

УДК 633.81:57.085.2

DOI: 10.5281/zenodo.7898454

EDN BFCWPL

Егорова Н. А., Ставцева И. В.

**ВЛИЯНИЕ ОСМОТИЧЕСКОГО И НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО
СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ НА РАЗВИТИЕ *SALVIA SCLAREA L.*
В ЭМБРИОКУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»

Реферат. Создание новых генотипов, резистентных к абиотическим стрессовым факторам, является важнейшей задачей селекции эфиромасличных растений. Цель работы – изучить влияние осмотического и низкотемпературного стрессов на развитие зиготических зародышей шалфея мускатного для разработки селективной системы создания устойчивых к этим стрессовым факторам форм *in vitro*. В исследованиях использовали три сорта и 10 образцов *Salvia sclarea L.*, различающихся по засухоустойчивости. Одновременно испытывали действие осмотического и низкотемпературного стрессов *in vitro*. При осмотическом стрессе зародыши культивировали на среде Мурасиге и Скуга, содержащей 3–5 % сорбита. Моделирование холодового стресса проводили в три этапа с разной продолжительностью: закаливание при 0...4 °С; промораживание при снижении температуры от 0 до –12...–14 °С; оттаивание при 2...4 °С. После низкотемпературного стресса зародыши пересаживали на среду с той же концентрацией сорбита и культивировали при 26 °С и освещенности 2–3 клк. Установлено, что по мере повышения концентрации сорбита до 5 % и снижения температуры до –8...–14 °С все анализируемые параметры (частота прорастания зародышей, частота развившихся проростков, длина побега и корня) снижались по сравнению с контролем. У генотипов с высокими коэффициентами засухоустойчивости угнетение развития проростков при действии двух стрессоров было меньше, чем у неустойчивых генотипов. Максимальные коэффициенты корреляции (от 0,696 до 0,870) установлены между полевой засухоустойчивостью генотипов и частотой прорастания зародышей или частотой развившихся проростков. Разработана селективная система, которую можно использовать для отбора или косвенной оценки *in vitro* форм *S. sclarea* с комплексной устойчивостью к осмотику и низкой температуре.

Ключевые слова: *Salvia sclarea L.*, низкотемпературный стресс, осмотический стресс, селекция *in vitro*, эмбриокультура *in vitro*.

Для цитирования: Егорова Н. А., Ставцева И. В. Влияние осмотического и низкотемпературного стрессовых факторов на развитие *Salvia sclarea L.* в эмбриокультуре *in vitro* // Таврический вестник аграрной науки. 2023. № 1(33). С. 34–50. DOI: 10.5281/zenodo.7898454. EDN: BFCWPL.

For citation: Yegorova N. A., Stavtzeva I. V. Influence of osmotic and low-temperature stress factors on the development of *Salvia sclarea L.* in embryoculture *in vitro* // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2023. No. 1(33). P. 34–50. DOI: 10.5281/zenodo.7898454. EDN: BFCWPL.

Введение

Глобальное изменение климата и усиливающееся негативное антропогенное воздействие на природу в последние десятилетия способствуют тому, что в растениеводстве одним из важных приоритетов становится создание

устойчивых к действию различных стрессовых факторов систем. Одними из широко распространенных абиотических стрессоров в нашей стране являются экстремальные температуры, засуха, засоление почв и другие. Поэтому создание новых генотипов, резистентных к данным неблагоприятным факторам окружающей среды, является важнейшей задачей селекции сельскохозяйственных культур, в том числе и эфиромасличных растений. Устойчивость к основным абиотическим стрессам и болезням – одно из основных требований, которые предъявляют к современным сортам растений. Получение исходного селекционного материала, отвечающего таким критериям, возможно не только с использованием традиционных методов на основе мутаций и рекомбинаций, но и с применением приемов клеточной инженерии [1, 2]. Такой подход с применением изолированных органов и тканей растений в контролируемых условиях *in vitro* с меньшими затратами времени и ресурсов имеет высокий потенциал не только для создания доноров ценных признаков у экономически важных культур, но и для понимания физиологических и биохимических механизмов формирования устойчивости к стрессам [3].

Клеточная селекция *in vitro* является одним из наиболее перспективных биотехнологических подходов, который позволяет осуществлять отбор генотипов с заранее заданными конкретными признаками, основываясь на сходных механизмах устойчивости на уровне растения и изолированных клеток [1, 3–5]. И хотя этот метод имеет ряд ограничений и требует разработки сложных селективных систем, тем не менее, он достаточно эффективен при создании ценных селекционных форм растений [2, 6, 7]. При выделении устойчивых клеточных линий или соматклонов обычно применяют прямую селекцию, отличающуюся от других экспериментальных приемов тем, что на фоне моделируемого стрессового фактора отбирают единичные жизнеспособные устойчивые к нему клетки или органы.

Достаточно часто в литературе встречаются исследования, направленные на создание засухоустойчивых генотипов, что очень актуально для большинства выращиваемых на юге России сельскохозяйственных культур. В этом случае для имитации действия засухи в состав питательной среды вводят неионные (маннит, сорбит, сахароза, полиэтиленгликоль (ПЭГ)) [8–10] или ионные (NaCl, KCl) [4, 7, 11–13] осмотики. При этом концентрация и тип осмотически активного вещества в значительной степени зависят от вида растений, а также от биотехнологического объекта. Так, при отборе форм, устойчивых к низкой влагообеспеченности, для каллусных культур у лаванды был использован маннит в концентрации 8–10 % [14], а у пшеницы – 8 % ПЭГ [6].

Экспериментальных работ по получению форм, устойчивых к низким температурам в условиях *in vitro*, очень мало. При этом в качестве селективного фактора применяют как положительные (от 4 до 18 °С), так и отрицательные (до –12...–20 °С) температуры [4, 15]. Во втором случае холодовая обработка обычно проводится в несколько этапов, включая закаливание, промораживание и оттаивание культур [14].

При создании селективной системы *in vitro* важно подобрать не только оптимальные режимы стрессового фактора, но и биотехнологический объект. Часто при отборе форм, резистентных к абиотическим факторам и болезням, используют каллусные или суспензионные культуры, в частности, у пшеницы, ячменя, табака, люцерны, картофеля, сахарной свеклы и др. [4, 6, 8, 11]. Необходимо учитывать, что у отобранных устойчивых каллусных линий нередко наблюдается снижение или даже потеря регенерационного потенциала, на что указывают многие

исследователи [2, 4, 7, 10]. Эффективным приемом сохранения регенерационной способности после снятия стрессовой нагрузки является культивирование морфогенных каллусов, что было показано, в частности, для герани и лаванды [14]. В ряде исследований в качестве объектов для отбора *in vitro* успешно использовали зиготические зародыши [9, 15, 16], микрочеренки или микрорастения [12, 13, 17, 18]. Весьма эффективным для некоторых видов растений оказалось последовательное применение различных биотехнологических объектов, например, при отборе форм ячменя, устойчивых к засолению [7], или кориандра – к низкотемпературному стрессу [14].

Одним из перспективных направлений в клеточной селекции является получение в селективных системах *in vitro* каллусных линий или растений, обладающих устойчивостью к различным стрессам [10, 19]. Так, у табака в процессе селекции на устойчивость к засолению и засухе были отобраны формы, обладающие резистентностью не только к этим факторам, но и к черной корневой гнили, а у кукурузы при отборе на фоне осмотика получены образцы, устойчивые к засухе, низким температурам и засолению [14].

Среди эфиромасличных растений семейства *Lamiaceae* одним из наиболее ценных и распространенных в южных регионах России является шалфей мускатный (*Salvia sclarea* L.) [20]. Из его растительного сырья получают эфирное масло (в состав которого входит до 75 % линалилацетата), конкрет, воски, лечебный концентрат «Салмус» и другие биологически активные соединения [21]. В соцветиях данного вида шалфея содержится склареол, который применяют при получении заменителей натуральной амбры, амбриала и амброксиды, необходимых компонентов высококачественных парфюмерных изделий. Все это обуславливает активное применение продуктов переработки шалфея в парфюмерно-косметической, пищевой и табачной промышленности, а также в медицине в качестве противовоспалительного, антибактериального, иммуномодулирующего и обезболивающего средства [22].

