

15. Temirbekova S. K., Kulikov I. M., Metlina G. V., Afanasyeva Yu. V., Vasilchenko S. A., Ionova N. E. The role of adaptive potential in increasing the environmental stability of dyeing safflower in three regions of the Russian Federation. Education, science and manufacturing. 2014. № 4 (9). Pp. 21-25.

Информация об авторах

Климова Ирина Ивановна, научный сотрудник лаборатории селекции сельскохозяйственных культур, ФГБНУ «Прикаспийский аграрный федеральный научный центр РАН» (Российская Федерация, 416251, Астраханская область, Черноярский район, с. Солёное Займище, квартал Северный, д. 8), e-mail: irina.ssd1981@yandex.ru

Ячменева Екатерина Васильевна, младший научный сотрудник лаборатории селекции сельскохозяйственных культур ФГБНУ «Прикаспийский аграрный федеральный научный центр РАН» (Российская Федерация, 416251, Астраханская область, Черноярский район, с. Солёное Займище, квартал Северный, д. 8), e-mail: rfn.yz2009@mail.ru

Author's Information

Klimova Irina Ivanovna, lab researcher. crop selection of the Federal State Budgetary Institution "Caspian Agricultural Federal Scientific Center of the Russian Academy of Sciences" (Russian Federation, 416251, Astrakhan region, Chernoyarsky district, c. Solenoe Zaimishche, Severny quarter, 8), e-mail: irina.ssd1981@yandex.ru

Yachmeneva Ekaterina Vasilievna, junior researcher at the lab. crop selection of the Federal State Budgetary Institution "Caspian Agricultural Federal Scientific Center of the Russian Academy of Sciences" (Russian Federation, 416251, Astrakhan region, Chernoyarsky district, c. Solenoe Zaimishche, Severny quarter, 8), e-mail: rfn.yz2009@mail.ru

DOI: 10.32786/2071-9485-2023-04-20

SCREENING ROBINIA PSEUDOACACIA L. SEEDLINGS FOR SALT STRESS RESISTANCE FOR SUBSEQUENT DETECTION OF RESISTANT GENOTYPES BY MOLECULAR GENETIC METHODS

**T. S. Babakova¹, N. P. Fefelova¹, M. S. Kakotkina¹, S. V. Matveeva¹, A. A. Vasilieva¹,
A. S. Popova¹, V. G. Zaitsev²**

¹ Federal Research Centre of Agroecology, Complex Reclamation and Protective Forest Breeding of the Russian Academy of Sciences

² Volgograd State University
Volgograd, Russian Federation

Corresponding author E-mail: valeryzaitsev@gmail.com

Received 03.02.2023

Submitted 10.10.2023

The research was carried out within the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (theme No. 122020100449-3 "Search on selection valuable genetic material for the development of new genotypes of trees and shrubs by molecular breeding methods")

Summary

The aim of this work was development of a screening system to find salt stress tolerant black locust seedling for following identification of stress tolerant genotypes. Our system combined original protocol of black locust seed germination under salt stress conditions and originally modified DNA extraction protocol. Salt stress induced changes in germination capacity, morphological indexes and biochemical markers confirmed stress development in proposed screening system. Used DNA extraction method allowed preparing DNA with good quality for molecular genetic research. Therefore, developed screening system can be applicable to find salt stress tolerant black locust genotypes.

Abstract

Introduction. Soil salinity is an unfavorable natural factor acting in addition to water deficiency in arid areas. Black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) is tree widely used in agroforestry in arid lands. Therefore identification of black locust genotypes exhibiting increased salt stress tolerance is highly

important. **Objects.** Black locust seeds and seedlings. **Materials and methods.** Black locust seeds were germinated without or with NaCl in irrigation water (range of concentrations 0-300 mM). We measured seed germination rate, weight and length of 46 days old seedlings and some stress related biochemical markers. **Results and conclusions.** We found black locust seed germination capacity decreased with an increase in the concentration of NaCl (from 93% at 0 mM to 9% at 300 mM). Seedlings grown in the presence of NaCl had some morphological alterations and changes in the biochemical marker values. Strong negative correlation between NaCl concentration in irrigation water and aerial part length to root length ratio was observed. Proposed DNA extraction method allowed to prepare DNA with good quality for molecular genetic research. Developed screening system could be used to find salt stress tolerant black locust seedling for following identification of stress tolerant genotypes.

