

УДК 633.81:57.085.2
EDN GHGGXU

Егорова Н. А., Ставцева И. В.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ ДЛЯ ОТБОРА УСТОЙЧИВЫХ К ОСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ ФОРМ ШАЛФЕЯ МУСКАТНОГО *IN VITRO*

ФГБУН «Научно исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»

Реферат. Важнейшей задачей селекции растений является создание высокопродуктивных сортов, устойчивых к абиотическим стрессовым факторам среды, и в частности, к засухе. Это касается и одного из широко распространенных на юге России эфиромасличных растений – шалфея мускатного. Для решения многих проблем селекции в настоящее время активно используются биотехнологические методы. Одним из таких приемов является клеточная селекция *in vitro*, позволяющая проводить направленный отбор генотипов с заданными признаками. Цель работы – изучение особенностей действия осмотического стресса на развитие изолированных зародышей сортов и образцов шалфея мускатного для разработки клеточной технологии создания устойчивых к этому стрессовому фактору форм *in vitro*. В исследованиях использовали сорта и образцы шалфея (*Salvia sclarea* L.), различающиеся по полевой засухоустойчивости. Эксплантами служили зрелые зиготические зародыши, которые культивировали на питательных средах Мурасиге и Скуга (МС), дополненных осмотиками (NaCl, маннит, сорбит, сахароза) в различных концентрациях. В контроле зародыши культивировали на среде МС. Показано, что культивирование зародышей трех сортов (С-785, Ай-Тодор и Тайган) на средах с введением 0,9 % NaCl, 4,0–5,0 % маннита или сорбита и 7,0 % сахарозы позволило дифференцировать сорта по устойчивости к осмотическому стрессу. В следующем опыте проведен анализ развития изолированных зародышей 10 сортов и образцов шалфея (с коэффициентами засухоустойчивости от 22,5 до 73,5 %) на среде, дополненной сублетальной концентрацией маннита (4,5 %). При этом выявлено снижение по сравнению с контролем от 1,4 до 14,5 раз всех изученных параметров – частоты прорастания зародышей и образования проростков, длины побега и корня. Максимальные коэффициенты корреляции (0,76–0,79) установлены между полевой засухоустойчивостью генотипов и частотой развития проростков на среде с добавлением маннита. Проведенные исследования показали перспективность использования разработанной селективной системы для получения или оценки *in vitro* устойчивых к абиотическому стрессу форм шалфея.

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

Для цитирования: 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. EDN: GHGGXU.

For citation: 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. EDN: GHGGXU.

Введение

Одним из наиболее распространенных, действующих на растения абиотических стрессовых факторов, является засуха. Это явление, обычно

возникающее из-за неблагоприятных метеорологических условий, приводит к почвенному и воздушному водному дефициту у растений. В связи с глобальными изменениями климата в последние десятилетия изучению действия данного лимитирующего фактора с использованием физиологических, биохимических, молекулярно-генетических методов уделяется большое внимание [1, 2]. Создание засухоустойчивых генотипов сельскохозяйственных культур, а также их оценка особенно актуальны для южных регионов России.

Для изучения действия абиотических стрессов на растения и получения устойчивых генотипов актуально использование методов культивирования *in vitro*, которые обеспечивают контролируемые условия анализа лимитирующих факторов на уровне отдельных органов, тканей и клеток [3, 4]. Клеточная селекция *in vitro*, позволяющая проводить направленный отбор генотипов с заданными признаками, основана на общих механизмах устойчивости для целых растений и изолированных клеток [2, 5]. Данный метод позволяет не только экономить время и ресурсы при создании доноров устойчивости, но и ускорить оценку селекционного материала. Однако, наряду со многими преимуществами, эта клеточная технология имеет и ряд существенных ограничений: необходимый признак должен моделироваться *in vitro*, механизмы адаптации отдельных клеток и всего организма к стрессу могут быть разными, выделенные в селективных условиях резистентные линии часто теряют морфогенетический потенциал, а растения-регенеранты могут не проявить устойчивость при дальнейшем размножении и выращивании в поле и др. [6]. Особенно это касается такого сложного признака как засухоустойчивость, который контролируют многие гены [2].

При анализе работ по клеточной селекции к абиотическим стрессам практически нельзя найти двух одинаковых схем отбора *in vitro*. Применяемые методические приемы зависят не только от стрессового фактора и степени его изученности, но и от вида растения, особенностей развития изолированных органов и индукции процессов каллусо- и морфогенеза, степени разработки биотехнологических методик. Важную роль в селекции играет выбор объекта для отбора *in vitro*. Одним из наиболее используемых является каллусная культура, которую с успехом применяли при скрининге устойчивых к абиотическим стрессовым факторам генотипов у пшеницы, сахарной свеклы, табака, люцерны, сосны, картофеля, риса, кукурузы, лаванды и др. [5, 7–12]. При этом в некоторых исследованиях отмечено преимущество применения морфогенных каллусов, которые часто проявляют большую устойчивость к стрессовым обработкам, и из которых легче получать растения-регенеранты [3, 12, 13]. Применение суспензионной культуры позволяет с большей вероятностью выделить единичные устойчивые клетки, но, так как она достаточно сложна в экспериментальных работах, этот объект используется гораздо реже [5, 8, 9]. В последние годы для отбора или оценки устойчивости *in vitro* нередко стали культивировать изолированные органы – зрелые или незрелые зародыши [8, 12, 14], микрорастения [15–17], апексы побегов [18].

Обычно при отборе засухоустойчивых генотипов применяют прямую клеточную селекцию, при которой в питательную среду вводят селективный фактор, с помощью которого моделируется действие стресса. Эффект осмотического стресса достигается при культивировании тканей или органов на средах с разными стрессовыми агентами: ионными и проникающими в клетку – NaCl, KCl [3, 7, 10, 16, 18], неионными и проникающими – сахарами: маннитом, сорбитом, сахарозой [4, 7, 9, 11] и непроникающим – высокомолекулярным (6000–10000) полиэтиленгликолем (ПЭГ) [4, 6, 14, 17]. В ряде работ исследовали действие на развитие изолированных

органов или каллусов нескольких осмотиков, например, NaCl и маннита у *Salicornia persica* [7], маннита и ПЭГ – у пшеницы [6].

Что касается длительности действия стрессового фактора, то существуют различные подходы. В одних работах исследователи использовали однократный отбор с небольшой экспозицией стрессового фактора, в частности, у кукурузы и пшеницы применили селекцию на фоне ПЭГ и NaCl с недифференцированным каллусом в течение пассажа [12]. В ряде случаев отбор проводят в течение нескольких пассажей, часто с повышением концентрации осмотика. Например, у сахарной свеклы каллусы культивировали три пассажа на питательной среде, увеличивая содержание NaCl от 1,5 до 2,5 % [9]. У березы лучший селективный эффект при дифференциации солеустойчивых клонов получен при поэтапном культивировании микропобегов на питательных средах с возрастающей концентрацией NaCl (0,2–1,0 %) и снятием селективной нагрузки после каждого пассажа [16]. Иногда используют более сложные схемы отбора со сменой объекта селекции. Например, у ячменя отбор солеустойчивых форм проводили на уровне семян, а затем полученных каллусных культур [8], а у кориандра в клеточной селекции на устойчивость к низкотемпературному стрессу вначале использовали каллусы, а затем эмбриокультуры [12].

