40–50 суток до развития проростков. Частоту прорастания изолированных зародышей определяли на 10-е сутки как отношение числа проросших зародышей к общему количеству эксплантированных. Частоту образования проростков определяли на 30-е сутки как процент нормально развитых проростков к общему количеству высаженных зародышей. На 40–45 сутки перед переводом в обычные условия выращивания измеряли длину основного побега и главного корня, количество листьев. Пробирочные растения адаптировали *in vivo* с использованием в качестве субстрата смеси земли и перлита, а затем выращивали в полевых условиях.

В каждом варианте опыта анализировали не менее 20 зародышей в 3-х кратной повторности. Все эксперименты были повторены не менее 2–3 раз, а полученные данные обработаны статистически с использованием программы Microsoft Office Excel 2003. На графиках представлены средние арифметические и доверительные интервалы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При выборе подходящего объекта для клеточной селекции шалфея в предварительных экспериментах мы проанализировали развитие на селективном фоне каллусных культур и зиготических зародышей. Установлено, что отобранные из каллусов клеточные линии характеризовались крайне низкой регенерационной способностью, поэтому в качестве объекта для отбора *in vitro* в данном исследовании были использованы изолированных из зрелых семян зародыши, которые культивировали на средах с NaCl или маннитом. Изучаемые сорта различались по степени полевой засухоустойчивости: в среднем за 2007-2009 гг. наименьший коэффициент засухоустойчивости имел сорт С-785 (27,1 %); у сортов Ай-Тодор и Тайган этот показатель был соответственно – 42,0 и 59,9 %. Установлено, что при культивировании зародышей на средах с NaCl происходило ингибирование развития проростков и снижение всех изученных морфометрических показателей по сравнению с контролем. Длина побега и корня, количество пар листьев значительно уменьшались с увеличением концентрации соли. Степень угнетения развития проростков *in vitro* зависела от сорта и была меньшей у засухоустойчивого сорта Тайган. Различия изученных генотипов по реакции на засоление среды наиболее четко проявились по основному показателю – частоте образования проростков, а также по степени развития корня (рис. 1, 2).

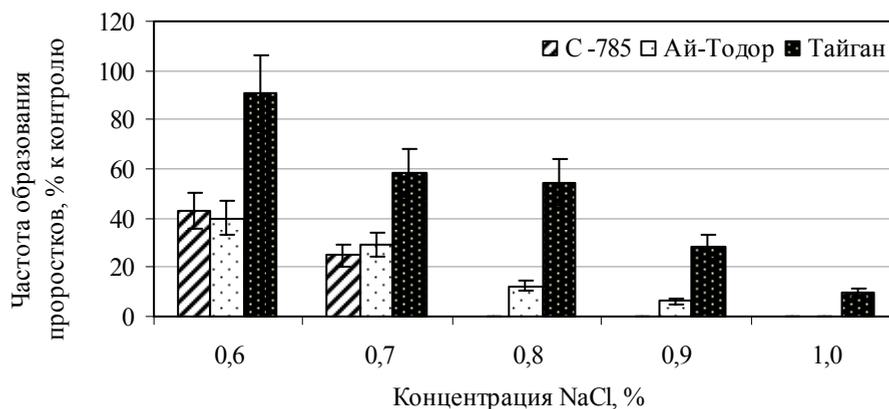


Рис. 1. Влияние концентрации NaCl и сорта на частоту образования проростков в культуре зародышей шалфея, % к контролю

На средах с селективным фактором длина корня у засухоустойчивых сортов была в 4–5 раз больше, чем у сорта С-785. Сублетальные концентрации соли, при

которых можно было получить нормально развитые проростки, зависели от устойчивости генотипа – у более устойчивого сорта Тайган сублетальная концентрация NaCl была выше (1,0 %), чем у менее устойчивых сортов Ай-Тодор (0,9 %) и С-785 (0,7 %).