Для повышения эффективности селекционного процесса в последние годы в ФГБУН «НИИСХ Крыма» разрабатываются методы клеточной инженерии, в частности, индукции соматической вариативности в каллусной культуре *in vitro*, на основе которой был создан новый сорт шалфея мускатного [14, 23]. Судя по данным литературных источников, биотехнологические исследования у видов рода *Salvia* в основном посвящены разработке методик клонального микроразмножения с использованием культуры изолированных меристем или сегментов стебля [24–27]. В некоторых публикациях освещены вопросы индукции каллусогенеза из разных типов эксплантов и оптимизации условий регенерации растений у *S. sclarea*, *S. officinalis*, *S. hispanica*, *S. nemorosa* [14, 28–30]. Что касается исследований по клеточной селекции на устойчивость к абиотическим стрессам, что весьма перспективно для шалфея, то сведения о них крайне ограничены. Имеются данные о влиянии сорбита и ПЭГ в составе питательной среды на развитие микрорастений *S. stenophylla in vitro* [31], а также о морфогенезе трансгенных растений *S. miltiorrhiza* на фоне NaCl и ПЭГ [32]. В наших предыдущих работах были рассмотрены вопросы оптимизации приемов селекции *S. sclarea* на устойчивость к осмотическому стрессу с использованием культуры изолированных зародышей и была показана целесообразность дальнейшего изучения действия нескольких стрессовых факторов на развитие культур *in vitro* [14, 33].

Цель исследований – изучить особенности влияния осмотического и низкотемпературного стрессов на развитие зиготических зародышей шалфея

мускатного для разработки селективной системы создания устойчивых к этим стрессовым факторам форм *in vitro*.

Материалы и методы исследований

В исследованиях использовали сорта шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.) С-785, Ай-Тодор и Тайган, а также ранее полученные из каллусов образцы растений-регенерантов (R₃-2-1; R₃-2; R₃-3-1; R₃-4-9; R₃-5; R₃-5-6; R₃-2-7; R₃-7-8; R₃-7-9; R₃-10), различающиеся по полевой засухоустойчивости (таблица 1). Коэффициент засухоустойчивости растений (К.З.) у сортов и образцов в полевых условиях рассчитывали по показателям водного обмена [34].

Экспериментальные работы проведены на базе лаборатории биотехнологии ФГБУН «НИИСХ Крыма» в 2019–2020 гг. В качестве эксплантов при введении в асептическую культуру использовали зиготические зародыши, выделенные из зрелых семян. При проведении экспериментов применяли общепринятые методы культуры органов и тканей растений [35], а также методы, разработанные нами ранее для культивирования шалфея *in vitro* [14, 36].

Таблица 1 – Коэффициент полевой засухоустойчивости (%) у сортов и образцов шалфея мускатного (2017–2019 гг.)

Сорт, образец	Коэффициент засухоустойчивости, %	Сорт, образец	Коэффициент засухоустойчивости, %
С-785	27,1 ± 3,0	R ₃ -5	20,3 ± 2,7
Ай-Тодор	41,9 ± 3,5	R ₃ -5-6	64,3 ± 6,4
Тайган	59,9 ± 5,6	R ₃ -2-7	57,4 ± 6,0
R ₃ -2-1	39,6 ± 3,5	R ₃ -7-8	37,7 ± 3,5
R ₃ -2	17,8 ± 2,2	R ₃ -7-9	32,8 ± 3,8
R ₃ -3-1	35,6 ± 3,2	R ₃ -10	14,5 ± 2,2
R ₃ -4-9	62,5 ± 5,9		

Для стерилизации семена при введении в изолированную культуру выдерживали 1 мин в 50,0 % растворе препарата «Брадофен» 10Н (ФЛОРИН АО, Венгрия), а затем трижды промывали автоклавированной дистиллированной водой. Асептические работы проводили в ламинарном боксе БАВнп-01-«Ламинар-С»-1,2 (Россия). Зиготические зародыши выделяли под стереоскопическим микроскопом МБС-10 (ЛОМО, Россия), а затем помещали на питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) [37].

В представляемых экспериментах одновременно испытывали действие осмотического и низкотемпературного стресса *in vitro*. При осмотическом стрессе зародыши культивировали на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС), содержащей 3,0 (3с), 4,0 (4с) и 5,0 % (5с) сорбита (АО «Вектон», Россия). Моделирование холодного стресса в первом эксперименте проводили в три этапа: 1) закаливание при температуре от 0 до 4 °С (8 сут.); 2) промораживание – при постепенном снижении температуры от 0 до –12...–14 °С с использованием двух вариантов (I вариант: от 0 до –8...–10 °С (4 сут.), II вариант: от 0 до –12...–14 °С (7 сут.); 3) оттаивание при 2...4 °С (4 сут.). Во втором эксперименте экспозиции действия низкой температуры были сокращены. Закаливание проводили при 0–4 °С (3 сут.); промораживание – II варианта при постепенном снижении температуры от 0 до –8...–10 °С (3 сут.) и от 0 до –12...–14 °С (5 сут.); оттаивание – при 0–4 °С (2 сут.). После холодного стресса зародыши пересаживали на свежую питательную среду МС с такой же концентрацией сорбита и переносили в культуральную комнату.

В контрольном варианте зародыши культивировали на безгормональной среде МС без сорбита в условиях культуральной комнаты при 26 ± 2 °С, относительной влажности воздуха 70 %, освещенности – 2–3 клк с 16-часовым фотопериодом. Во втором эксперименте использовали дополнительный контроль, в котором зародыши культивировали на средах с сорбитом, но без холодной обработки. Культивирование зародышей и развивающихся микрорастений проводили в течение 35–40 сут. в пробирках с 10 мл агаризованной питательной среды.

На 10-е сутки культивирования определяли частоту прорастания зародышей (ЧПЗ, %), а на 30-е сутки – частоту развившихся проростков (ЧРП, %), а также измеряли длину побега и корня. ЧРП определяли как отношение числа полноценных проростков к общему числу культивируемых зародышей. Во всех опытах анализируемые параметры рассчитывали также и в % к контролю.

Статистическую обработку данных осуществляли согласно общепринятым методам математической статистики при помощи стандартного пакета документов Microsoft Office Excel (2010). Достоверность отличий оценивали по критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$. В таблицах и на графиках представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Результаты и их обсуждение

С целью разработки методики селекции *in vitro* исследовано комплексное влияние абиотических стрессов (низкотемпературного и осмотического) на развитие изолированных зиготических зародышей шалфея мускатного. Ранее в наших исследованиях было показано, что культивирование зародышей сортов и образцов шалфея, различающихся по полевой засухоустойчивости, на питательных средах с добавлением осмотически активных веществ (маннит, сорбит, сахароза, NaCl) позволяло дифференцировать генотипы по устойчивости к осмотическому стрессу [33]. При этом были определены эффективные осмотики и их сублетальные дозы, поэтому в данном исследовании использовали сорбит в концентрации 3–5 %. В предварительных опытах по низкотемпературной обработке у *S. sclarea* показана целесообразность использования в качестве эксплантов зрелых зиготических зародышей, а также возможность их промораживания при снижении температуры до $-12...-14$ °С. Поэтому в представляемом эксперименте использовали два варианта низкотемпературного стресса (с разными температурными режимами и экспозицией) и одновременно осмотический стресс, при котором зародыши культивировали на среде МС, дополненной сорбитом. В общей сложности холодная обработка в данном эксперименте длилась 19 суток, включая закаливание, промораживание и оттаивание культур (варианты описаны в предыдущем разделе). В контроле зародыши постоянно культивировали при 26 °С на среде МС без сорбита. После 10 суток культивирования определяли частоту прорастания зародышей (таблица 2), а через месяц – частоту развившихся проростков, их высоту и длину корня (таблицы 3–5).

В исследовании использовали сорта С-785, Ай-Тодор, Тайган и 10 образцов, различающихся по полевой засухоустойчивости. Коэффициенты засухоустойчивости у изучаемых генотипов варьировали от 14,5 до 64,3 % (см. таблицу 1). Как следует из полученных данных, у большинства испытанных генотипов культивируемые *in vitro* зиготические зародыши выдерживали одновременное действие двух стрессовых факторов. Вместе с тем, при сравнении с контролем наблюдали снижение анализируемых параметров по мере

повышения концентрации сорбита в питательной среде и снижения температуры холодной обработки до $-8...-14$ °С.