Одним из наиболее распространенных на Юге России эфиромасличных растений является шалфей мускатный (*Salvia sclarea* L.) [19]. Ценность этой культуры определяется, прежде всего, наличием в его соцветиях эфирного масла, которое используется в парфюмерно-косметической и пищевой промышленности, в табачном производстве. Применение шалфейного масла в медицине обусловлено его противовоспалительным, противогрибковым, обезболивающим, антибактериальным, антиоксидантным, иммуномодулирующим и другими ценными свойствами [20]. В ФГБУН «НИИСХ Крыма» в разные годы созданы несколько сортов шалфея [19], тем не менее, для повышения эффективности селекции целесообразно привлечение биотехнологических методов, что было показано при создании сорта Селинж [21].

Исследования в области клеточной инженерии разных видов шалфея касаются, главным образом, оптимизации методик клонального микроразмножения для *S. sclarea*, *S. officinalis*, *S. guaranitica*, *S. chamelaeagnea*, *S. santolinifolia*, *S. nemorosa* и других видов [22–25]. Показана возможность биосинтеза некоторых вторичных метаболитов (фенольных соединений, розмариновой кислоты, склареола, компонентов эфирного масла) в культуре *in vitro* у *S. miltiorrhiza*, *S. officinalis*, *S. viridis*, *S. sclarea*, *S. fruticosa* [24–27]. Также имеются сведения о получении каллусных культур из эксплантов листьев, стебля, почек, сегментов проростка [12, 22, 28]. В ряде работ продемонстрирована морфогенетическая способность каллусов и определены условия получения растений-регенерантов [12, 28–30].

Несмотря на то, что шалфей является засухоустойчивым растением, степень его толерантности к данному стрессовому фактору ограничена, поэтому получение устойчивых генотипов весьма перспективно при создании высокоурожайных сортов. Исследований по влиянию осмотического стресса на культуру изолированных тканей и органов шалфея крайне мало. Hannibal T. Musarurwa et al. при изучении возможности изменения компонентного состава эфирного масла у культивируемых *in vitro* микрорастений *Salvia stenophylla* (Burch. ex Benth.) варьировали содержание в питательной среде гормонов и макроэлементов, а также добавляли осмотики. При этом невысокие концентрации ПЭГ-6000 (5 %) и сорбита (2 %) привели к изменению содержания многих летучих соединений и отрицательно влияли на рост, состояние микрорастений и их укоренение *in vitro* [31]. Проведены

работы по получению трансгенных растений лекарственного вида *Salvia miltiorrhiza* с целью выяснения механизмов стрессоустойчивости и получения толерантных к засухе генотипов. Так, трансгенные растения *S. miltiorrhiza* с перенесенным из пшеницы геном TaLEA1 продемонстрировали лучший рост на питательных средах с добавлением 1 % NaCl и 8 % ПЭГ-6000, что показало важную роль этого гена в повышении соле- и засухоустойчивости шалфея [32]. Судя по доступной литературе, исследования по клеточной селекции у *S. sclarea* ограничены нашими предыдущими публикациями по разработке методики селекции на устойчивость к осмотическому стрессу, в которых рекомендовался двухэтапный отбор *in vitro* [33].

Цель исследований – изучение особенностей действия осмотического стресса на развитие изолированных зародышей сортов и образцов шалфея мускатного для разработки клеточной технологии создания устойчивых к этому стрессовому фактору форм *in vitro*.

Материалы и методы исследований

В исследованиях использовали сорта и образцы шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.): сорта С-785, Ай-Тодор, Тайган, а также семенное потомство регенерантов, полученных ранее из каллусов, сорта С-785 (R₃-5, R₃-4-9, R₂-9-38), Ай-Тодор (R₂-104, R₃-2-15, R₃-3-1) и Тайган (R₃-101), также образцов, выделенных при низкотемпературном стрессе в эмбриокультуре *in vitro* (Т-09-1, Т-09-4, А-09-41, А-09-42). Эксплантами служили зиготические зародыши, выделенные из зрелых семян. В работе использовали общепринятые в биотехнологии методы культуры органов и тканей растений [34], а также методы, разработанные нами ранее для шалфея [33].

Для введения в культуру *in vitro* семена предварительно стерилизовали в течение 1 мин в 50,0 % растворе препарата «Брадофен» 10Н (ФЛОРИН АО, Венгрия) и трижды промывали автоклавированной дистиллированной водой. Асептические работы проводили в условиях ламинарного бокса БАВнп-01-«Ламинар-С»-1,2 (Россия). Зародыши выделяли под стереоскопическим микроскопом МБС-10 (ЛОМО, Россия) и помещали на питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) [34]. В контроле использовали безгормональную среду МС, а в опытных вариантах для моделирования осмотического стресса в среды добавляли NaCl, маннит, сорбит, сахарозу (АО «Вектон», Россия) в различных концентрациях (от 0,2 до 9,0 %). Культивирование зародышей и развивающихся микрорастений проводили в течение 40–50 сут в пробирках с 10 мл агаризованной питательной среды при 26 ± 2 °С, относительной влажности воздуха 70 %, освещенности 2–3 клк с 16 часовым фотопериодом.

При получении устойчивых к низкотемпературному стрессу образцов изолированные зародыши в контроле культивировали на безгормональной среде МС в культуральной комнате при выше описанном режиме. Моделирование холодного стресса проводили в 3 этапа: 1) закаливание при температуре 2–4 °С, 12 сут; 2) промораживание – при снижении температуры от 0 до –14 °С с различной экспозицией (1 вариант: от 0 до –6...–8 °С, 3 сут; 2 вариант: от 0 до –8...–10 °С, 5 сут; 3 вариант: от 0 до –8...–10 °С, 7 сут; 4 вариант: от 0 до –12...–14 °С, 7 сут); 3) оттаивание при 2–4 °С, 2 сут. После холодного стресса зародыши пересаживали на свежую питательную среду МС и переносили в культуральную комнату.

Анализ развития культивируемых зародышей проводили через 10 и 30 сут после введения *in vitro*. На 10-е сутки культивирования определяли частоту прорастания зародышей (ЧПЗ, %), а на 30-е сутки – частоту развившихся проростков

(ЧРП, %), длину побега и корня. ЧРП определяли, как отношение числа полноценных проростков к общему числу эксплантированных зародышей.

