

УДК 634.71:57.085:546.74

## ОТБОР ЕЖЕВИКИ *IN VITRO* НА КОМПЛЕКСНУЮ ТОЛЕРАНТНОСТЬ К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССОРАМ

**Наталья Владимировна Соловых**

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник

natalyasolovykh@yandex.ru

ФГБНУ «Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина»

г. Мичуринск, Россия

**Аннотация.** Контрольные и отобранные в процессе тканевой селекции толерантные к избыточному хлоридному засолению и глифосату растения ежевики сорта Честер торнлесс тестировали *in vitro* на устойчивость к ионам никеля. Диагностировали жизнеспособность микрочеренков при культивировании на питательных средах, содержащих 0,25 мМ хлорида никеля. Доказана более высокая резистентность к ионам тяжёлого металла устойчивых к NaCl и пестициду растений по сравнению с контрольными (не прошедшими селекции на резистентность). Отобраны растения, толерантные одновременно к гербициду, избыточному хлоридному засолению и ионам никеля.

**Ключевые слова:** ежевика, *in vitro*, тканевая селекция, толерантность, пестициды, хлоридное засоление, хлорид никеля.

Ухудшающаяся экологическая обстановка требует выведения сортов с повышенным потенциалом адаптации к комплексу неблагоприятных воздействий окружающей среды. Наибольший ущерб сельскохозяйственным растениям наносят экстремальные температуры, недостаточное увлажнение, избыточная засоленность почв и техногенные загрязнения, в частности соли тяжёлых металлов.

Селекция на устойчивость к множеству негативных воздействий окружающей среды является сложным и длительным процессом. Однако, многие стрессоры, наряду со специфическими, имеют общие механизмы повреждающего действия на растительные ткани. Неблагоприятные воздействия вызывают накопление активных форм кислорода, что приводит к активизации перекисного окисления липидов (ПОЛ), повреждению мембран и развитию окислительного стресса у растений. Окислительный стресс вызывают избыточное засоление, пестициды, засуха, экстремальные температуры, ионы тяжёлых металлов [1-4] и т.п. Это даёт возможность отбирать растения, способные существенно активизировать работу антиоксидантной системы под влиянием стрессоров, и получать сорта с высоким потенциалом адаптации к различным негативным воздействиям.

Поскольку толерантность к химическим веществам в токсичных концентрациях определяется на клеточном уровне, для проведения селекции на этот признак применима тканевая селекция [5, 6].

В процессе работ по тканевой селекции растений рода *Rubus* на толерантность к избыточному засолению и пестицидам, проводимых в «ФНЦ им. И.В.Мичурина», были получены растения ежевики с повышенной толерантностью одновременно к глифосату (гербицид из группы фосфорорганических веществ) и избыточному хлоридному засолению [7]. Было доказано, что у отобранных на повышенную толерантность растений интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) под действием стрессора возрастает в меньшей степени, чем у контрольных [8]. Таким образом, в

процессе тканевой селекции получены растения, способные эффективно активизировать антиоксидантную систему при неблагоприятных воздействиях среды, что свидетельствует о перспективности отбора на комплексную устойчивость.

Целью настоящего исследования являлась диагностика уровня толерантности к ионам никеля в токсичной концентрации устойчивых к хлориду натрия и пестициду растений по сравнению с контрольными (не прошедшими тканевой селекции)

### **Материалы и методика исследований**

В работе использовали растения ежевики сорта Честер торнлесс (Chester Thornless), культивируемые *in vitro* по методике, разработанной во ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина [9]. Культивирование проводили на агаризованной питательной среде с минеральным составом по прописи MS [10], содержащей  $\frac{1}{2}$  концентрации макросолей, 20 г/л сахарозы, 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП), 0,1 мг/л индолилмасляной кислоты (ИМК) и 0,5 мг/л гибберелловой кислоты (ГК). Колбы с растениями содержали при освещённости 2500 Лк, продолжительности светового дня 16 часов и температуре  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Изучали толерантность к ионам никеля контрольных (не прошедших тканевой селекции) и отобранных на повышенную толерантность к NaCl и глифосату растений. Микрочеренки культивировали на среде, в которую был внесён хлорид никеля шестиводный в концентрации 0,25 мМ. Через 15, 30 и 45 суток культивирования проводили учёт количества листьев, сохранивших жизнеспособность, и подсчитывали их процент.

Для подтверждения роли антиоксидантной системы в реализации толерантности растений к соли тяжёлого металла изучали влияние экзогенного антиоксиданта на жизнеспособность контрольных растений в присутствии иона никеля. Для этого по описанной выше методике регистрировали жизнеспособность листьев контрольных растений на через 15, 30 и 45 дней

культивирования на среде с 0,25 мМ хлорида никеля. Результаты сравнивали с результатами учётов названного показателя на среде, в которую, помимо соли тяжёлого металла, вносили 0,75 мМ глутатиона восстановленного.

В каждом варианте опыта использовали пять биологических повторностей по 6 микрочеренков в каждой. Математическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием статистического пакета программы Microsoft Excel.

### Результаты исследований и обсуждение

Установлено, что внесение в питательную среду хлорида никеля в концентрации 0,25 мМ оказывало угнетающее действие на микрочеренки ежевики во всех вариантах опыта. Наблюдали практически полное угнетение роста и размножения *in vitro* как у контрольных, так и у предварительно отобранных на устойчивость к избыточному засолению и глифосату форм. Медленное размножение (коэффициент размножения 0,2-0,3) удалось зарегистрировать только на первом этапе культивирования (10 дней), когда ион никеля ещё не накопился в растительных тканях, и только у отселектированных на устойчивость к глифосату и хлориду натрия форм.