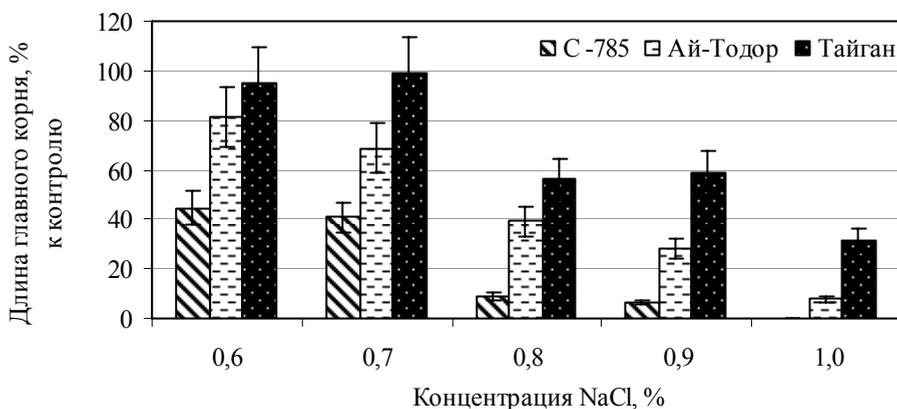


Рис. 2. Влияние концентрации NaCl и сорта на длину главного корня проростка в культуре зародышей шалфея, % к контролю

При выращивании зародышей трех контрастных по устойчивости сортов на питательных средах с введением маннита (1–10 %) также было выявлено значительное снижение всех показателей развития зародышей при повышении дозы селективного фактора. В таблице 1 представлено влияние этого осмотика на основной параметр, по которому определяли сублетальную концентрацию, – частоту образования проростков. Судя по этим данным, а также по морфометрическому анализу полученных проростков у изученных сортов эти концентрации различались. У сорта с меньшей засухоустойчивостью С-785 сублетальная доза, при которой можно было получить нормально развитые проростки, составила 4–5 %, а у более устойчивых ‘Ай-Тодора’ – 6–7 % и у ‘Тайгана’ – 7–8 %. В вариантах с высокими концентрациями маннита (5–8 %) различия генотипов проявились особенно четко: чем выше был коэффициент засухоустойчивости сорта, тем больше частота прорастания зародышей и получения проростков. Коэффициенты корреляции между изучаемыми показателями развития зародышей и коэффициентами засухоустойчивости сортов в этих вариантах составили от 0,71 до 0,98. Среди различных изученных показателей следует обратить внимание на лучшее развитие корневой системы на среде с осмотиком у проростков более засухоустойчивого сорта Тайган, по сравнению с менее устойчивым сортом С-785 (рис. 3). Выявленная нами зависимость между устойчивостью разных объектов в условиях *in vitro* и *in situ*, по-видимому, является основанием для дальнейшей разработки методики косвенной оценки селекционных образцов шалфея с использованием культуры изолированных органов. Аналогичный экспериментальный подход, в частности, предлагалось применять для

непрямой оценки генотипов на толерантность к стрессу у пшеницы [3] и гороха [22].

Таблица 1

Влияние различных концентраций маннита в питательной среде и сорта на частоту образования проростков в культуре изолированных зародышей шалфея, %

Концентрация маннита, %	Сорт		
	С-785	Ай-Тодор	Тайган
0	81,0±6,7	92,5±8,5	98,0±8,8
1	70,4±6,7	89,4±8,2	85,7±8,0
2	50,0±5,1	70,0±7,1	77,4±7,3
3	30,0±3,2	42,8±4,3	52,8±4,9
4	24,3±2,2	20,6±1,8	35,0±3,1
5	5,9±0,5	20,0±1,9	24,0±2,1
6	0,5±0,1	12,5±1,1	17,0±1,5
7	0	4,5±0,5	10,0±0,8
8	0	0	7,1±0,5
9	0	0	0