Таблица 2 – Влияние осмотического, низкотемпературного стрессов и генотипа на частоту прорастания зародышей шалфея мускатного *in vitro*, %

Сорт, образец	Контроль	I вариант промораживания			II вариант промораживания		
		3с	4с	5с	3с	4с	5с
С-785	82,4 ± 7,5	13,3 ± 0,9	11,7 ± 0,9	0,0	7,1 ± 0,5	0,0	0,0
Ай-Тодор	70,0 ± 8,3	36,8 ± 3,4	27,8 ± 2,6	10,5 ± 1,5	15,8 ± 1,6	6,7 ± 0,9	0
Тайган	84,2 ± 8,7	50,0 ± 3,7	52,4 ± 4,7	22,2 ± 2,6	26,3 ± 2,8	13,3 ± 1,6	10,5 ± 0,8
R ₃ -2-1	76,0 ± 6,8	42,1 ± 4,8	38,8 ± 3,2	11,8 ± 0,8	21,4 ± 2,0	6,7 ± 0,7	0,0
R ₃ -2	78,9 ± 7,5	21,4 ± 2,5	10,0 ± 0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
R ₃ -3-1	75,0 ± 6,9	40,0 ± 3,8	44,4 ± 3,8	16,7 ± 1,3	12,6 ± 1,5	0,0	0,0
R ₃ -4-9	95,0 ± 8,5	64,3 ± 5,5	47,4 ± 1,9	42,1 ± 3,3	44,4 ± 4,8	26,7 ± 2,4	12,6 ± 1,3
R ₃ -5	94,7 ± 8,7	33,3 ± 2,9	15,8 ± 1,8	0,0	0,0	0,0	0,0
R ₃ -5-6	80,0 ± 6,4	48,4 ± 5,6	52,9 ± 5,4	35,3 ± 3,6	46,7 ± 4,7	31,3 ± 3,5	23,5 ± 2,5
R ₃ -2-7	76,5 ± 6,6	56,3 ± 4,8	31,6 ± 2,7	25,0 ± 1,9	35,3 ± 3,4	21,1 ± 2,4	10,5 ± 1,4
R ₃ -7-8	60,0 ± 4,3	31,6 ± 3,7	15,8 ± 1,8	20,0 ± 1,6	15,8 ± 1,9	0,0	0,0
R ₃ -7-9	90,5 ± 8,4	64,3 ± 5,7	46,7 ± 4,2	26,3 ± 2,2	48,4 ± 4,5	31,6 ± 3,6	6,8 ± 0,8
R ₃ -10	70,0 ± 6,7	6,3 ± 0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
r	0,138	0,751*	0,798*	0,870*	0,796*	0,706*	0,806*
rr	-	0,785*	0,802*	0,869*	0,825*	0,731*	0,796*

Примечание. r – коэффициент корреляции между засухоустойчивостью генотипов (К.3.) и ЧПЗ в эмбриокультуре; rr – коэффициент корреляции между засухоустойчивостью генотипов (К.3.) и ЧПЗ в эмбриокультуре (% к контролю); * – достоверные значения коэффициента корреляции при $p \leq 0,05$.

Таблица 3 – Влияние осмотического, низкотемпературного стрессов и генотипа на частоту развившихся проростков в эмбриокультуре шалфея мускатного, %

Сорт, образец	Контроль	I вариант промораживания			II вариант промораживания		
		3с	4с	5с	3с	4с	5с
С-785	59,2 ± 6,0	8,3 ± 1,0	7,8 ± 0,9	0,0	4,7 ± 0,5	0,0	0,0
Ай-Тодор	43,1 ± 4,2	27,6 ± 2,2	19,9 ± 2,0	5,2 ± 0,7	12,7 ± 1,0	2,2 ± 2,0	0
Тайган	56,1 ± 5,2	36,8 ± 3,3	34,9 ± 3,8	19,9 ± 2,2	24,1 ± 2,0	11,5 ± 1,2	4,7 ± 0,6
R ₃ -2-1	44,9 ± 4,1	32,4 ± 4,0	26,2 ± 2,2	5,3 ± 0,7	22,6 ± 2,4	2,1 ± 0,3	0,0
R ₃ -2	46,8 ± 5,0	15,2 ± 1,5	6,4 ± 0,9	0,0	0,0	0,0	0,0
R ₃ -3-1	46,4 ± 5,2	25,5 ± 2,0	27,4 ± 3,0	4,8 ± 0,5	10,4 ± 1,0	0,0	0,0
R ₃ -4-9	72,6 ± 6,8	48,2 ± 4,1	28,1 ± 3,2	29,4 ± 3,0	40,1 ± 3,5	24,2 ± 2,2	3,8 ± 0,5
R ₃ -5	70,8 ± 7,2	24,8 ± 3,0	5,6 ± 0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
R ₃ -5-6	55,4 ± 5,9	33,2 ± 3,8	33,6 ± 3,8	34,2 ± 3,1	42,4 ± 3,3	35,6 ± 4,0	9,4 ± 1,0
R ₃ -2-7	47,2 ± 4,3	45,6 ± 4,0	17,2 ± 2,0	21,6 ± 1,8	35,3 ± 2,8	30,2 ± 3,3	4,2 ± 0,5
R ₃ -7-8	35,4 ± 3,8	23,4 ± 2,2	8,5 ± 1,0	20,2 ± 1,9	11,6 ± 1,2	0,0	0,0
R ₃ -7-9	65,2 ± 5,5	43,2 ± 3,6	27,4 ± 2,2	24,2 ± 2,1	44,8 ± 4,2	30,4 ± 3,1	3,5 ± 0,4
R ₃ -10	44,2 ± 3,8	5,4 ± 0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
r	0,151	0,774*	0,793*	0,826*	0,788*	0,696*	0,774*
rr	-	0,743*	0,739*	0,778*	0,818*	0,703*	0,766*

Примечание. r – коэффициент корреляции между засухоустойчивостью генотипов (К.3.) и ЧРП в эмбриокультуре; rr – коэффициент корреляции между засухоустойчивостью генотипов (К.3.) и ЧРП в эмбриокультуре (% к контролю); * – достоверные значения коэффициента корреляции при $p \leq 0,05$.

Следует отметить, что частота прорастания зародышей и развившихся проростков у сорта Тайган и образцов R₃-2-7, R₃-4-9, R₃-5-6 (имеющих наиболее высокие К.З.) были выше при увеличении содержания сорбита, а также при холодовом стрессе по сравнению с генотипами с более низкими К.З. Особенно хорошо различия между генотипами проявились при наиболее жестких режимах стрессов. Так, при втором режиме промораживания на среде с 5 % сорбита проростки (с частотой 3,5–9,4 %) были получены только у Тайгана и R₃-4-9, R₃-5-6, R₃-2-7, R₃-7-9 (имеющих К.З. от 32,8 до 64,3 %). У остальных сортов и образцов с более низкими К.З. проростки в этом варианте опыта не формировались (см. таблицу 3). Наименее устойчивыми к комплексному действию изучаемых стрессов были сорт С-785, образцы R₃-2 и R₃-10 (К.З. от 14,5 до 27,1 %), у которых проростков не отмечено даже при первом варианте промораживания и введении в питательную среду МС 4–5 % сорбита.

Таблица 4 – Влияние осмотического, низкотемпературного стрессов и генотипа на высоту полученных в эмбриокультуре проростков шалфея мускатного, см

Сорт, образец	Контроль	I вариант промораживания			II вариант промораживания		
		3с	4с	5с	3с	4с	5с
С-785	5,2 ± 0,3	0,42 ± 0,05	0,44 ± 0,05	0,0	1,52 ± 0,12	0,0	0,0
Ай-	9,4 ± 0,6	1,34 ± 0,08	0,43 ± 0,04	0,32 ± 0,04	0,34 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,0
Тайган	5,4 ± 0,6	1,33 ± 0,07	1,46 ± 0,07	1,02 ± 0,11	0,45 ± 0,05	0,54 ± 0,03	0,46 ±
R ₃ -2-1	7,8 ± 0,8	1,82 ± 0,10	1,55 ± 0,10	1,13 ± 0,03	0,62 ± 0,07	0,56 ± 0,05	0,0
R ₃ -2	7,3 ± 0,9	0,86 ± 0,06	0,54 ± 0,03	0,0	0,0	0,0	0,0
R ₃ -3-1	7,1 ± 0,8	1,52 ± 0,14	0,92 ± 0,10	0,14 ± 0,03	1,26 ± 0,16	0,0	0,0
R ₃ -4-9	8,7 ± 0,9	0,91 ± 0,06	0,54 ± 0,03	0,23 ± 0,10	1,18 ± 0,10	1,22 ± 0,16	1,43 ±
R ₃ -5	7,2 ± 0,9	0,65 ± 0,04	0,64 ± 0,07	0,0	0,0	0,0	0,0
R ₃ -5-6	7,4 ± 0,9	0,83 ± 0,07	0,93 ± 0,10	0,57 ± 0,10	0,84 ± 0,07	0,44 ± 0,07	0,86 ±
R ₃ -2-7	10,2 ± 0,9	0,87 ± 0,09	0,7 ± 0,04	0,45 ± 0,10	1,15 ± 0,10	0,57 ± 0,08	0,57 ±
R ₃ -7-8	7,5 ± 0,6	1,12 ± 0,09	0,53 ± 0,08	0,55 ± 0,03	0,74 ± 0,08	0,0	0,0
R ₃ -7-9	8,8 ± 0,7	0,74 ± 0,05	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,07	1,14 ± 0,09	0,94 ± 0,08	0,65 ±
R ₃ -10	9,5 ± 0,9	0,76 ± 0,04	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
r	0,056	0,278	0,493	0,573	0,411	0,645	0,723*
rr	-	0,356	0,439	0,549	0,628	0,693*	0,764*

Примечание. r – коэффициент корреляции между засухоустойчивостью генотипов (К.З.) и высотой проростков в эмбриокультуре; rr – коэффициент корреляции между засухоустойчивостью генотипов (К.З.) и высотой проростков в эмбриокультуре (% к контролю); * – достоверные значения коэффициента корреляции при $p \leq 0,05$.