Key words: robinia seedlings, robinia genotypes, robinia pseudoacacia, plant salt stress, salt-resistant plant screening.

Citation. Babakova T. S., Fefelova N. P., Kakotkina M. S., Matveeva S. V., Vasilieva A. A., Popova A. S., Zaitsev V. G. Screening *Robinia pseudoacacia* L. seedlings for salt stress resistance for subsequent detection of resistant genotypes by molecular genetic methods. *Proc. of the Lower Volga Agro-University Comp.* 2023. 4(72). 192-202 (in Russian). DOI: 10.32786/2071-9485-2023-04-20.

Author's contribution. All authors of this research paper have directly participated in the planning, execution, or analysis of this study. All authors of this paper have read and approved the final version submitted.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

УДК 581.192:57.04:581.1

СКРИНИНГ ПРОРОСТКОВ *ROBINIA PSEUDOACACIA* L. НА УСТОЙЧИВОСТЬ К СОЛЕВОМУ СТРЕССУ ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО ВЫЯВЛЕНИЯ УСТОЙЧИВЫХ ГЕНОТИПОВ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Т. С. Бабакова¹, младший научный сотрудник
Н. П. Фефелова¹, инженер-исследователь
М. С. Какоткина¹, инженер-исследователь
С. В. Матвеева¹, младший научный сотрудник
А. А. Васильева¹, лаборант-исследователь
А. С. Попова¹, младший научный сотрудник
В. Г. Зайцев², кандидат биологических наук

¹ФГБНУ «Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук»

²ФГАОВ ВО Волгоградский государственный университет
г. Волгоград, Российская Федерация

Исследования проведены в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ, тема «Поиск селекционно-ценного генетического материала для создания новых генотипов древесно-кустарниковых пород методами молекулярной селекции» (регистрационный номер НИОКТР 122020100449-3)

Актуальность. На засушливых территориях наряду с дефицитом влаги неблагоприятным экологическим фактором часто является засоление почвы. Робиния лжеакация (*Robinia pseudoacacia* L.) широко используется в агролесомелиорации на засушливых землях. Поэтому важным представляется выявление генотипов этой породы с повышенной устойчивостью к солевому стрессу. **Объект.** Семена и проростки робинии лжеакации. **Материалы и методы.** Проращивали семена робинии лжеакации и выращивали проростки в присутствии различных концентраций NaCl (от 0 до 300 mM). Оценивалась всхожесть семян, масса и размеры проростков, а также ряд биохимических показателей, связанных с ответом растений на стресс. **Результаты и выводы.** Было установлено, что всхожесть семян робинии снижалась при увеличении концентрации NaCl (с 93% при 0 mM до 9% при 300 mM). При выращивании в присутствии

NaCl также наблюдались определенные изменения в морфологических характеристиках и биохимических показателях. Была выявлена сильная отрицательная корреляция между концентрацией NaCl и отношением длин надземной части и корней проростков. Выделение ДНК предложенным методом позволило получить препараты приемлемого для молекулярно-генетических исследований качества. Таким образом, разработанную нами систему можно считать подходящей для скрининга солеустойчивых растений робинии лжеакация с последующим выявлением устойчивых генотипов молекулярно-генетическими методами.

Ключевые слова: проростки робинии, генотипы робинии, робиния лжеакация, солевой стресс растений, скрининг солеустойчивых растений.

Цитирование. Бабакова Т. С., Фефелова Н. П., Какоткина М. С., Матвеева С. В., Васильева А. А., Попова А. С., Зайцев В. Г. Скрининг проростков *Robinia pseudoacacia* L. на устойчивость к солевому стрессу для последующего выявления устойчивых генотипов молекулярно-генетическими методами. *Известия НВ АУК*. 2023. 4(72). 192-202. DOI: 10.32786/2071-9485-2023-04-20.