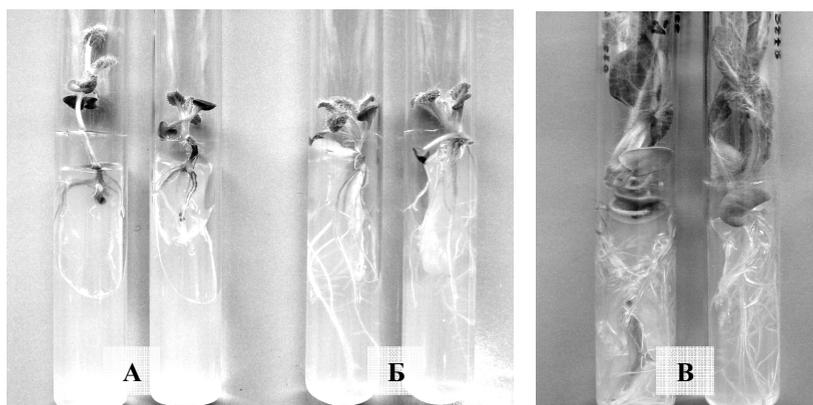


Рис. 3. Развитие изолированных зародышей шалфея мускатного на питательной среде с добавлением 4 % маннита у сортов С-785 (А) и Тайган (Б) и в контроле у сорта С-785 (В)

С целью проведения косвенной оценки устойчивости несколько отобранных в эмбриокультуре на фоне осмотического стресса образцов были выращены в полевых условиях до получения семян и затем повторно подвергнуты осмотическому стрессу при культивировании зародышей на питательной среде с различными концентрациями маннита. Анализ развития проростков у отобранных в эмбриокультуре образцов и исходных сортов С-785, Ай-Тодор и Тайган показал, что у отобранных образцов при всех изученных концентрациях осмотика (4–8 %)

частота прорастания и образования проростков была гораздо выше по сравнению с исходными сортами.

Семенное потомство нескольких образцов, полученных после отбора *in vitro*, в дальнейшем было изучено в полевых условиях по основным хозяйственно ценным признакам, а также по степени засухоустойчивости. При этом было установлено, что коэффициенты засухоустойчивости семенного потомства у всех изученных образцов, отобранных в эмбриокультуре при осмотическом стрессе, были на 17–19 % выше, чем у исходных сортов. В отдельные годы превышение этого показателя у № 524 и № 226-08 по сравнению с исходными сортами достигало 52–110 %. По массе соцветий достоверное превышение исходного сорта было отмечено у образца № АТ-09. По основному признаку – сбору эфирного масла достоверно превысили исходные формы образцы № 524 и № 226-08, у которых сбор эфирного масла с растения был на 34–40 % выше по сравнению с сортами С-785 и Тайган.

Литературные сведения по клеточной селекции на устойчивость к осмотическому стрессу достаточно противоречивы. Это касается, прежде всего, селективных агентов, в качестве которых в питательные среды вводят маннит, сорбит, полиэтиленгликоль, NaCl [2, 4, 7, 15, 22], абсцизовую кислоту, аналоги пролина [1, 12]. Разнообразны и используемые объекты отбора *in vitro* – каллусные и суспензионные культуры, зародыши, меристемы [11, 13-15, 16, 20, 21]. В нашей работе при изучении действия осмотического стресса на изолированные культуры шалфея была определена селективная система, включающая использование эмбриокультуры, а в качестве селективных факторов маннита и NaCl, которая позволяет проводить скрининг устойчивых форм. Анализ некоторых образцов, полученных в эмбриокультуре на селективном фоне, показал их повышенную устойчивость к осмотическому стрессу по сравнению с исходными сортами, как на уровне изолированных зародышей, так и на уровне целых растений, что свидетельствует об эффективности разработанной методики. Полевая оценка подтвердила перспективность проведения отбора *in vitro* и позволила выделить ценные образцы, отличающиеся повышенными коэффициентами засухоустойчивости и показателями основных хозяйственных признаков, что явилось основанием для их дальнейшей передачи в питомник предварительного сортоиспытания.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований выявлены особенности действия осмотического стресса при введении в питательную среду NaCl и маннита на развитие изолированных зародышей трех сортов шалфея мускатного (С-785, Ай-Тодор, Тайган). Установлено, что чем выше была засухоустойчивость сорта в полевых условиях, тем выше были основные показатели развития эмбриокультур на средах с осмотиками (частота прорастания зародышей и образования проростков, длина побега, главного корня и количество листьев). Для каждого генотипа были выявлены сублетальные концентрации маннита и NaCl, при которых отобраны устойчивые к стрессу формы шалфея. Несколько отобранных в эмбриокультуре образцов (№№ АТ-09, 524, 226-08) показали повышенную устойчивость по