Полученные микрорастения с корнями адаптировали *ex vitro* в смеси торфа и земли (1:1). Подростшие растения с шестью-восемью листьями пересаживали в вазоны со смесью почвы и торфа, а затем – в полевые условия, в питомник исходного материала, где выращивали в научном севообороте отдела эфиромасличных и лекарственных культур ФГБУН «Научно исследовательский институт сельского хозяйства Крыма» (Белогорский район, п. Крымская Роза) в течение двух лет до получения семян. Коэффициент засухоустойчивости у растений сортов и образцов в полевых условиях (2016–2018 гг.) рассчитывали по показателям водного обмена [35].

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

Ранее нами была разработана методика двухэтапного отбора в эмбриокультуре *in vitro* шалфея форм, устойчивых к действию осмотического стресса, при использовании которой получены перспективные образцы [12]. С целью дальнейшего совершенствования этой методики и оптимизации селективных агентов изучена эффективность отбора *in vitro* устойчивых к засухе форм шалфея при использовании четырех типов осмотически активных веществ при разных концентрациях – NaCl (0,7–0,9 %), маннита (4,0–6,0 %), сорбита (4,0–6,0 %) и сахарозы (6,0–8,0 %). При выборе в данном опыте концентрации селективных агентов учитывали наши предварительные исследования и использовали дозы, близкие к сублетальным. Зиготические зародыши выделяли из семян сортов С-785, Ай-Тодор и Тайган, различающихся по полевой засухоустойчивости (коэффициенты засухоустойчивости соответственно 27,1; 42,0 и 59,9 %) [12]. Основным критерием оценки реакции изучаемых генотипов на действие осмотического стресса, представленным на рисунке 1, была частота образования проростков (% к контролю).

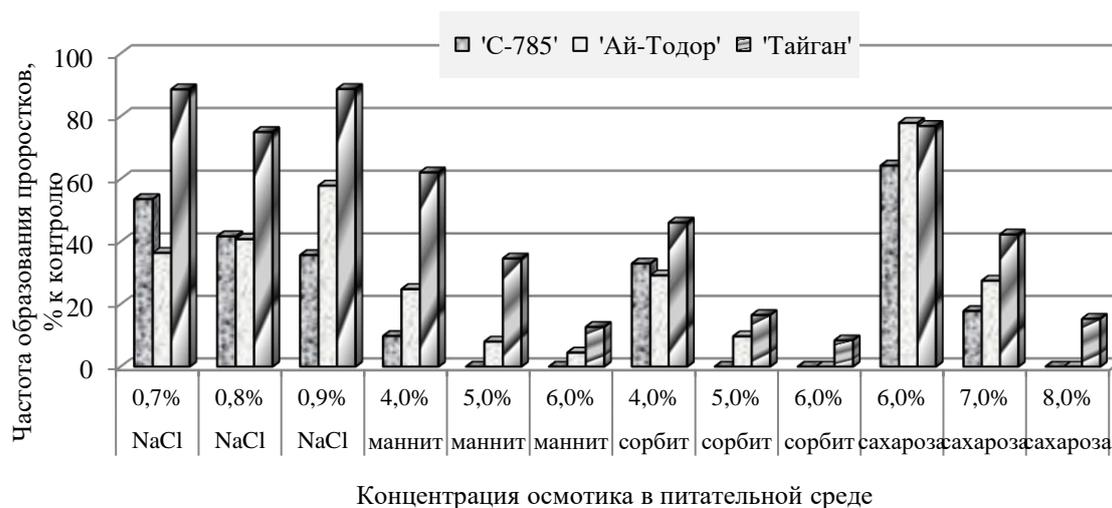


Рисунок 1 – Частота образования проростков (% к контролю) при культивировании изолированных зародышей шалфея трех сортов в зависимости от типа и концентрации осмотика в питательной среде МС

Как видно из представленных данных, во всех вариантах опыта на средах с добавлением осмотиков отмечено уменьшение частоты образования проростков по сравнению с контролем. Снижение данного параметра зависело от типа соединения, используемого в качестве селективного агента, и сорта. Сравнение изучаемых сортов показало, что у наиболее засухоустойчивого сорта Тайган частота прорастания зародышей почти во всех вариантах опыта была выше по сравнению с 'С-785' и 'Ай-Тодор'. Степень развития проростков (длина побега и корня) на средах с разными осмотиками также были выше у сорта Тайган (рисунок 2).

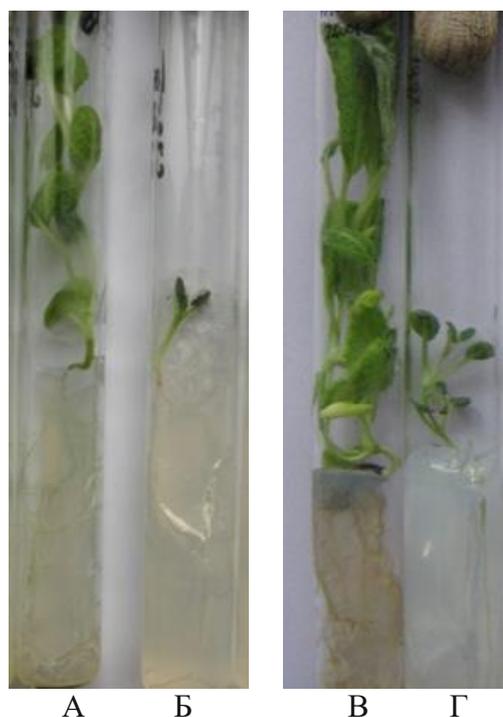


Рисунок 2 – Развитие проростков шалфея сорта С-785 из изолированных зародышей на питательных средах МС (А) и МС с 4,0 % маннита (Б) и сорта Тайган на среде МС (В) и МС с 4,0 % маннита (Г) (40 сут культивирования)

Культивирование зародышей на средах с 0,9 % NaCl, 4,0–6,0 % маннита или сорбита и 7,0–8,0 % сахарозы позволяет дифференцировать генотипы по устойчивости к действию изученных осмотиков. Так, на питательной среде МС с добавлением 0,9 % NaCl у сорта Тайган частота образования проростков была в 2,3 и 1,3 раза выше, чем у С-785 и Ай-Тодор соответственно. На средах с наибольшими в данном опыте концентрациями осмотиков (6,0 % сорбита и маннита или 8,0 % сахарозы) проростки были получены в основном у сорта Тайган. Все проанализированные осмотики при определенных концентрациях позволяли выявить различия между изучаемыми генотипами: частота образования проростков у сорта, более устойчивого к засухе, была выше, чем у менее засухоустойчивого. Тем не менее, более четкие различия отмечены при добавлении в питательную среду 4,0 % маннита. Анализируемый параметр у сорта Тайган в такой селективной системе был выше, чем в эмбриокультуре у С-785 и Ай-Тодор в 2,5 и 6,3 раза соответственно. Поэтому с целью отбора (или оценки) засухоустойчивых форм и лучшей дифференциации генотипов шалфея более перспективно использовать маннит (4,0–5,0 %), хотя можно применять и сорбит. Как уже отмечено выше, в исследованиях по клеточной селекции используют различные осмотически

активные вещества, при этом их концентрации в значительной степени зависят от вида растения и применяемого объекта селекции. О. В. Дубровная при проведении клеточной селекции пшеницы на устойчивость к водному дефициту *in vitro* сравнивала действие ПЭГ и маннита. При этом установлено, что селективная система с введением маннита была эффективнее, так как обеспечивала более полную элиминацию чувствительных клеток и высокую жизнеспособность развивающихся растений-регенерантов [6].