Авторский вклад. Все авторы настоящего исследования принимали непосредственное участие в планировании, выполнении или анализе данного исследования. Все авторы настоящей статьи ознакомились с представленным окончательным вариантом и одобрили его.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Введение. Робиния лжеакация (*Robinia pseudoacacia* L.) является древесной породой, имеющей широкое практическое применение [15]. В частности, это растение используется в защитном лесоразведении и агролесомелиорации, преимущественно на территориях с засушливыми условиями [5, 9]. В таких зонах на многих участках одновременно может наблюдаться и дефицит влаги, и засоление почвы [2]. В то же время каждый вид обладает высокой генетической вариабельностью, в результате которой многие растения могут проявлять сниженную жизнеспособность под действием стрессовых факторов. Указанный факт делает чрезвычайно важным поиск и выявление генотипов робинии с более высокой устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды. Очевидно, что для этого необходимо использовать систему скрининга, которая позволяет, во-первых, адекватным образом отбирать растения, резистентные к определенному стрессовому фактору, и, во-вторых, выделять качественные препараты ДНК из отобранных растений. Следовательно, эффективная система скрининга устойчивых генотипов должна включать в себя методику выращивания тестируемых растений в условиях контролируемого стрессирующего воздействия и методику эффективного выделения ДНК, качество которой будет приемлемо для последующего анализа современными молекулярно-генетическими методами. Выращивание растений в условиях контролируемого стресса предполагает возможность произвольно изменять интенсивность воздействия тестируемого фактора, а все остальные условия выращивания будут одинаковыми для всех растений. Обычно такие условия достижимы только в условиях лабораторного эксперимента. Однако на сегодняшний день существует ограниченное число работ, в которых в лабораторных условиях тестировалась устойчивость растений робинии к солевому стрессу, причем почти все работы выполнены на сеянцах 2-летнего возраста [6-8, 10, 11, 13]. С другой стороны, массовый отсев чувствительных к стрессовым факторам генотипов обычно происходит еще на стадии прорастания семян и раннего развития проростков [20]. Нам удалось выявить лишь две опубликованные к настоящему времени работы, в которых влияние солевого стресса на робинию оценивалось на стадии прорастания [3, 21]. Лишь в одной из этих работ [3] из проростков выделяли ДНК, но для скрининга устойчивых форм описанная модель не использовалась. Выделение ДНК из проростков, выросших в неблагоприятных условиях, может иметь определенные сложности, поскольку солевой стресс в качестве защитного клеточного ответа стимулирует в растениях синтез вторичных метаболитов, в частности

фенольных соединений [4]. Такие метаболиты могут выступать в роли ингибиторов ферментов, используемых в молекулярно-генетических методах исследований, или мешать выделению ДНК из биологических образцов [18]. Поэтому используемые методики выделения ДНК должны обладать большей устойчивостью к наличию вторичных метаболитов для получения препаратов выделенной ДНК высокого качества [17].

Целью данной работы было разработать модельную систему для отбора солеустойчивых растений робинии лжеакалии на стадии прорастания и раннего развития и проверить возможность эффективного выделения ДНК из растений, выращенных в условиях солевого стресса.

Материалы и методы. Объектом исследования стали семена робинии лжеакалии *Robinia pseudoacacia* L. (540 штук), собранные в Суровикинском районе Волгоградской области России в 2021 году. Перед посевом семена скарифицировали обработкой кипящей водой, после этого выдерживали в воде при температуре 20-25°C в течение 3 часов и высаживали в кассеты с ячейками объемом 28 мл, содержащие 25 мл субстрата (перлит: вермикулит 1:1) по 2 семени на ячейку. Полив осуществляли различными концентрациями раствора NaCl (от 0 до 300 мМ) в день посадки, на 5, 10 и 15 дни, после этого солевым питательным раствором Хогланда раз в 3-4 дня.

Всхожесть семян определяли на 10-й день после посева. На 46 день эксперимента растения извлекали из субстрата, взвешивали, измеряли длину и использовали для выделения ДНК и определения биохимических показателей. Экстракцию пигментов и определение их содержания проводили как описано в работе [19]. Содержание суммы фенольных соединений в экстрактах определяли спектрофотометрически с реагентом Фолина – Чиокалте [1], а флавоноидов – по образованию окрашенного комплекса с хлоридом алюминия [12].