сравнению с исходными сортами не только в условиях *in vitro*, но и по коэффициенту засухоустойчивости растений и основным хозяйственно ценным признакам.

Список литературы

1. Дридзе И. Л. Использование аналога пролина для отбора стрессоустойчивых вариантов в культуре ткани сои и табака: автореферат дисс. на соискание уч. степени канд. биол. наук / И. Л. Дридзе; ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии. – Москва, 1990. – 24 с.
2. Дубровна О. В. Мінливість геному буряків (*Beta vulgaris* L.) за інбридингу та в культурі *in vitro*: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. біол. наук / О. В. Дубровна; Інститут фізіології рослин і генетики НАНУ. – Київ, 2005. – 41 с.
3. Игнатова С. А. Методические основы отбора форм пшеницы мягкой, устойчивых к *Fusarium graminearum* Shwabe, в условиях *in vitro* / С. А. Игнатова, О. В. Бабаянц // Наукові праці ПФ «КАТУ» НАУ. – 2008. – Вип. 107. – С. 136–141.
4. Игнатова С. А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro* / С. А. Игнатова. – Одеса: Астропринт, 2011. – 224 с.
5. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – К.: Наукова думка. 1980. – 488 с.
6. Культура каллусных тканей и соматическая изменчивость у эфиромасличных растений / [Н. А. Егорова, И. В. Ставцева, А. Г. Инюткина и др.] // Сборник научных трудов Никитского ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 63–67.
7. Мельничук М. Д. Біотехнологія рослин: підручник / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, В. А. Кунах. – К.: Поліграф Консалтинг, 2003. – 520 с.
8. Назаренко Л. Г. Эфиромасличные культуры юга Украины / Л. Г. Назаренко, А. В. Афонин. – Симферополь: Таврия, 2008. – 144 с.
9. Ошмарина В. И., Получение резистентных к NaCl и этионину клеточных линий *Nicotiana sylvestris* и их характеристика / В. И. Ошмарина, З. Б. Шамина, Р. Г. Бутенко // Генетика. – 1983. – Т. 19, № 5. – С. 822–827.
10. Русина Л. В. Использование метода культуры изолированных зародышей для получения межвидовых гибридов шалфея / Л. В. Русина, А. М. Бугара, Л. А. Бугаенко // Физиология и биохимия культ. растений. – 1997. – Т. 29, № 2. – С. 121–128.
11. Сергеева Л. Е. Солеустойчивость Ba^{2+} -резистентных клеточных линий растений / Л. Е. Сергеева, С. И. Михальская // Физиология и биохимия культ. растений. – 2006. – Т. 38, № 6. – С. 491–497.
12. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция / В. А. Сидоров. – К.: Наукова думка. – 1990. – 280 с.
13. Тищенко Е. Н. RAPD-анализ вольфрамустойчивой клеточной линии сои с комплексной толерантностью к осмотическим веществам / [Е. Н. Тищенко, Л. Е. Сергеева, С. И. Михальская, О. А. Данильченко] // Физиология и биохимия культ. растений. – 2008. – Т. 40, № 64. – С. 329–336.
14. Тугай Ю. А. Реакція калусних культур буряків (*Beta vulgaris* L.) на сольовий стрес / Ю. А. Тугай, Т. В. Чугункова, Л. Ф. Розумна // Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наук. праць. – Київ, ЛОГОС, 2006. – Т. 3. – С. 515–518.
15. Тучин С. В. Оценка различных селективных схем для отбора на засухоустойчивость в культуре изолированных тканей пшеницы // Биологические основы селекции / [С. В. Тучин, Л. Н. Архипова, Н. Н. Носова, Т. Н. Сахаджи]. – Саратов, 1991. – С. 41–48.
16. Dasgupta M. Evaluation of orange-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes for salt tolerance through shoot apex culture under *in vitro* NaCl mediated salinity stress conditions / [M. Dasgupta, M. R. Sahoo, P. C. Kole, A. Mukherjee] // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2008. – Vol. 94, № 2. – P. 61–170.
17. Iola-Boldura O. M. Regeneration, micropropagation, callus cultures and somatic embryogenesis of common sage (*Salvia officinalis* L.) / [O. M. Iola-Boldura, F. Radu, S. Popescu, A. Borozan] // Bulletin UASVM Horticulture. – 2010. – Vol. 67, № 1. – P. 308–313.