При моделировании солевого стресса для каллусных культур сахарной свеклы использовали концентрацию NaCl до 2,5 % [9], у каллусов сосны [10] и у микроклонов березы – до 1,0 % [16], а у ячменя – 2,0 % [8]. У герани эфиромасличной сублетальная концентрация NaCl для неморфогенного каллуса составила 0,75 %, а для морфогенного – 1,0 % [12]. У лаванды для отбора устойчивых к осмотическому стрессу каллусных линий целесообразно добавлять в питательную среду 8,0–10,0 % маннита [12]. В то же время каллусы двух видов галофитов *Salicornia persica* и *S. europaea* культивировали на средах, содержащих до 3,5 % NaCl или до 18,2 % маннита [7].

В следующем эксперименте изучали действие осмотического стресса с привлечением разных генотипов шалфея, различающихся по засухоустойчивости. При этом исследовали развитие зиготических зародышей, изолированных из семян трех сортов (С-785, Ай-Тодор и Тайган) и семи регенерантов R₂–R₃ (R₃-5, R₃-4-9, R₂-9-38, R₂-104, R₃-2-15, R₃-3-1, R₃-101), полученных ранее в каллусной культуре этих сортов. В полевых условиях для растений изучаемых генотипов определены коэффициенты засухоустойчивости, которые варьировали от 22,5 (R₃-3-1) до 73,5 % у сорта Тайган, который обладал максимальной (из изученных генотипов) устойчивостью к этому стрессу. Для имитации засухи в условиях *in vitro* в безгормональную питательную среду МС добавляли маннит в концентрации 4,5 %, который на основании предыдущего опыта обеспечивал сублетальное действие осмотического стресса. Развитие изолированных зародышей оценивали по нескольким параметрам – частоте прорастания зародышей (таблица 1), частоте образования проростков (таблица 2), длине побега (таблица 3) и длине корня (таблица 4). Для более адекватной оценки эти параметры также приведены в % к контролю (при культивировании зародышей на среде МС без маннита).

Таблица 1 – Влияние генотипа и маннита в питательной среде на частоту прорастания зародышей в эмбриокультуре *in vitro* шалфея мускатного

Сорт, образец	Коэффициент засухоустойчивости, %	Частота прорастания зародышей, %		Частота прорастания зародышей, % к контролю
		среда МС	среда МС + 4,5 % маннита	
С-785	29,5 ± 0,3	75,0 ± 3,8	12,5 ± 0,8	16,7
R ₃ -5	28,5 ± 0,9	50,0 ± 1,5	7,9 ± 1,2	15,8
R ₃ -4-9	67,1 ± 0,2	63,3 ± 8,2	37,9 ± 2,5	59,9
R ₂ -9-38	55,8 ± 0,9	66,7 ± 4,6	23,3 ± 1,8	34,9
Ай-Тодор	55,4 ± 0,6	87,5 ± 2,6	24,3 ± 3,5	27,8
R ₂ -104	35,4 ± 1,9	100,0 ± 0,0	30,0 ± 1,4	30,0
R ₃ -2-15	29,6 ± 0,8	48,3 ± 3,6	20,0 ± 1,2	41,4
R ₃ -3-1	22,5 ± 4,3	66,7 ± 8,7	23,3 ± 2,4	34,9
Тайган	73,5 ± 3,1	95,6 ± 5,2	70,0 ± 6,1	73,2
R ₃ -101	39,9 ± 0,7	83,3 ± 3,7	20,0 ± 2,6	24,0
r		0,38	0,77*	0,74*

Примечание. * достоверные значения коэффициента корреляции при $p \leq 0,05$.

Таблица 2 – Влияние генотипа и маннита в питательной среде на частоту образования проростков в эмбриокультуре *in vitro* шалфея мускатного

Сорт, образец	Коэффициент засухоустойчивости, %	Частота образования проростков, %		Частота образования проростков, % к контролю
		среда МС	среда МС + 4,5 % маннита	
С-785	29,5 ± 0,3	72,4 ± 5,6	6,3 ± 1,1	8,7
R ₃ -5	28,5 ± 0,9	45,0 ± 3,2	3,1 ± 0,2	6,9
R ₃ -4-9	67,1 ± 0,2	54,5 ± 6,4	29,8 ± 1,0	54,7
R ₂ -9-38	55,8 ± 0,9	52,6 ± 5,0	18,2 ± 1,2	34,6
Ай-Тодор	55,4 ± 0,6	76,4 ± 2,4	17,4 ± 0,9	22,8
R ₂ -104	35,4 ± 1,9	88,9 ± 9,6	22,3 ± 1,6	25,1
R ₃ -2-15	29,6 ± 0,8	36,3 ± 2,5	11,2 ± 1,1	30,8
R ₃ -3-1	22,5 ± 4,3	54,2 ± 5,5	17,8 ± 1,6	32,8
Тайган	73,5 ± 3,1	86,4 ± 6,8	52,6 ± 3,5	60,9
R ₃ -101	39,9 ± 0,7	80,8 ± 6,5	18,4 ± 1,3	22,8
г		0,32	0,79*	0,76*

Примечание. * достоверные значения коэффициента корреляции при $p \leq 0,05$.

Таблица 3 – Влияние генотипа и маннита в питательной среде на длину побегов в эмбриокультуре *in vitro* шалфея мускатного

Сорт, образец	Коэффициент засухоустойчивости, %	Длина побега, мм		Длина побега, % к контролю
		среда МС	среда МС + 4,5 % маннита	
С-785	29,5 ± 0,3	37,4 ± 3,5	4,1 ± 0,3	11,0
R ₃ -5	28,5 ± 0,9	33,7 ± 2,7	3,2 ± 0,2	9,5
R ₃ -4-9	67,1 ± 0,2	34,2 ± 3,2	3,7 ± 0,2	10,8
R ₂ -9-38	55,8 ± 0,9	40,7 ± 3,8	4,1 ± 0,3	10,1
Ай-Тодор	55,4 ± 0,6	42,3 ± 4,0	4,5 ± 0,3	10,6
R ₂ -104	35,4 ± 1,9	40,9 ± 3,4	4,2 ± 0,3	10,3
R ₃ -2-15	29,6 ± 0,8	42,5 ± 4,3	4,4 ± 0,4	10,4
R ₃ -3-1	22,5 ± 4,3	34,5 ± 2,7	3,2 ± 0,3	9,3
Тайган	73,5 ± 3,1	41,8 ± 3,5	4,9 ± 0,4	11,7
R ₃ -101	39,9 ± 0,7	43,5 ± 3,9	4,4 ± 0,3	10,1
г		0,24	0,51	0,68*

Примечание. * достоверные значения коэффициента корреляции при $p \leq 0,05$.