Для выделения ДНК из проростков робинии использовали методику, основанную на описанной в работе [16], с модификациями, направленными на повышение выхода ДНК из образцов с высоким содержанием вторичных метаболитов. Ткани листьев растений 100 мг помещали в 2,0 мл пробирку для гомогенизации (СК28), добавляли 800 мкл экстракционного буфера, содержащего 100 мМ трис(гидроксиметил)аминометана (трис)-HCl, 50 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), 1 М NaCl, 0,043% дитиотреитолом, 2,5% поливинилпирролидона (pH 8,0). Гомогенизировали с помощью гомогенизатора Precellys 24 компании Bertin, используя программу 6000-2x30. После гомогенизации добавляли 100 мкл 20% SDS, перемешивали и инкубировали при 65°C в течение 15 мин. После инкубации добавляли 225 мкл 2М CH₃COOK и осторожно перемешивали переворачиванием. Образцы инкубировали в холодильнике при +4 °C в течение 15 минут, а затем центрифугировали при 12000 g в течение 10 минут при комнатной температуре. Супернатант переносили в новую пробирку и осаждали ДНК равным объемом холодного изопропилового спирта. Осадок ДНК осаждали центрифугированием при 12000 g в течение 10 минут, однократно промывали 70% этиловым спиртом и ресуспендировали в 100 мкл ТЕ буфера (10 мМ трис и 1 мМ ЭДТА, pH 8).

Определение концентрации ДНК полученных препаратов определяли флуориметрически. Возможность использования выделенной ДНК оценивали по ее способности к амплификации с универсальными праймерами Uniplant для штрих-кодирования по ядерному локусу ITS2: UniplantF – TGTGAATTGCARRATYCMG, UniplantR – CCCGHYTGAYYTGRGGTCDC [14]. ПЦР в реальном времени проводили с набором реагентов 5X qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген, Россия). Амплификацию выполняли с помощью системы Applied Biosystems QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США). Реакционную смесь нагревали при 95 °C в течение 10 минут, затем повторяли 40 циклов амплификации: 30 сек при 95 °C, 30 секунд при 56° C и 60 секунд при 72°C, после чего проводили финальную элонгацию в течение 10 минут при 72°C.

Для определения статистически значимых различий между группами по исследуемым количественным показателям пользовались тестом Краскала – Уоллиса с последующим анализом (post-hoc) по Данну с коррекцией множественных сравнений по Сидуку с помощью программы Microsoft Excel с надстройкой Xrealstats (<https://www.real-statistics.com/>). Для выявления наличия ассоциаций между отдельными показателями использовали корреляционный анализ по Спирмену.

Результаты и обсуждение. Для подтверждения применимости разработанной нами системы скрининга солеустойчивых форм робинии необходимо было доказать, что: (1) солевой стресс вызывает изменения в жизнеспособности растений в зависимости от концентрации NaCl; (2) под действием солевого стресса происходят изменения в биохимических показателях; (3) из проростков, выращенных при всех протестированных концентрациях NaCl, выделяется ДНК достаточного для молекулярно-генетических исследований качества.

Оценка жизнеспособности была основана на способности семян робинии прорастать при различной концентрации соли. Мы обнаружили, что увеличение концентрации NaCl в поливной воде в общем вызывает снижение всхожести семян робинии (рисунок 1), однако вплоть до концентрации 50 мМ включительно статистически значимых отличий от всхожести семян, выращенных в отсутствие NaCl, не наблюдалось (рисунок 2). При концентрации соли 100 мМ всхожесть была статистически значимо ниже, чем у интактных семян. Повышение концентрации соли до 150 мМ вызывало резкое (в 2-3 раза) снижение всхожести. При этом всхожесть в группах с поливом 150-250 мМ NaCl не имела статистически значимых отличий. При концентрации соли 300 мМ всхожесть становилась ниже 10%. Корреляционный анализ по Спирмену показал наличие статистически значимой сильной обратной ассоциации между всхожестью и концентрацией NaCl ($r_s = -0,90303$, $p = 0,00034$). Схожая динамика зависимости всхожести была обнаружена в работе [3]. Однако в силу различий в методиках нельзя точно сопоставить содержание солей между опытными группами в этих двух экспериментах. Тем не менее, мы можем констатировать, что в обоих экспериментах было выявлено критическое значение уровня солевого стресса, при котором происходило резкое снижение всхожести семян.

Дальнейшее выживание проростков также оказалось зависимым от концентрации соли в поливной воде. К 40-му дню после посева в группах, которые поливались водой с содержанием NaCl 200, 250 или 300 мМ, не выжил ни один проросток робинии. Поэтому последующие измерения были возможны лишь для проростков, выросших в условиях полива 0-150 мМ NaCl.