18. Grzegorzczak I. Micropropagation of *Salvia officinalis* L. by shoot tips / I. Grzegorzczak, H. Wysokinska // Biotechnologia. – 2004. – № 2. – P. 212–218.
19. Huang L. D. *Salvia chamelaeagnea* can be micropropagated and its callus induced to produce rosmarinic acid / L. D. Huang, J. Van Staden // S. Afr. J. Bot. – 2002. – Vol. 68. – P. 177–180.
20. Karunatne Seetha An *in vitro* assay for drought tolerant coconut ger plasmid / Karunatne Seetha, Santha Sunil, Kovoora A. // Euphytica. – 1991. – Vol. 53, № 1. – P. 25–30.
21. Matheka J. M. *In vitro* selection and characterization of drought tolerant somaclones of tropical maize (*Zea mays* L.) / [J. M. Matheka, E. Magiri, A. O. Rasha, J. Machuka] // Biotechnology. – 2008. – Vol. 7, № 4. – P. 641–650.
22. Tabori K. M. Effect of osmotic stress on *in vitro* shoot culture of peas (*Pisum sativum*) / [K. M. Tabori, J. Dobranszki, J. Iszaly-Toth, I. Hudak] // Acta. Hort. (ISHS). – 2009. – № 812. – P. 231–236.
23. Tawfik A. A. Regeneration of salvia (*Salvia officinalis* L.) via induction of meristematic callus / A. A. Tawfik, M. F. Mohamed // In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant. – 2007. – Vol. 43, № 1. – P. 21–27.

Егорова Н. О., Ставцева І. В. Біотехнологічні прийоми одержання форм шавлії, стійких до осмотичного стресу *in vitro* // Екосистеми, їх оптимізація та охорона. Сімферополь: ТНУ, 2013. Вип. 8. С. 93–100.

Вивчено особливості впливу осмотичного стресу на розвиток ізольованих зародків шавлії (*Salvia sclarea* L.). Виявлена залежність між посухостійкістю сорту і різними показниками розвитку зиготичних зародків *in vitro*. Визначено сублетальні концентрації маніту і NaCl в поживному середовищі, при яких відібрані стійкі до стресу форми шавлії.

Ключові слова: *Salvia sclarea*, культура зародків, селекція *in vitro*.

Yegorova N. A., Stavtzeva I. V. Biotechnological methods of obtaining sage forms resistant to osmotic stress *in vitro* // Optimization and Protection of Ecosystems. Simferopol: TNU, 2013. Iss. 8. P. 93–100.

The peculiarities of osmotic stress effect on the development of embryoculture of sage (*Salvia sclarea* L.) were investigated. The dependence between cultivars drought tolerance and different characteristic of zygotic embryo development *in vitro* have been detected. The sublethal concentrations of mannite and NaCl in the nutrient medium have been determined, and resistant to stress forms of sage have been selected.

Key words: *Salvia sclarea*, embryoculture, selection *in vitro*.

Поступила в редакцію 04.01.2013 з.