Таблица 4 – Влияние генотипа и маннита в питательной среде на длину корня проростков в эмбриокультуре *in vitro* шалфея мускатного

Сорт, образец	Коэффициент засухоустойчивости, %	Длина корня проростка, мм		Длина корня проростка, % к контролю
		среда МС	среда МС + 4,5 % маннита	
С-785	29,5 ± 0,3	24,6 ± 1,5	5,5 ± 1,4	22,4
R ₃ -5	28,5 ± 0,9	18,2 ± 1,2	5,0 ± 0,8	27,5
R ₃ -4-9	67,1 ± 0,2	23,6 ± 2,8	7,5 ± 1,0	31,8
R ₂ -9-38	55,8 ± 0,9	20,5 ± 1,5	5,1 ± 1,2	24,9
Ай-Тодор	55,4 ± 0,6	20,4 ± 2,2	4,8 ± 1,9	23,5
R ₂ -104	35,4 ± 1,9	25,8 ± 3,2	6,0 ± 1,3	24,2
R ₃ -2-15	29,6 ± 0,8	24,2 ± 2,1	5,5 ± 1,6	22,7
R ₃ -3-1	22,5 ± 4,3	18,8 ± 1,5	3,0 ± 0,4	15,9
Тайган	73,5 ± 3,1	28,6 ± 1,8	8,2 ± 0,5	28,7
R ₃ -101	39,9 ± 0,7	24,4 ± 1,7	5,0 ± 1,0	20,5
г		0,40	0,74*	0,70*

Примечание. * достоверные значения коэффициента корреляции при $p \leq 0,05$.

Как следует из полученных данных, введение в питательную среду маннита привело к существенному снижению всех изученных показателей по сравнению с контролем. Так, частота прорастания зародышей при осмотическом стрессе снизилась в 1,4–6,3 раз и варьировала в зависимости от генотипа от 7,9 до 70,0 %. По количеству образующихся проростков (от 3,1 до 52,6 %) отмечено еще большее снижение (в 1,6–14,5 раз) при сравнении с развитием изолированных зародышей на питательной среде без введения маннита.

Развивающиеся из зародышей проростки шалфея в селективных условиях существенно отличались от контрольных не только более мелкими размерами, но и морфологией. В частности, у них отмечены более мелкие листья, а у некоторых – слабое пожелтение листовых пластинок. При анализе длины побега у проростков выявлено значительное снижение этого параметра по сравнению с контрольными вариантами в 8,5–10,8 раз. Однако у разных сортов и образцов длина побега снижалась почти одинаково и составила 9,3–11,7 % от контроля. Угнетение развития корня у проростков при действии стресса *in vitro* проявилось в меньшей степени. У разных генотипов длина основного корня была меньше, чем в контрольном варианте в 3,1–6,3 раз и изменялась у сортов и образцов от 3,0 до 8,2 мм.

Особый интерес в данном эксперименте представляет сравнительный анализ развития изолированных зародышей у разных сортов и образцов шалфея, различающихся по степени полевой засухоустойчивости. Наибольшие коэффициенты корреляции выявлены между степенью засухоустойчивости генотипов и частотой прорастания зародышей или развития проростков на среде с добавлением осмотика (а также и в % к контролю) – от 0,74 до 0,79 (см. таблицы 1, 2). Достаточно высокая достоверная зависимость отмечена между коэффициентами засухоустойчивости и длиной корня проростков в эмбриокультуре – 0,70–0,74 (см. таблицу 4). Связь между длиной побегов у развившихся из изолированных зародышей проростков и засухоустойчивостью была гораздо слабее. Достоверный коэффициент корреляции отмечен только между длиной побега на среде с введением маннита в % к контролю (0,68).

Таким образом, чем выше коэффициент засухоустойчивости у изученных сортов и образцов в полевых условиях, тем лучше развивались зародыши в селективных условиях *in vitro*. Установленные корреляционные связи не только являются основой использования эмбриокультуры для проведения отбора форм, устойчивых к засухе, но и позволяют косвенно оценивать селекционный материал шалфея на засухоустойчивость. При этом наиболее надежным параметром оценки степени устойчивости в эмбриокультуре, на наш взгляд, является частота развития проростков на среде с добавлением сублетальной концентрации осмотика. Хотя остальные морфометрические параметры также можно использовать для дополнительной характеристики изолированных культур.

В последние годы появляется все больше публикаций, свидетельствующих о возможности получения с использованием клеточной селекции *in vitro* генотипов, устойчивых к нескольким стрессовым факторам окружающей среды [6]. Такие исследования основаны на том, что формирование у растений устойчивости к ряду абиотических стрессов (осмотическому, солевому, температурному) на уровне тканей и клеток имеет некоторые сходные механизмы [1, 2, 9]. Поэтому отбор в условиях *in vitro* на резистентность к одному неблагоприятному фактору может приводить к повышению устойчивости и к другому. Поэтому представляет интерес изучение возможности получения при отборе *in vitro* форм шалфея, устойчивых к нескольким абиотическим стрессам. Ранее, в эмбриокультуре шалфея мускатного при проведении селекции на зимостойкость при сублетальной низкотемпературной

обработке (3 вариант, с промораживанием в течение 7 сут от 0 до $-8...-10$ °С) (рисунок 3) были отобраны несколько устойчивых проростков.



Рисунок 3 – Влияние низкотемпературного стресса на частоту образования проростков (% к контролю) в эмбриокультуре *in vitro* трех сортов шалфея мускатного

Примечание. Варианты стресса указаны в материалах.

Отобранные в этом эксперименте температуроустойчивые формы были выращены в полевых условиях, и из них на второй год вегетации получены семена. Выделенные из семян зиготические зародыши культивировали на питательных средах МС, содержащих осмотики (4,5 % маннита или сорбита). В представленном опыте приводятся данные о четырех образцах, полученных в эмбриокультуре у сортов Тайган (Т-09-1 и Т-09-4) и Ай-Тодор (А-09-41 и А-09-42). На рисунке 4 приведены данные по основному параметру, по которому проводили оценку этих образцов на устойчивость к осмотическому стрессу *in vitro*, – частоте образования проростков (в % к контролю на среде МС без осмотика).