О наличии связи между полевой засухоустойчивостью растений и развитием проростков в эмбриокультуре *in vitro* свидетельствуют высокие коэффициенты корреляции, особенно по признаку «частота развившихся проростков» (см. таблицу 3). Коэффициенты корреляции по этому признаку достигали 0,774–0,826 при максимальном содержании осмотика в среде и обоих вариантах промораживания. Для минимизации разницы между изучаемыми сортами и образцами, обусловленной не полевой устойчивостью, а генотипическими различиями, все параметры были также рассчитаны и в % к контролю. Как видно из полученных данных, коэффициенты корреляции между полевой засухоустойчивостью и основными параметрами (в частности, частотой

прорастания зародышей и развившихся проростков) в % к контролю были такими же или даже выше.

Таблица 5 – Влияние осмотического и низкотемпературного стрессов и генотипа на длину корня у проростков в эмбриокультуре шалфея мускатного, см

Генотип	Контроль	I вариант промораживания			II вариант промораживания		
		3с	4с	5с	3с	4с	5с
С-785	10,2 ± 0,8	2,4 ± 0,2	1,6 ± 0,2	0,0	12,5 ± 0,8	0,0	0,0
Ай-Годор	10,5 ± 0,6	10,4 ± 1,1	5,7 ± 0,3	3,8 ± 0,5	6,5 ± 0,4	4,5 ± 0,5	0,0
Тайган	10,4 ± 0,9	8,9 ± 0,7	8,7 ± 0,6	7,1 ± 0,5	9,6 ± 0,8	10,1 ± 0,8	10,9 ± 1,0
R ₃ -2-1	14,4 ± 1,8	8,2 ± 0,9	9,9 ± 0,7	4,2 ± 0,5	6,0 ± 0,7	4,5 ± 0,4	0,0
R ₃ -2	13,4 ± 0,9	4,3 ± 0,5	4,0 ± 0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
R ₃ -3-1	12,8 ± 1,4	6,2 ± 0,7	6,5 ± 0,5	3,9 ± 0,4	1,8 ± 0,2	1,1 ± 0,1	0,0
R ₃ -4-9	14,3 ± 1,5	6,1 ± 0,7	4,7 ± 0,5	5,2 ± 0,6	8,8 ± 0,6	7,1 ± 0,6	6,5 ± 0,7
R ₃ -5	14,6 ± 1,3	5,5 ± 0,4	3,7 ± 0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
R ₃ -5-6	12,7 ± 0,8	8,4 ± 0,7	8,0 ± 0,6	7,1 ± 0,6	6,9 ± 0,6	5,2 ± 0,5	3,9 ± 0,4
R ₃ -2-7	16,9 ± 1,9	9,3 ± 0,8	8,3 ± 0,5	4,2 ± 0,4	4,7 ± 0,5	4,5 ± 0,4	3,9 ± 0,3
R ₃ -7-8	12,6 ± 0,9	6,8 ± 0,6	7,0 ± 0,7	6,2 ± 0,4	2,1 ± 0,1	0,0	0,0
R ₃ -7-9	15,0 ± 1,6	11,7 ± 0,9	7,8 ± 0,7	7,0 ± 0,7	10,4 ± 0,9	7,1 ± 0,9	4,5 ± 0,5
R ₃ -10	16,5 ± 1,7	1,0 ± 0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
r	-0,155	0,578	0,648	0,778*	0,503	0,766*	0,716*
rr	-	0,573	0,665	0,768*	0,419	0,731*	0,681*

Примечание. r – коэффициент корреляции между засухоустойчивостью генотипов (К.З.) и длиной корня проростков в эмбриокультуре; rr – коэффициент корреляции между засухоустойчивостью генотипов (К.З.) и длиной корня проростков в эмбриокультуре (% к контролю); * – достоверные значения коэффициента корреляции при $p \leq 0,05$.

Изучение влияния стрессовых факторов на морфометрические признаки у сортов и образцов шалфея показало, что высота проростка, длина корня и количество пар листьев существенно уступали контролю. При действии моделируемых стрессов у проростков наблюдали развитие одной пары очень мелких (0,2–0,3 мм) сильно опущенных листьев, тогда как в контроле, в зависимости от генотипа, развивалось от 2,8 до 3,9 пар листьев. Анализ высоты проростков и длины основного корня при действии стрессов показал снижение этих параметров (до 6–22 раз) у генотипов в зависимости от их полевой устойчивости (таблицы 4, 5). У генотипов с высокими К.З. (Тайган, R₃-4-9, R₃-5-6, R₃-2-7) угнетение развития проростков при действии стрессов было меньше, чем у менее устойчивых образцов. Достоверная корреляция между морфометрическими параметрами и К.З. обнаружена только при наиболее жестких режимах стрессов (4–5 % сорбита, II вариант промораживания). Следует отметить, что достоверная корреляция между длиной корня и К.З. генотипов (r – от 0,716 до 0,778) выявлена в трех вариантах опыта, тогда как корреляция между высотой проростка и К.З. генотипов (r – 0,723) – только в одном.

Следует отметить, что наиболее тесная зависимость между полевой устойчивостью и параметрами развития зародышей *in vitro* отмечена по частоте прорастания зародышей и частоте развившихся проростков (во всех вариантах стрессовой обработки выявлены достоверные коэффициенты корреляции от 0,696 до 0,870). Данные параметры целесообразно использовать при оценке или отборе генотипов, а также сравнивать их с наиболее устойчивым сортом Тайган при максимальных режимах моделируемого стресса. В результате эксперимента выделены четыре образца шалфея (R₃-4-9, R₃-5-6, R₃-2-7, R₃-7-9), обладающие

комплексной устойчивостью к действию осмотического и низкотемпературного стрессов в условиях *in vitro*.

Как видно из представленных данных, в проведенном эксперименте продолжительность отбора при комплексном действии двух стрессов достигала 19 суток. Поэтому на следующем этапе исследований проведена оптимизация методики селекции *in vitro* с целью усовершенствования режимов холодового стресса и сокращения сроков отбора устойчивых форм. В этом эксперименте использовали зиготические зародыши трех сортов (С-785, Тайган, Ай-Тодор), различающихся по полевой засухоустойчивости (таблица 1). В контрольных вариантах культивирование проводили без холодной обработки при 26 °С на безгормональной среде МС (Кб/г) или с добавлением сорбита в концентрации 3, 4 и 5 % (соответственно К 3с, К 4с, К 5с). Для изучения комплексного действия стрессов зародыши культивировали при низкотемпературной обработке на средах с сорбитом и с более короткой продолжительностью закаливания, промораживания (два варианта – I и II) и оттаивания. Основными критериями реакции генотипов на действие стрессов использовали частоту прорастания зародышей (ЧПЗ, %) и частоту развившихся проростков (ЧРП, %) (рисунки 1, 2, 3).