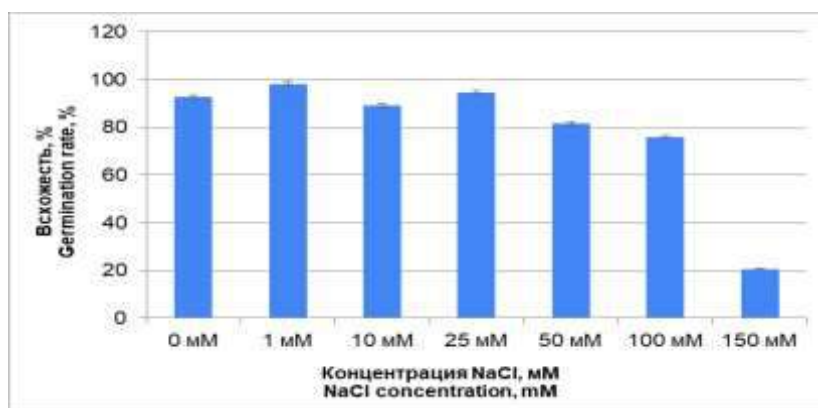


Рисунок 1 – Всхожесть семян робинии на десятые сутки, в %, в зависимости от концентрации NaCl. Данные представлены в виде медианы с указанием 95%-ного доверительного интервала

Figure 1 – Germination of robinia seeds on the tenth day, in %, depending on the concentration of NaCl. The data is presented as a median with a 95% confidence interval

	Контроль вода	1 mM вода	10 mM вода	25 mM вода	50 mM вода	100 mM вода	150 mM вода	200 mM вода	250 mM вода	300 mM вода
Контроль вода	1	0,17058	0,50928	0,59554	0,08544	0,01732	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
1 mM вода	0,17058	1	0,05118	0,30772	0,00424	0,00958	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
10 mM вода	0,50928	0,05118	1	0,29034	0,26014	0,07672	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
25 mM вода	0,59554	0,30772	0,29034	1	0,05840	0,00672	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
50 mM вода	0,08544	0,00424	0,26014	0,05840	1	0,4777	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
100 mM вода	0,01732	0,00958	0,07672	0,00672	0,4777	1	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
150 mM вода	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	1	0,12852	0,18524	0,1031
200 mM вода	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,12852	1	0,02368	0,00222
250 mM вода	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,18524	0,02368	1	0,0041
300 mM вода	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,1031	0,00222	0,0041	1

Рисунок 2 – Статистический анализ сравнения всхожести семян робинии при поливе растворами NaCl с различной концентрацией соли. Результаты представлены в виде величин достигнутого уровня значимости в тесте Краскала – Уоллеса с последующим анализом (post-hoc) по Данну. Зеленым выделены значения, свидетельствующие о статистически значимых отличиях в величине всхожести между определенными двумя опытными группами после коррекции множественных сравнений по Сидaku

Figure 2 – Statistical analysis of comparison of germination of robinia seeds with different concentrations of NaCl solution watering. The results are presented as the values of the achieved significance level in the Kraskel-Wallis test with subsequent Dann post-hoc analysis. Green values indicate statistically significant differences in the amount of germination between certain two experimental groups after correction of Sidak multiple comparisons

Общая длина проростков при изменении концентрации соли была примерно одинаковой во всех исследованных группах, проявляя тенденцию к постепенному уменьшению при увеличении концентрации соли (рисунок 3, I). Гораздо более показательным было соотношение длин надземной части и корня проростков (рисунок 3, II). При увеличении концентрации соли в поливной воде наблюдается постепенное, концентрационно-зависимое удлинение корня относительно надземной части проростков. Мы выявили сильную обратную корреляцию между концентрацией соли в воде и соотношением длины надземной части проростков к длине корня (коэффициент корреляции Спирмена $r_s = -0,90303$, $p = 0,00009$). В то же время, мы не обнаружили статистически значимых различий по массе проростков между какими-либо группами.