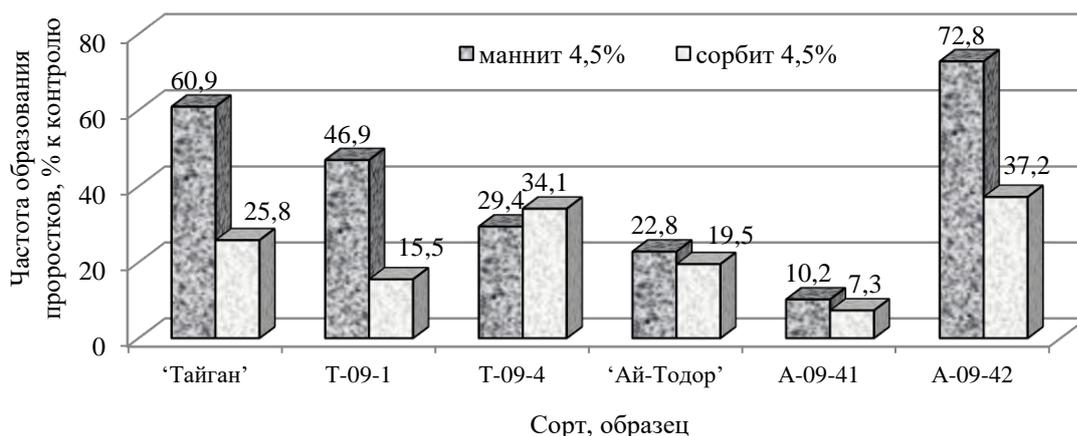


Рисунок 4 – Влияние осмотика в питательной среде на частоту образования проростков (% к контролю) в эмбриокультуре у исходных сортов шалфея мускатного и регенерантов, полученных после низкотемпературного стресса *in vitro*

Как следует из полученных данных, по этому показателю образец А-09-42 значительно превысил исходный сорт при культивировании зародышей на селективном фоне с введением осмотиков. Так, на средах МС с добавлением 4,5 %

маннита и сорбита частота образования проростков (в % к контролю) у него была соответственно в 3,2 и в 1,9 раз выше, чем у исходного сорта Ай-Тодор. Что касается двух устойчивых к температурному стрессу образцов, полученных у сорта Тайган, то только Т-09-4 на среде с добавлением сорбита незначительно (в 1,3 раза) превысил сорт по частоте формирования проростков. Остальные два образца уступали исходным сортам по устойчивости во всех вариантах опыта. Как видно из данного опыта, только один из четырех изученных образцов шалфея, отобранных ранее в эмбриокультуре при действии низкой отрицательной температуры, проявил устойчивость к осмотическому стрессу *in vitro*.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о возможности использования для отбора устойчивых к осмотическому стрессу форм шалфея *in vitro* селективной системы при культивировании изолированных зародышей на питательной среде МС с введением 4,0–4,5 % маннита или сорбита. При этом необходимо учитывать, что не все отобранные при клеточной селекции формы проявляют устойчивость в условиях *in vivo*, на что указывают и другие исследователи [1, 2, 4, 9]. Следует отметить, что у шалфея эффективность биотехнологии отбора засухоустойчивых генотипов целесообразно повысить, используя ранее разработанную методику клонального микроразмножения [36]. В этом случае отобранные в эмбриокультуре *in vitro* на селективном фоне единичные проростки можно быстро размножить, получив больше растений для последующих полевых испытаний. Особенно это важно, если проростки плохо развиты или имеют слабую корневую систему и поэтому могут не прижиться при адаптации *ex vitro*.

Выявленная высокая корреляция между некоторыми параметрами развития зародышей шалфея *in vitro* и полевой засухоустойчивостью свидетельствует о том, что культивирование зародышей может быть использовано также и для быстрой косвенной оценки коллекционного материала или селекционных образцов на засухоустойчивость. Такой биотехнологический метод оценки разрабатывается для ряда сельскохозяйственных видов растений, в частности, для пшеницы, ячменя, кукурузы, сахарной свеклы и др. [2, 4, 6, 9, 14].

Значительный интерес вызывает выявленная в нашей работе возможность получения при селекции *in vitro* на устойчивость к низкотемпературному стрессу форм шалфея, устойчивых и к другому абиотическому – осмотическому стрессу. И хотя частота образования таких образцов с комплексной устойчивостью может быть невысокой, тем не менее, работы в этом направлении чрезвычайно перспективны. Об этом свидетельствуют и литературные данные для других видов растений. Так, получены каллусные линии и регенеранты кормовой свеклы, устойчивые к токсину возбудителя бактериоза и к низким температурам [9]. При анализе регенерантов ячменя, отобранных на селективных средах с ионами алюминия, водорода и ПЭГ, выявлены генотипы, устойчивые не только к абиотическим стрессам (токсичности алюминия и засухе), но и к поражению фитопатогенными грибами [37]. У кукурузы проведение клеточной селекции на среде с добавлением ПЭГ позволило получить регенеранты, резистентные не только к засухе, но и засолению и низкой температуре [6].

Полученные нами данные показали перспективность использования приемов клеточной селекции для получения или оценки в условиях *in vitro* устойчивых к абиотическому стрессу форм шалфея, что может повысить эффективность селекционного процесса этого ценного эфиромасличного и лекарственного растения.

Выводы

В работе проанализированы особенности влияния осмотического стресса на развитие изолированных зародышей *in vitro* у сортов и образцов шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.), различающихся по полевой засухоустойчивости. Показано, что культивирование зрелых зиготических зародышей трех сортов (С-785, Ай-Тодор и Тайган) на питательных средах Мурасиге и Скуга с введением 0,9 % NaCl, 4,0–5,0 % маннита или сорбита и 7,0 % сахарозы позволяло дифференцировать сорта по устойчивости к осмотическому стрессу. Анализ развития в условиях *in vitro* зародышей 10 сортов и образцов шалфея (с коэффициентами полевой засухоустойчивости от 22,5 до 73,5 %) на среде МС с добавлением сублетальной концентрации маннита (4,5 %) выявил снижение всех изученных параметров (частоты прорастания зародышей и образования проростков, длины побега и корня) по сравнению с контролем (среда МС без осмотика) от 1,4 до 14,5 раз. Максимальные коэффициенты корреляции (0,76–0,79) отмечены между полевой засухоустойчивостью генотипов шалфея и частотой развития проростков на среде с добавлением осмотика. При культивировании зародышей четырех отобранных ранее при низкотемпературном стрессе форм шалфея на среде МС с введением маннита или сорбита показано, что один образец проявил устойчивость к осмотическому стрессу. Проведенные исследования показали перспективность использования разработанной селективной системы для получения или оценки *in vitro* устойчивых к абиотическому стрессу форм шалфея.