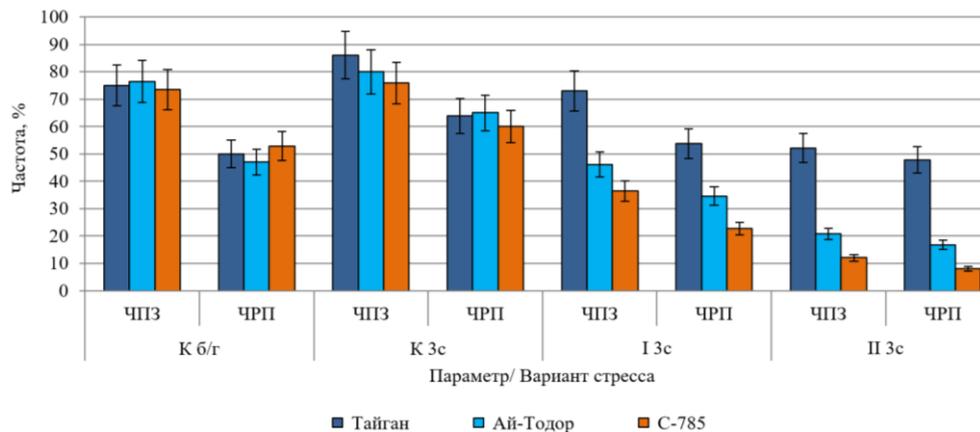


Рисунок 1 – Влияние низкотемпературного стресса и введения в состав питательной среды 3,0 % сорбита на частоту прорастания зародышей (ЧПЗ) и частоту развившихся проростков (ЧРП) в эмбриокультуре шалфея мускатного, %
Примечание. Здесь и далее: Кб/г – контроль, культивирование при 26 °С на МС б/г; К 3с; К 4с; К 5с – культивирование при 26 °С на среде МС с 3, 4, 5 % сорбита соответственно; I 3с; I 4с; I 5с – культивирование при I варианте промораживания на среде МС с 3, 4, 5 % сорбита соответственно; II 3с; II 4с; II 5с – культивирование при II варианте промораживания на среде МС с 3, 4, 5 % сорбита соответственно.

Установлено, что в контроле без низкотемпературного стресса добавление в питательную среду 3 % сорбита (К 3с) стимулировало развитие изолированных зародышей (рисунок 1). Так, частота прорастания зародышей и частота развившихся проростков у всех сортов были в 1,1–1,4 раза выше, чем в контроле (Кб/г). В этом варианте достоверных различий между сортами не отмечено. Культивирование зародышей на средах с более высокой концентрацией сорбита (К 4с и К 5с) позволило дифференцировать изучаемые сорта по устойчивости к осмотику (см. рисунки 2, 3). Так, в варианте К 4с частота прорастания зародышей у Тайгана была в 1,3 раза выше, чем у С-785, а частота развившихся проростков – в 1,5 раза. Сорт Тайган в культуре *in vitro* отличался максимальной устойчивостью к действию осмотического стресса.

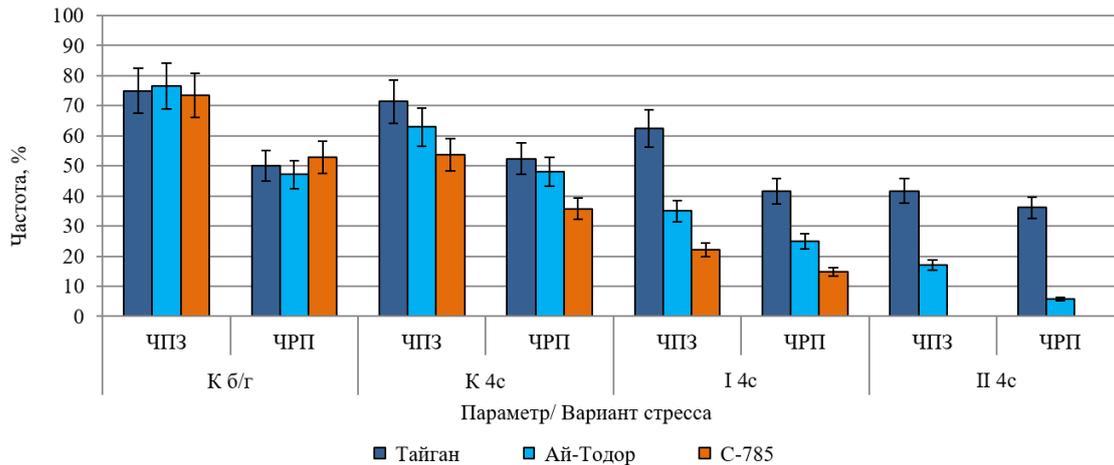


Рисунок 2 – Влияние низкотемпературного стресса и введения в состав питательной среды 4,0 % сорбита на частоту прорастания зародышей (ЧПЗ) и частоту развившихся проростков (ЧРП) в эмбриокультуре шалфея мускатного, %

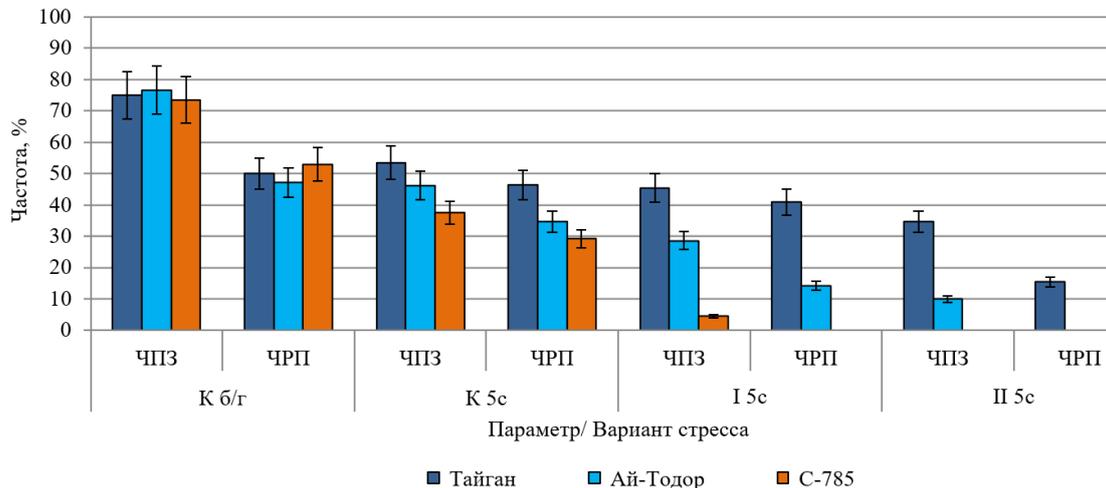


Рисунок 3 – Влияние низкотемпературного стресса и введения в состав питательной среды 5,0 % сорбита на частоту прорастания зародышей (ЧПЗ) и частоту развившихся проростков (ЧРП) в эмбриокультуре шалфея мускатного, %

При исследовании совместного действия низкотемпературного и осмотического стрессов разница между сортами по изучаемым параметрам проявилась в ещё большей степени. Увеличение дозы стрессовых факторов приводило к более резкой дифференциации сортов по устойчивости. Так, в I варианте промораживания на среде с 3 % сорбита (I 3с) частота прорастания зародышей у Тайгана была в 1,6 раз выше, чем у Ай-Тодора и в 2,1 раза по сравнению с С-785 (см. рисунок 1). При более жёстких условиях стрессов (II 5с) у Тайгана зародыши проросли с частотой 34,6 %, у Ай-Тодора – 10,0 %, а у сорта С-785 зародыши не проросли (см. рисунок 3). Следовательно, сокращение длительности низкотемпературного стресса при отборе *in vitro* до 8–10 суток позволило успешно дифференцировать сорта по устойчивости к комплексному стрессу.

Изучение влияния стрессовых факторов на развитие морфологических признаков у изучаемых генотипов показало, что экспериментальные растения по высоте проростка, длине корня и количеству пар листьев существенно уступали контрольным. Так, в варианте I 3с у сорта Тайган высота проростка была в 8,4 раза, длина корня в 4,2 раза ниже, чем в контроле. Однако достоверных различий между сортами по морфологическим признакам во всех вариантах не установлено. Поэтому при отборе устойчивых форм можно не учитывать такие морфологические признаки проростков, как их высота и длина корня. В результате селекции *in vitro* в культуре изолированных зародышей сорта Тайган были отобраны несколько проростков, устойчивых к низкотемпературному и осмотическому стрессу (рисунок 4), семенное потомство которых в дальнейшем будет анализироваться по основным хозяйственно ценным признакам для получения исходного селекционного материала.



Рисунок 4 – Проростки шалфея мускатного сорта Тайган, отобранные в эмбриокультуре после низкотемпературного стресса (II вариант) на питательной среде МС с 5 % маннита (40 сут. культивирования)

Таким образом, при культивировании изолированных зародышей шалфея в моделируемых условиях низкотемпературного и осмотического стрессов наблюдалась корреляция устойчивости на уровне культур *in vitro* и в полевых условиях, что свидетельствует об эффективности разработанного биотехнологического приема для отбора форм с повышенной устойчивостью к этим факторам. Косвенными признаками при отборе форм, устойчивых к комплексному воздействию абиотических стрессов, могут служить частота прорастания зародышей и частота развившихся проростков.