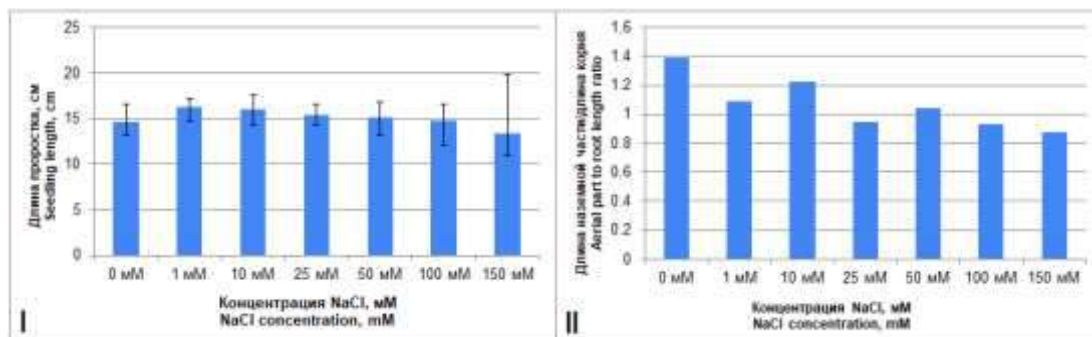


Рисунок 3 – Длина проростков (I) и соотношение длины надземной части к длине корня (II) у проростков семян робинии, выращенных при различных концентрациях NaCl. Данные представлены в виде медианы с указанием 95%-ного доверительного интервала

Figure 3 – The seedlings length (I) and the ratio of the aerial part to root length (II) in seedlings of robinia grown with various NaCl concentrations. The data is presented as a median with a 95% confidence interval

Поскольку при различных видах абиотического стресса могут наблюдаться изменения в состоянии фотосинтетического аппарата, мы изучили возможное влияние солевого стресса на состав фотосинтетических и вспомогательных пигментов у проростков робинии. Мы обнаружили, что только концентрация соли 150 мМ вызывала существенное изменение (в сторону повышения) общего содержания хлорофиллов и содержания каротиноидов, при остальных концентрациях соли не было достоверных отличий от интактных проростков, за исключением снижения содержания каротиноидов в группах 25 мМ и 100 мМ NaCl (рисунок 4). Также не было обнаружено статистически значимых отличий в соотношении содержания хлорофиллов а и b между какими-либо из исследованных групп. Наоборот, соотношение хлорофиллы/каротиноиды возрастало при увеличении концентрации соли от 0 до 25 мМ, а при дальнейшем повышении концентрации соли это соотношение уменьшалось.

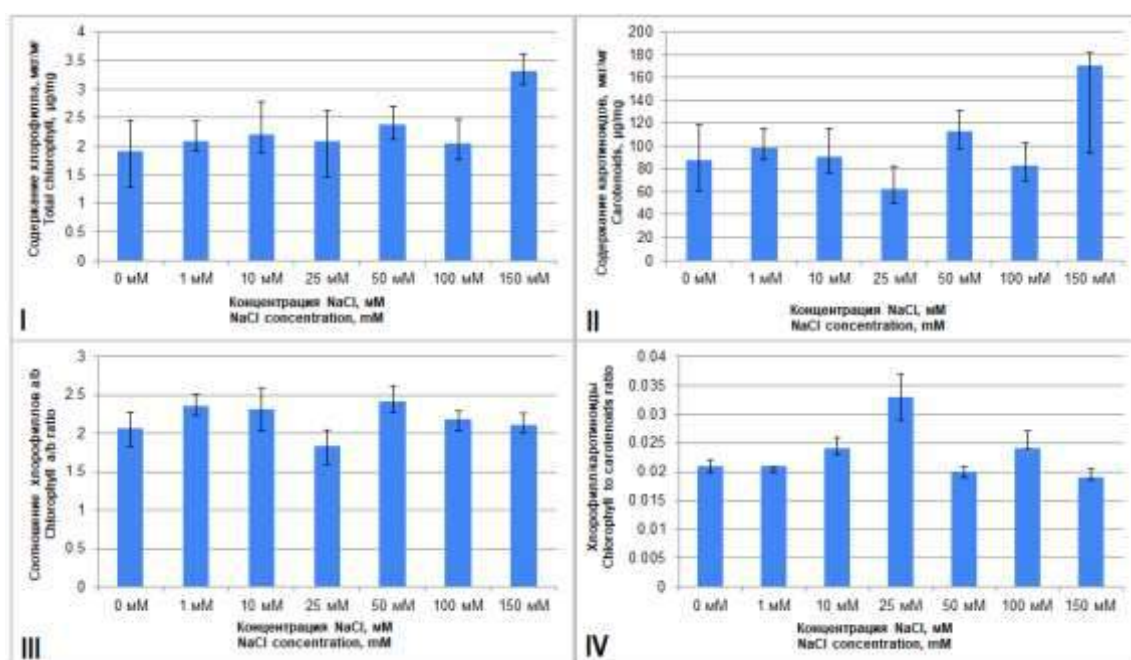


Рисунок 4 – Содержание фотосинтетических и вспомогательных пигментов в проростках семян робинии, выращенных при различных концентрациях NaCl. Данные представлены в виде медианы с указанием 95%-ного доверительного интервала