К 15-му дню культивирования во всех вариантах опыта с тяжёлым металлом уже визуально можно было зафиксировать некротизацию нижних листьев. Через 45 суток количество жизнеспособных листьев у контрольных растений составило менее 20%. На среде, содержащей 0,25 мМ  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , жизнеспособность отобранных на толерантность к хлориду натрия и глифосату растений снижалась медленнее, чем жизнеспособность контрольных растений (Таблица 1).

Таблица 1

Изменение жизнеспособности микрочеренков ежевики по мере культивирования на среде, содержащей 0,25 мМ хлорида никеля

Вариант опыта	Количество жизнеспособных листьев, %		
	15 дней	30 дней	45 дней

	культивирования	культивирования	культивирования
Контрольные растения на среде без хлорида никеля	98,39±0,82	99,19±0,42	99,37±0,33
Контрольные растения на среде, содержащей 0,25 мМ хлорида никеля	88,46±1,91	50,29±1,95	14,08±2,03
Устойчивые к хлоридному засолению и глифосату растения на среде, содержащей 0,25 мМ хлорида никеля	95,06±0,32	66,89±1,47	32,78±1,48
Контрольные растения на среде, содержащей 0,25 мМ хлорида никеля и 0,75 мМ глутатиона восстановленного	90,09±2,34	63,10±1,81	23,68±2,14

Внесение в питательную среду глутатиона восстановленного замедляло процесс некротизации листьев у контрольных растений на среде, содержащей соль тяжёлого металла. На тридцатый день культивирования у контрольных растений присутствие глутатиона восстановленного привело к росту количества жизнеспособных листьев на 25,47%, а на сорок пятый день – на 59,46%. Это является свидетельством роли антиоксидантной системы в действии защитных механизмов растений от негативного влияния токсичных химических веществ.

Таким образом, полученные в процессе тканевой селекции на толерантность к избыточному хлоридному засолению и глифосату растения ежевики продемонстрировали повышенную толерантность также и к хлориду никеля. Это свидетельствует о перспективности работ в области селекции на толерантность к комплексу абиотических стрессоров.

### **Список литературы**

1. Баранова Е.Н., Гулевич А.А. Проблемы и перспективы генно-инженерного подхода в решении вопросов устойчивости растений к засолению // Сельскохозяйственная биология, 2006. №1. С. 39-56.

2. Гудковский В.А., Каширская Н.Я., Цуканова Е.М. Изменение активности фермента каталазы и индукции флуоресценции хлорофилла различных по устойчивости культур и сортов при стрессовом и антистрессовом воздействии // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2000. № 5. С. 5-7.

3. Гладков Е.А., Гладкова О.В. Биотехнологические методы получения растений, устойчивых к тяжёлым металлам. Оценка комплексной фитотоксичности тяжёлых металлов и получение растений, обладающих комплексной устойчивостью // Биотехнология. 2007. №1. С.81-85.

4. Dias, M.C., Figueiredo, P., Duarte, I.F. Different responses of young and expanded lettuce leaves to fungicide Mancozeb: chlorophyll fluorescence, lipid peroxidation, pigments and proline content // Photosynthetica. 2014. V. 52. P. 148–151.

5. Носов А.М. Культура клеток высших растений - уникальная система, модель, инструмент. Обзор // Физиология растений. 1999. Т.46, №6. С. 837-844.

6. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учебное пособие. М.: ФБК-ПРЕСС. 1999. 160 с.

7. Соловых Н.В., Будаговская О.Н., Будаговский А.В. Отбор *in vitro* толерантных к хлориду натрия и глифосату растений ежевики // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2023. №8. С 60-66.

8. Соловых Н.В. Тканевая селекция растений рода *Rubus* на толерантность к абиотическим стрессорам // Современные тенденции устойчивого развития ягодоводства России (земляника, малина): сборник научных трудов, посвящённый 90-летию со дня рождения кандидата сельскохозяйственных наук К.Т. Ярковой. Воронеж: Кварта, 2019. Т.2. С.278-291.

9. Муратова С.А., Шорников Д.Г., Янковская М.Б. Размножение садовых культур *in vitro*: Методические рекомендации. Мичуринск-наукоград РФ.

ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина: ОАО Тамбовская типография «Пролетарский светоч», 2008. 68с.

10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*, 1962. V.15, №13. P. 473-497.

**UDC 634.71:57.085:546.74**

## **IN VITRO SELECTION OF BLACKBERRY FOR COMPLEX TOLERANCE TO ABIOTIC STRESSORS**

**Natalya V. Solovykh**

candidate of biological sciences, leading researcher

natalyasolovykh@yandex.ru

I.V. Michurin Federal Scientific Center

Michurinsk, Russia

**Abstract.** Control and tissue-selected plants of blackberry variety Chester Thornless tolerant to excess chloride salinity and glyphosate were tested *in vitro* for resistance to nickel ions. The viability of microcuttings was diagnosed when grown on nutrient media containing 0.25 mM nickel chloride. Higher resistance to heavy metal ions of NaCl- and pesticide-resistant plants was proven compared to control plants (not selected for resistance). Plants were selected that were simultaneously tolerant to the herbicide, excess chloride salinity and nickel ions.

**Keywords:** blackberry, *in vitro*, tissue selection, tolerance, pesticides, chloride salinity, nickel chloride.

Статья поступила в редакцию 30.04.2025; одобрена после рецензирования 20.06.2025; принята к публикации 30.06.2025.

The article was submitted 30.04.2025; approved after reviewing 20.06.2025; accepted for publication 30.06.2025.