Судя по имеющимся литературным данным, у ряда видов растений при использовании приемов селекции *in vitro* была показана возможность отбора генотипов, устойчивых к нескольким различным стрессовым факторам. Такое направление исследований основано на имеющихся сходных механизмах формирования у растений на клеточном и тканевом уровнях устойчивости к некоторым абиотическим стрессам (солевому, осмотическому, низкотемпературному) [3, 5, 10]. В некоторых случаях отбор *in vitro* на устойчивость к одному стрессору может привести к повышению устойчивости и к другому. Например, у кормовой свеклы получены каллусные линии (а затем и растения-регенеранты), устойчивые одновременно к засолению, низким позитивным температурам и токсину возбудителя бактериоза [10], а у кукурузы в результате клеточной селекции были отобраны регенеранты, проявившие

резистентность к засолению, низкой температуре и засухе [6]. В исследованиях О. Н. Шуплецовой с соавторами в селективных условиях *in vitro* у ячменя были выявлены регенеранты с комплексной устойчивостью к засухе, повышенной кислотности и токсичности алюминия [19].

В результате наших исследований была показана возможность отбора *in vitro* форм шалфея мускатного с комплексной устойчивостью к осмотическому стрессу и низкой температуре. В такой селективной системе культивирование зародышей проводится на питательной среде МС с добавлением 4–5 % сорбита и низкотемпературном стрессе (при промораживании до $-8...-10$ °С в течение трех суток). С другой стороны, культивирование зародышей в селективной системе можно применить и для косвенной оценки устойчивости к данным абиотическим стрессам у различных образцов и сортов. Для такой оценки целесообразно использовать более жесткий режим при снижении температуры в ходе промораживания до $-12...-14$ °С (пять суток). Эффективность такого биотехнологического метода можно повысить, используя для размножения отобранных проростков методику клонального микроразмножения шалфея [14]. В ряде случаев при слабом развитии отобранных устойчивых проростков это необходимо для их дальнейшей успешной адаптации к условиям *ex vitro*. В целом, комплекс разработанных приемов культивирования *in vitro* способствует повышению эффективности создания исходного материала при получении новых устойчивых к стрессам сортов шалфея мускатного.

Выводы

Исследовано развитие изолированных зиготических зародышей у шалфея мускатного в условиях осмотического и низкотемпературного стрессов с целью разработки селективной системы создания устойчивых к этим стрессовым факторам форм *in vitro*. Проведен анализ эмбриокультуры трех сортов и 10 образцов *S. sclarea*, различающихся по засухоустойчивости (коэффициенты засухоустойчивости растений в полевых условиях варьировали от 14,5 до 64,3 %). При сравнении с контролем выявлено снижение анализируемых параметров (частота прорастания зародышей, частота развившихся проростков, длина побега и корня) по мере повышения концентрации сорбита до 5 % в питательной среде МС и снижения температуры при холодной обработке до $-8...-14$ °С. Вместе с тем у генотипов с высокими коэффициентами засухоустойчивости (Тайган, R₃-4-9, R₃-5-6, R₃-2-7) угнетение развития проростков при действии двух стрессоров наблюдалось в меньшей степени, чем у менее устойчивых образцов (С-785, R₃-2, R₃-5, R₃-10), у которых проростки при наиболее жестких режимах не формировались. Максимальные достоверные коэффициенты корреляции (во всех вариантах стрессовой обработки от 0,696 до 0,870) установлены между полевой засухоустойчивостью генотипов и частотой прорастания зародышей или частотой развившихся проростков. При дальнейшей оптимизации методики показано, что сокращение длительности низкотемпературного стресса при отборе *in vitro* с 19 до 8–10 суток (включая закаливание, промораживание и оттаивание культур) позволило успешно дифференцировать сорта по устойчивости к комплексному стрессу. В результате разработана селективная система, которую можно использовать для отбора или для косвенной оценки *in vitro* форм шалфея с комплексной устойчивостью к осмотическому и низкой температуре, включающая культивирование зародышей на средах с 4–5 % сорбита и низкотемпературный стресс (при промораживании до $-8...-14$ °С в течение трех–пяти суток).

Работа выполнена в рамках госзадания Министерства образования и науки РФ
FNZW-2022-0008.

Литература

1. Калашникова Е. А. Клеточная инженерия растений. М.: Юрайт, 2020. 333 с.
2. 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. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2010.10.021.
3. Hanaka A., Majewska M., Jaroszuk-Ścisiel J. Study of the influence of abiotic and biotic stress factors on horticultural plants // Horticulturae. 2022. Vol. 8 (1). 6 p. DOI: 10.3390/horticulturae8010006.
4. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. Киев: Наукова думка, 1990. 280 с.
5. Farooqi Z. U. R., Ayub M. A., Zia ur Rehman M., Sohail M.I., Usman M., Khalid H., Naz K. Regulation of drought stress in plants // In book: Plant life under changing environment: responses and management. Chapter 4. Ed. by Tripathi D. K. Academic Press (Elsevier), 2020. P. 77–104. DOI: 10.1016/B978-0-12-818204-8.00004-7.
6. Дубровная О. В. Селекция пшеницы *in vitro* на устойчивость к абиотическим стрессовым факторам // Физиология растений и генетика. 2017. Т. 49. № 4. С. 279–292. DOI: 10.15407/frg2017.04.279.
7. Игнатова С. А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. Одесса: Астропринт, 2011. 224 с.
8. Пикало С., Демидов О., Юрченко Т., Хоменко С., Гуменюк О., Харченко М., Прокопик Н. Методи оцінки посухостійкості селекційного матеріалу пшениці // Вісник Львівського університету. 2020. Серія біологічна. Вип. 82. С. 63–79. DOI: 10.30970/vlubs.2020.82.05.
9. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Эмбриокультура *in vitro* в экспериментальной оценке засухоустойчивости хлебных злаков (обзор) // Таврический вестник аграрной науки. 2021. № 2 (26). С.127–144. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-2-26-127–144.
10. Дубровная О. В., Чугункова Т. В., Бавол А. В., Лялько И. И. Біотехнологічні та цитогенетичні основи створення рослин, стійких до стресів. К.: Логос, 2012. 428 с
11. Круглова Н. Н., Сельдимирова О. А., Зинатуллина А. Е. Каллусные культуры *in vitro* в экспериментальной оценке засухоустойчивости хлебных злаков (обзор) // Таврический вестник аграрной науки. 2021. № 1(25). С. 124–139. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-1-25-124-139.
12. Аминева Е. Ю., Табацкая Т. М., Машкина О. С. Оценка солеустойчивости *Populus L.* в условиях моделируемого стресса *in vitro* // Субтропическое и декоративное садоводство. 2021. № 79. С. 60–66. DOI: 10.31360/2225-3068-2021-79-60-66.
13. Tabatskaya T. M., Mashkina O. S., Korchagin O. M. *In vitro* modeling of salinity stress for the selection of stress-tolerant birch lines // E3S Web of Conferences “Topical problems of agriculture, civil and environmental engineering, TPАСЕЕ 2020”. 2020. Vol. 224. Art. No. 04013. DOI: 10.1051/e3sconf/202022404013.
14. Егорова Н. А. Биотехнология эфиромасличных растений: создание новых форм и микроразмножение *in vitro*. Симферополь: ИД «Автограф», 2021. 315 с. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-978-5-6045452-9-4.
15. Егорова Н. А., Ставцева И. В. Использование эмбриокультуры для отбора *in vitro* форм кориандра, устойчивых к низкотемпературному стрессу // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 3. С. 369–377. DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-3-369-377.
16. Россеев В. М., Белан И. А., Россеева Л. П. Использование метода *in vitro* в селекции пшеницы мягкой яровой // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2016. № 2 (136). С. 5–9.
17. Marssaro A. L., Morais-Lino L.-S., Cruz J. L., da Silva Ledo C. A., dos Santos-Serejo J. A. Simulation of *in vitro* water deficit for selecting drought-tolerant banana genotypes // Pesq. Agropec. Bras. 2017. Vol. 52. No. 12. P. 1301–1304. DOI: 10.1590/s0100-204x2017001200021.
18. Zemlianukhina O., Cherkasova N., Zhuzhzhhalova T., Kalaev V. Biochemical and morphological characteristics of acid-resistant regenerants of sugar beet (*Beta vulgaris L.*) // J. Agric. Sci. Technol. 2017. Vol. 7. No. 6.P. 383–392. DOI: 10.17265/2161-6256/2017.06.003.
19. Шуплецова О. Н., Щенникова И. Н. Результаты использования клеточных технологий в создании новых сортов ячменя, устойчивых к токсичности алюминия и засухе // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. Т. 20. № 5. С. 623–628. DOI: 10.18699/VJ16.183.