Литература

1. Zia Ur Rahman Farooqi, Muhammad Ashar Ayub, Muhammad Zia ur Rehman, Muhammad Irfan Sohail, Muhammad Usman, Hinnan Khalid, Komal Naz. Regulation of drought stress in plants // In book: Plant life under changing environment: responses and management. Chap. 4. Ed. by Tripathi D. K. Academic Press (Elsevier), 2020. P. 77–104. DOI: 10.1016/C2018-1-02300-8.
2. Hanaka A., Majewska M., Jaroszuk-Scisel J. Study of the influence of abiotic and biotic stress factors on horticultural plants // Horticulturae. 2022. Vol. 8 (1). 6. DOI: 10.3390/horticulturae8010006.
3. Arzani A. Improving salinity tolerance in crop plants: a biotechnological view // In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant. 2008. Vol. 44. No. 5. P. 373–383. DOI: 10.1007/s11627-008-9157-7.
4. Пикало С., Демидов О., Юрченко Т., Хоменко С., Гуменюк О., Харченко М., Прокопик Н. Методи оцінки посухостійкості селекційного матеріалу пшениці // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2020. Вип. 82. С. 63–79. DOI: 10.30970/vlubs.2020.82.05.
5. Калашникова Е. А. Клеточная инженерия растений. М.: Юрайт, 2020. 333 с.
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. Torabi S., Niknam V. Effects of iso-osmotic concentrations of NaCl and mannitol on some metabolic activity in calluses of two *Salicornia* species // In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant. 2011. Vol. 47. P. 734–742. DOI: 10.1007/s11627-011-9371-6.
8. Игнатова С. А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. Одеса: Астропринт, 2011. 224 с.
9. Дубровна О. В., Чугункова Т. В., Бавол А. В., Лялько І. І. Біотехнологічні та цитогенетичні основи створення рослин, стійких до стресів. К.: Логос, 2012. 428 с.
10. Аминова Е. Ю., Гуреев А. П., Табацкая Т. М., Машкина О. С., Попов В. Н. Генотипическая изменчивость *Pinus sylvestris* L. по признаку засухоустойчивости // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. Т. 23. № 1. С. 15–23. DOI: 10.18699/VJ19.456.
11. Круглова Н. Н., Сельдмирова 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. 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.
13. Matheka J. M., Magiri E., Rasha A. O., Machuka J. *In vitro* selection and characterization of drought tolerant somaclones of tropical maize (*Zea mays* L.) // Biotechnology (Faisalabad). 2008. Vol. 7. No. 4. P. 641–650. DOI: 10.3923/biotech.2008.641.650.

14. Круглова Н. Н., Сельдиминова 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.
15. 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.
16. 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. Art. No. 04013. DOI: 10.1051/e3sconf/202022404013.
17. Simsek Ö. Effect of drought stress in *in vitro* and drought-related gene expression in *Carrizo citrange* // Fresenius Environmental Bulletin. 2018. Vol. 27. No. 12A. P. 9167–9171.
18. Sajid Z. A., Aftab F. Amelioration of salinity tolerance in *Solanum tuberosum* L. by exogenous application of ascorbic acid // In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 2009. Vol. 45. P.540–549. DOI: 10.1007/s11627-009-9252-4.
19. Паштецкий В.С., Невкрытая Н.В., Мишнев А.В., Назаренко Л.Г. Эфиромасличная отрасль Крыма. Вчера, сегодня, завтра. Симферополь: ИТ «Ариал», 2018. 320 с.
20. 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.
21. 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.
22. Kintzios S. E. *Salvia* spp.: tissue culture, somatic embryogenesis, micropropagation and biotransformation // In book: Sage: The Genus *Salvia*. Ed. by Kintzios S. E. CRC Press. 2000. P. 241–250.
23. 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.
24. 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.
25. Егорова Н. А. Некоторые аспекты биотехнологии эфиромасличных растений: микроклональное размножение, синтез продуктов вторичного метаболизма *in vitro* // Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46. № 3. С.187–201.
26. Wu Ch.-F. Karioti A., Rohr D., Bilia A.R., Efferth T. Production of rosmarinic acid and salvianolic acid B from callus culture of *Salvia miltiorrhiza* with cytotoxicity towards acute lymphoblastic leukemia cells // Food Chemistry. 2016. Vol. 201. No. 15. P. 292–297. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.01.054.
27. Grzegorzczak-Karolak I. Optimization of culture conditions and cultivation phase for the growth of *Salvia viridis* transformed roots and polyphenolic compound production // Plant Cell Tiss Organ Cult. 2020. Vol. 142. P. 571–581. DOI: 10.1007/s11240-020-01883-6.
28. Liu W., Chilcott C. E., Reich R. C., Hellmann G. M. Regeneration of *Salvia sclarea* via organogenesis // In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 2000. Vol. 36. No. 3. P. 201–206. DOI: 10.1007/s11627-000-0037-z.
29. Tawfik A. A., Mohamed M. F. Regeneration of *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/s11627-006-9002-0.
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 20.02.2022).
33. Ставцева И. В., Егорова Н. А. Культура изолированных зародышей шалфея и ее использование в селекции. Методические рекомендации. Симферополь, ИЭЛР НААНУ, 2011. 20 с.
34. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии

и биохимии растений. К.: Наукова думка, 1980. 488 с.

35. Моргунов 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.

36. Егорова Н. А., Ставцева И. В., Митрофанова И. В. Морфогенез и клональное микроразмножение *Salvia sclarea* L. *in vitro* // Труды Никитского ботанического сада. 2011. Т. 133. С. 41–53.

37. 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.

References

1. Zia Ur Rahman Farooqi, Muhammad Ashar Ayub, Muhammad Zia ur Rehman, Muhammad Irfan Sohail, Muhammad Usman, Hinnan Khalid, Komal Naz Regulation of drought stress in plants // In book: Plant life under changing environment: responses and management. Chap. 4. Ed. by Tripathi D. K. Academic Press (Elsevier), 2020. P. 77–104. DOI: 10.1016/C2018-1-02300-8.

2. Hanaka A., Majewska M., Jaroszuk-Sciseł J. Study of the influence of abiotic and biotic stress factors on horticultural plants // Horticulturae. 2022. Vol. 8 (1). No. 6. DOI: 10.3390/horticulturae8010006.

3. Arzani A. Improving salinity tolerance in crop plants: a biotechnological view // In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant. 2008. Vol. 44. No. 5. P. 373–383. DOI: 10.1007/s11627-008-9157-7.

4. 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.

5. Kalashnikova E. A. Cell engineering of plants. Moscow: “Yurayt”, 2020. 333 p.

6. Dubrovnyaya O. V. *In vitro* selection of wheat for resistance to abiotic stress factors // Физиология растений і генетика (Plant physiology and genetics). 2017. Vol. 49. No. 4. P. 279–292. DOI: 10.15407/frg2017.04.279.