20. Лукомец В. М., Кривошлыков К. М., Зеленцов С. В., Бочкарев Н. И., Мошненко Е. В., Хатнянский В. И., Шуваева Т. П., Бородкина А. П., Пасменко Т. В., Бушнев А. С., Тишков Н. М., Пивень В. Т., Шуляк И. И., Мурадасилова Н. В., Семеренко С. А. Эфиромасличные культуры. Краснодар: Просвещение-Юг, 2017. 295 с.
21. Паштецкий В. С., Тимашева Л. А., Пехова О. А., Данилова И. Л., Серебрякова О. А. Эфирные масла и их качество. Симферополь: Ариал, 2021. 212 с. DOI: 10.33952/2542-0720-978-5-907506-16-9.
22. Aćimović M., Kiproviski B., Rat M., Sikora V., Popović V., Koren A., Brdar-Jokanović M. *Salvia sclarea*: chemical composition and biological activity // Journal of Agronomy, Technology and Engineering Management. 2018. Vol. 1(1). P. 18–28.
23. Ставцева И. В., Егорова Н. А. Создание сорта шалфея мускатного с использованием методов клеточной инженерии. 2. Изучение растений-регенерантов на этапах селекционного процесса // Таврический вестник аграрной науки. 2021. № 2 (26). С. 208–222. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-2-26-208-222.
24. Echeverrigaray S., Carrer R. P., Andrade L. B. Micropropagation of *Salvia guaranitica* Benth. through axillary shoot proliferation // Braz. arch. biol. technol. 2010. Vol. 53 (4). P. 883–888. DOI: 10.1590/S1516-89132010000400018.
25. Ghanbar T., Hosseini B., Jabbarzadeh Z., Farokhzad A., Sharafi A. High-frequency *in vitro* direct shoots regeneration from axillary nodal and shoot tip explants of clary sage (*Salvia sclarea* L.) // Bulg. J. Agric. Sci. 2016. Vol. 22. No. 1. P. 73–78.
26. Grigoriadou K., Trika F. A., Tsoktouridis G., Krigas N., Sarropoulou V., Papanastasi K., Maloupa E., Makris A. M. Micropropagation and cultivation of *Salvia sclarea* for essential oil and sclareol production in northern Greece // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2020. Vol. 56. P. 51–59. DOI: 10.1007/s11627-019-10040-4.
27. Erişen S., Kurt-Gür G., Servi H. *In vitro* propagation of *Salvia sclarea* L. by meta-Topolin, and assessment of genetic stability and secondary metabolite profiling of micropropagated plants // Industrial Crops and Products. 2020. Vol. 157. Art. No. 112892. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112892.
28. Tawfik A. A., Mohamed M. F. Regeneration of salvia (*Salvia officinalis* L.) via induction of meristematic callus // In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant. 2007. Vol. 43. No. 1. P. 21–27. DOI: 10.1007/s11627-006-9002-9.
29. Ioja-Boldura O. M., Radu F., Popescu S., Borozan A. Regeneration, micropropagation, callus cultures and somatic embryogenesis of common sage (*Salvia officinalis* L.) // Bulletin UASVM Horticulture. 2010. Vol. 67(1). P. 308–313.
30. Marconi P. L., López M. C., De Meester J., Bovjin C., Alvarez M.A. *In vitro* establishment of *Salvia hispanica* L. plants and callus // Biotecnología Vegetal. 2013. Vol. 13. No. 4. P. 203–207.
31. Musarurwa H. T., Koegelenberg L., Makunga N. P. Chemical variation in essential oil profiles detected using headspace solid-phase microextraction gas chromatography spectrometry in response to potassium, nitrogen, and water available to micropropagated plants of *Salvia stenophylla* (Burch. ex Benth.) // J Plant Growth Regul. 2012. Vol. 31. P. 207–220. DOI: 10.1007/s00344-011-9232-x.
32. Han L. M., Yu J. N., Ju W. F. Salt and drought tolerance of transgenic *Salvia miltiorrhiza* Bunge with the TaLEA1 gene // Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao = Journal of plant physiology and molecular biology. 2007. Vol. 33(2). P. 109–114. PMID: 17452795. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17452795/> (дата обращения 20.02.2023).
33. Егорова Н. А., Ставцева И.В. Использование эмбриокультуры для отбора устойчивых к осмотическому стрессу форм шалфея мускатного *in vitro* // Таврический вестник аграрной науки. 2022. № 1 (29). С. 41–56.
34. Моргун В. В., Григорюк И. П., Кравець В. С. Вплив регуляторів росту на водний статус і продуктивність сортів картоплі за умов посухи // Физиология и биохимия культурных растений. 2001. Т. 33. № 5. С. 371–376.
35. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка, 1980. 488 с.
36. Ставцева И. В., Егорова Н. А. Культура изолированных зародышей шалфея и ее использование в селекции. Методические рекомендации. Симферополь, ИЭЛР НААНУ, 2011. 20 с.
37. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. No. 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

References

1. Kalashnikova E. A. Cell engineering of plants. Moscow: Yurayt, 2020. 333 p.

2. 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. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2010.10.021.
3. Hanaka A., Majewska M., Jaroszuk-Ścisiel J. Study of the influence of abiotic and biotic stress factors on horticultural plants // Horticulturae. 2022. Vol. 8 (1). 6 p. DOI: 10.3390/horticulturae8010006.
4. Sidorov V. A. Plant biotechnology. Cell selection. Kyiv: Naukova dumka, 1990. 280 p.
5. Farooqi Z. U. R., Ayub M. A., Zia ur Rehman M., Sohail M.I., Usman M., Khalid H., Naz K. Regulation of drought stress in plants // In book: Plant life under changing environment: responses and management. Chapter 4. Ed. by Tripathi D. K. Academic Press (Elsevier), 2020. P. 77–104. DOI: 10.1016/B978-0-12-818204-8.00004-7.
6. Dubrovnaya O. V. *In vitro* selection of wheat for resistance to abiotic stress factors // Fiziologia rastenij i genetika (Plant physiology and genetics). 2017. Vol. 49. No. 4. P. 279–292. DOI: 10.15407/frg2017.04.279.
7. Ignatova S. A. Cell technologies in plant growing, genetics and breeding of cultivated plants: tasks, opportunities, development of *in vitro* systems. Odessa: Astroprint, 2011. 224 p.
8. Pykalo S., Demidov O., Yurchenko T., Khomenko S., Gumenyuk O., Kharchenko M., Prokopik N. Methods for evaluation of wheat breeding material for drought tolerance // Visnyk of Lviv University. Biological series. 2020. Iss. 82. P. 63–79. DOI: 10.30970/vlubs.2020.82.05.
9. Kruglova N. N., Seldimirova O. A., Zinatullina A. E. Embryo culture *in vitro* in the experimental evaluation of drought resistance in cereals (review) // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2021. No. 2 (26). P. 127–144. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-2-26-127-144.
10. Dubrovnaya O. V., Chugunkova T. V., Baval A. V., Lyalko I. I. Biotechnological and cytogenetic basis for creating stress-resistant plants. Kyiv: Logos, 2012. 428 p.
11. Kruglova N. N., Seldimirova O. A., Zinatullina A. E. Callus culture *in vitro* in the experimental evaluation of drought resistance in cereals (review) // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2021. No. 1 (25). P. 124–139. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-1-25-124-139.
12. Amineva Ye. Yu., Tabatskaya T. M., Mashkina O. S. Assessment of *Populus L.* salt resistant under simulated stress conditions *in vitro* // Subtropicheskoye i dekorativnoye sadovodstvo (Subtropical and ornamental horticulture). 2021. No. 79. P. 60–66. DOI: 10.31360/2225-3068-2021-79-60-66.
13. Tabatskaya T. M., Mashkina O. S., Korchagin O.M. *In vitro* modeling of salinity stress for the selection of stress-tolerant birch lines // E3S Web of Conferences “Topical problems of agriculture, civil and environmental engineering, TPACEE 2020”. 2020. Vol. 224. Art. No. 04013. DOI: 10.1051/e3sconf/202022404013.
14. Yegorova N. A. Biotechnology of essential oil plants: creation of new forms and micropropagation *in vitro*. Simferopol: “Avtograf”, 2021. 315 p. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-978-5-6045452-9-4.
15. Yegorova N. A., Stavtseva I. V. Use of embryo culture for selection *in vitro* of coriander forms, resistant to low-temperature stress // Ecobiotech. 2019. Vol. 2. No 3. P. 369–377. DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-3-369-377.
16. Rosseyev V. M., Belan I. A., Rosseyeva L. P. The use of *in vitro* method in spring soft wheat selective breeding // Bulletin of Altai State Agricultural University. 2016. No. 2 (136). P. 5–9.
17. Marssaro A. L., Morais-Lino L.-S., Cruz J. L., da Silva Ledo C. A., dos Santos-Serejo J. A. Simulation of *in vitro* water deficit for selecting drought-tolerant banana genotypes // Pesq. Agropec. Bras. 2017. Vol. 52. No. 12. P. 1301–1304. DOI: 10.1590/s0100-204x2017001200021.
18. Zemlianukhina O., Cherkasova N., Zhuzhzhhalova T., Kalaev V. Biochemical and morphological characteristics of acid-resistant regenerants of sugar beet (*Beta vulgaris L.*) // J. Agric. Sci. Technol. 2017. Vol. 7. No. 6. P. 383–392. DOI: 10.17265/2161-6256/2017.06.003.
19. Shupletsova O. N., Shchennikova I. N. Results of using cell technologies for creation of new barley varieties resistant against aluminum toxicity and drought // Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii [Vavilov Journal of Genetics and Breeding]. 2016. Vol. 20 (5). P. 623–628. DOI: 10.18699/VJ16.183.
20. Lukomets V. M., Krivoslykov K. M., Zelentsov S. V., Bochkarev N. I., Moshnenko E. V., Khatnyansky V. I., Shuvaeva T. P., Borodkina A. P., Pasmenko T. V., Bushnev A. S., Tishkov N. M., Piven V. T., Shulyak I. I., Muradasilova N. V., Semerenko S. A. Essential oil cultures. Krasnodar: Prosveshcheniye-Yug, 2017. 295 p.
21. Pashtetsky V. S., Timasheva L. A., Pekhova O. A., Danilova I. L., Serebryakova O. A. Essential oils and their quality. Simferopol: Arial, 2021. 212 p. DOI: 10.33952/2542-0720-978-5-907506-16-9.

22. Aćimović M., Kiproviski B., Rat M., Sikora V., Popović V., Koren A., Brdar-Jokanović M. *Salvia sclarea*: chemical composition and biological activity // Journal of Agronomy, Technology and Engineering Management. 2018. Vol. 1(1). P. 18–28.
23. Stavtzeva I. V., Yegorova N. A. Creation of clary sage cultivar using cell engineering methods. 2. Study of plant-regenerants at the stages of breeding process // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2021. No. 2 (26). P. 208–222. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-2-26-208-222.
24. Echeverrigaray S., Carrer R. P., Andrade L. B. Micropropagation of *Salvia guaranitica* Benth. through axillary shoot proliferation // Braz. arch. biol. technol. 2010. Vol. 53 (4). P. 883–888. DOI: 10.1590/S1516-89132010000400018.
25. Ghanbar T., Hosseini B., Jabbarzadeh Z., Farokhzad A., Sharafi A. High-frequency in vitro direct shoots regeneration from axillary nodal and shoot tip explants of clary sage (*Salvia sclarea* L.) // Bulg. J. Agric. Sci. 2016. Vol. 22. No. 1. P. 73–78.
26. Grigoriadou K., Trika F. A., Tsoktouridis G., Krigas N., Sarropoulou V., Papanastasi K., Maloupa E., Makris A.M. Micropropagation and cultivation of *Salvia sclarea* for essential oil and sclareol production in northern Greece // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2020. Vol. 56. P. 51–59. DOI: 10.1007/s11627-019-10040-4.
27. Erişen S., Kurt-Gür G., Servi H. In vitro propagation of *Salvia sclarea* L. by meta-Topolin, and assessment of genetic stability and secondary metabolite profiling of micropropagated plants // Industrial Crops and Products. 2020. Vol. 157. Art. No. 112892. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112892.
28. Tawfik A. A., Mohamed M. F. Regeneration of salvia (*Salvia officinalis* L.) via induction of meristematic callus // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2007. Vol. 43. No.1. P. 21–27. DOI: 10.1007/s11627-006-9002-9.
29. Ioja-Boldura O. M., Radu F., Popescu S., Borozan A. Regeneration, micropropagation, callus cultures and somatic embryogenesis of common sage (*Salvia officinalis* L.) // Bulletin UASVM Horticulture. 2010. Vol. 67(1). P. 308–313.
30. Marconi P. L., López M. C., De Meester J., Bovjin C., Alvarez M.A. *In vitro* establishment of *Salvia hispanica* L. plants and callus // Biotecnología Vegetal. 2013. Vol. 13. No. 4. P. 203–207.
31. Musarurwa H. T., Koegelenberg L., Makunga N. P. Chemical variation in essential oil profiles detected using headspace solid-phase microextraction gas chromatography spectrometry in response to potassium, nitrogen, and water available to micropropagated plants of *Salvia stenophylla* (Burch. ex Benth.) // J Plant Growth Regul. 2012. Vol. 31. P. 207–220. DOI: 10.1007/s00344-011-9232-x.
32. Han L. M., Yu J. N., Ju W. F. Salt and drought tolerance of transgenic *Salvia miltiorrhiza* Bunge with the TaLEA1 gene // Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao = Journal of plant physiology and molecular biology. 2007. Vol. 33(2). P. 109–114. PMID: 17452795. [Electronic resource]. Access point: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17452795/> (reference's date 20.02.2023).
33. Yegorova N. A., Stavtzeva I. V. The use of embryo culture for the selection clary sage forms resistant to osmotic stress *in vitro* // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2022. No. 1 (29). P. 41–56.
34. Morgun V. V., Grigoryuk I. P., Kravets V. S. Influence of growth regulators on water status and productivity of potato cultivars in drought conditions // Physiology and biochemistry of cultivated plants. 2001. Vol. 33. No. 5. P. 371–376.
35. Kalinin F. L., Sarnatskaya V. V., Polishchuk V. E. Methods of tissue culture in plant physiology and biochemistry. Kyiv: Naukova dumka, 1980. 488 p.
36. Stavtzeva I. V., Yegorova N. A. The culture of isolated sage embryos and their use in breeding. Guidelines. Simferopol: Research Institute of Essential Oil and Medicinal Crops, 2011. 20 p.
37. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. No. 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

UDC 633.81:57.085.2

Yegorova N. A., Stavtzeva I. V.

**INFLUENCE OF OSMOTIC AND LOW-TEMPERATURE STRESS
FACTORS ON THE DEVELOPMENT OF *SALVIA SCLAREA* L.
IN EMBRYOCULTURE *IN VITRO***

Summary. *Creation of new genotypes resistant to abiotic stress factors is the most important task of essential oil plants breeding. The purpose of this work was to study the effect of osmotic and low-temperature stresses on the development of clary*

sage zygotic embryos in order to develop a selective system for creating forms resistant to these stress factors in vitro. Three cultivars and 10 samples of Salvia sclarea L. differing in drought resistance were used in the studies. The effects of osmotic and low-temperature stresses were simultaneously tested in vitro. Under osmotic stress, the embryos were cultured on Murashige and Skoog medium containing 3–5% sorbitol. Modeling of cold stress was carried out in three stages with different durations: hardening at 0...4 °C; freezing with a decrease in temperature from 0 to –12...–14 °C; defrosting at 2...4 °C. After low-temperature stress, the embryos were transplanted to medium with the same sorbitol concentration and cultivated at 26 °C and illumination of 2–3 klx. It was found that as the sorbitol concentration increased to 5 % and the temperature decreased to –8...–14 °C, all analyzed parameters (frequency of embryos germination and developed seedlings, shoot and root length) decreased compared to the control. In genotypes with high drought resistance coefficients the inhibition of seedling development under the action of two stressors was much less than in unstable genotypes. The maximum correlation coefficients (from 0.696 to 0.870) were established between the field drought resistance of genotypes and the frequency of embryos germination or developed seedlings. A selective system was developed that can be used for in vitro selection or indirect assessment of S. sclarea forms with complex osmotic and low temperature resistance.

Егорова Наталья Алексеевна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией биотехнологии, ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»; 295493, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150; e-mail: yegorova.na@mail.ru.

Ставцева Ирина Викторовна, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии, ФГБУН «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»; 295493, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150; e-mail: ira563583@mail.ru.

Yegorova Natalia Alekseevna, Dr. Sc. (Biol.), head of the Laboratory of biotechnology, FSBSI “Research Institute of Agriculture of Crimea”; 150, Kievskaya str., Simferopol, 295493, Russia; e-mail: yegorova.na@mail.ru.

Stavtzeva Irina Viktorovna, Cand. Sc. (Agr.), senior researcher of the Laboratory of biotechnology, FSBSI “Research Institute of Agriculture of Crimea”; 150, Kievskaya str., Simferopol, 295493, Russia; e-mail: ira563583@mail.ru.

Дата поступления в редакцию – 02.02.2023.

Дата принятия к печати – 20.02.2023.