7. Torabi S., Niknam V. Effects of iso-osmotic concentrations of NaCl and mannitol on some metabolic activity in calluses of two *Salicornia* species // In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant. 2011. Vol. 47. P. 734–742. DOI: 10.1007/s11627-011-9371-6.

8. 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.

9. Dubrovna O. V., Chugunkova T. V., Bovol A. V., Lyalko I. I. Biotechnological and cytogenetic basis for creating stress-resistant plants. Kiev: Logos, 2012. 428 p.

10. Amineva E. Yu., Gureev A. P., Tabatskaya T. M., Mashkina O. S., Popov V. N. Genotypic variability of *Pinus sylvestris* L. on the drought-resistance attribute // Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii [Vavilov Journal of Genetics and Breeding]. 2019. Vol. 23 (1). P. 15–23. DOI: 10.18699/VJ19.456.

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. Yegorova N. A. Biotechnology of essential oil plants: creation of new forms and micropropagation *in vitro*. Simferopol: Publishing House “Autograph”, 2021. 315 p. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-978-5-6045452-9-4.

13. Matheka J. M., Magiri E., Rasha A. O., Machuka J. *In vitro* selection and characterization of drought tolerant somaclones of tropical maize (*Zea mays* L.) // Biotechnology (Faisalabad). 2008. Vol. 7. No. 4. P. 641–650. DOI: 10.3923/biotech.2008.641.650.

14. 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.

15. 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.

16. 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. Art. No. 04013. DOI: 10.1051/e3sconf/202022404013.

17. Simsek Ö. Effect of drought stress in *in vitro* and drought-related gene expression in *Carrizo citrange* // Fresenius Environmental Bulletin. 2018. Vol. 27. No. 12A. P. 9167–9171.

18. Sajid Z. A., Aftab F. Amelioration of salinity tolerance in *Solanum tuberosum* L. by exogenous application of ascorbic acid // In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant. 2009. Vol. 45. P. 540–549. DOI: 10.1007/s11627-009-9252-4.

19. Pashtetskii V. S., Nevkrytaya N. V., Mishnev A. V., Nazarenko L. G. Essential oil industry in the Crimea. Yesterday, today, tomorrow. Simferopol: Publishing house "Arial", 2018. 320 p.
20. 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.
21. 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.
22. Kintzios S. E. *Salvia* spp.: tissue culture, somatic embryogenesis, micropropagation and biotransformation // In book: Sage: The Genus *Salvia* // Ed. by Kintzios S. E. CRC Press. 2000. P. 241–250.
23. 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.
24. Grigoriadou K., Trikka 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.
25. Yegorova N.A. Some aspects of essential oil plants biotechnology: microclonal propagation, synthesis of secondary metabolites *in vitro* // Plant Physiology and Genetics (Fiziol. rast. genet.). 2014. Vol.46. No. 3. P.187–201.
26. Wu Ch.-F., Karioti A., Rohr D., Bilia A.R., Efferth T. Production of rosmarinic acid and salvianolic acid B from callus culture of *Salvia miltiorrhiza* with cytotoxicity towards acute lymphoblastic leukemia cells // Food Chemistry. 2016. Vol. 201. No. 15. P. 292–297. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.01.054.
27. Grzegorzczak-Karolak I. Optimization of culture conditions and cultivation phase for the growth of *Salvia viridis* transformed roots and polyphenolic compound production // Plant Cell Tiss Organ Cult. 2020. Vol. 142. P. 571–581. DOI: 10.1007/s11240-020-01883-6.
28. Liu W., Chilcott C. E., Reich R. C., Hellmann G. M. Regeneration of *Salvia sclarea* via organogenesis // In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 2000. Vol. 36. No. 3. P. 201–206. DOI: 10.1007/s11627-000-0037-z.
29. 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/s11627-006-9002-0.
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 01.03.2022).
33. 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.
34. Kalinin F. L., Sarnatskaya V. V., Polishchuk V. E. Methods of tissue culture in plant physiology and biochemistry. Kiev: Naukova dumka, 1980. 488 p.
35. 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.
36. Yegorova N. A., Stavtzeva I. V., Mitrofanova I. V. Morphogenesis and clonal micropropagation of *Salvia sclarea* L. *in vitro* // Works of the State Nikita Botanical Gardens. 2011. Vol. 133. P. 41–53.
37. 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 Selektzii [Vavilov Journal of Genetics and Breeding]. 2016. Vol. 20 (5). P. 623–628. DOI: 10.18699/VJ16.183.

UDC 633.81:57.085.2

Yegorova N. A., Stavtzeva I. V.

**THE USE OF EMBRYO CULTURE FOR THE SELECTION CLARY SAGE
FORMS RESISTANT TO OSMOTIC STRESS *IN VITRO***

Summary. *The most important task of plant breeding is the creation of highly productive cultivars resistant to abiotic stress factors of the environment, in particular, to drought. This also applies to one of the essential oil plants widespread in the south of Russia – clary sage. To solve many breeding issues, biotechnological methods are currently being actively used. One of these methods is in vitro cell selection, which allows targeted selection of genotypes with desired traits. The purpose of the work was to study the features of the effect of osmotic stress on the development of isolated embryos of clary sage cultivars and samples to develop a cell technology for creating forms resistant to this stress factor in vitro. Cultivars and samples of sage (Salvia sclarea L.) differing in field drought resistance were used in the studies. Mature zygotic embryos were used as explants, which were cultivated on Murashige and Skoog (MS) culture media supplemented with osmotic agents (NaCl, mannitol, sorbitol, sucrose) at various concentrations. In the control, embryos were cultured on MS medium. It was shown that the cultivation of embryos of three cultivars ('C-785', 'Ai-Todor' and 'Taigan') on media with 0.9 % NaCl, 4.0–5.0 % mannitol or sorbitol and 7.0 % sucrose made it possible to differentiate cultivars by resistance to osmotic stress. In the following experiment, the development of isolated embryos of 10 cultivars and samples of sage (with coefficients of drought resistance from 22.5 to 73.5 %) was analyzed on a medium supplemented with a sublethal concentration of mannitol (4.5 %). Herewith, a decrease in comparison with the control from 1.4 to 14.5 times was revealed for all the studied parameters, such as the frequency of embryos germination and seedlings formation, the length of the shoot and root. It was established that the maximum correlation coefficients (0.76–0.79) were between the field drought resistance of genotypes and the frequency of seedling development on the medium with mannitol. The conducted studies showed that the developed selective system for obtaining or evaluating in vitro forms of sage resistant to abiotic stress is rather promising.*

Keywords: *Salvia sclarea L., in vitro selection, osmotic stress, embryo culture.*

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, 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, Republic of Crimea, 295493, Russia; e-mail: yegorova.na@mail.ru.

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

Дата поступления в редакцию – 13.02.2022.

Дата принятия к печати – 18.03.2022.