Figure 4 – Content of photosynthetic and additional pigments in robinia seedlings grown with various NaCl concentrations. The data is presented as a median with a 95% confidence interval

Мы также определили содержание вторичных метаболитов фенольной природы, которые могут накапливаться в растениях при различных видах абиотического стресса. У интактных проростков робинии содержание суммы фенольных соединений составило от 0,84 до 1,4 мкмоль/г сырой массы растения. У проростков, выращенных на солевых растворах, содержание фенолов в зависимости от концентрации NaCl существенно не отличалось, и было в диапазоне от 2,02 до 5,38 мкмоль/г сырой массы растения. Схожая картина наблюдалась для флавоноидов: содержание в интактных растениях было намного ниже, чем в растениях, выращенных на солевых растворах (рисунок 5). При этом максимальное содержание флавоноидов обнаруживалось в растениях, выращенных при концентрациях NaCl 10 и 150 мМ. Таким образом, полученные нами результаты показывают, что растения выращенные на солевых растворах отличаются от интактных проростков как по жизнеспособности, так и по ряду морфологических характеристик и биохимических показателей.

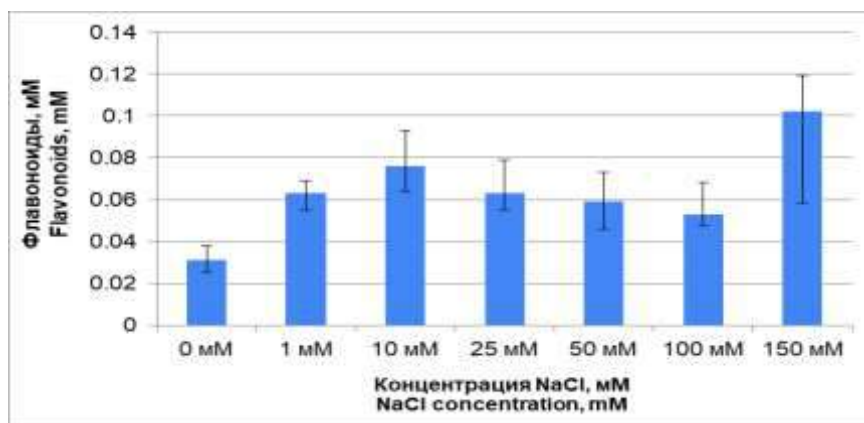


Рисунок 5 – Содержание флавоноидов в проростках семян робинии, выращенных при различных концентрациях NaCl. Данные представлены в виде медианы с указанием 95%-ного доверительного интервала

Figure 5 – Flavonoid content in robinia seedlings grown with various NaCl concentrations.

The data is presented as a median with a 95% confidence interval

Поскольку робиния содержит достаточно большие количества вторичных метаболитов, для выделения ДНК был использован экстракционный раствор с повышенным содержанием солей и добавкой поливинилпирролидона, который может инактивировать фенольные соединения. Подобный подход позволил выделить достаточные количества ДНК из всех проростков (таблица 2). Важным является не только наличие ДНК, но и возможность применения ее в молекулярно-генетических исследованиях. Поскольку многие методы включают в себя использование ПЦР, выделенные препараты ДНК не должны содержать в своем составе значимых количеств ингибиторов амплификации. Проведенный ПЦР анализ с универсальными праймерами к ITS2 показал, что все полученные препараты могут быть эффективно амплифицированы (таблица 2). Определение температуры плавления полученных ампликонов позволяет определить специфичность взаимодействия праймеров с целевой последовательностью ДНК. Если это условие соблюдается, то кривые плавления будут иметь совпадающие максимумы. На рисунке 6 приведены кривые плавления продуктов амплификации ДНК из проростков робинии. Все они обладают близкими максимумами температуры плавления – около 87,5 °C. Это подтверждает хорошее качество препаратов ДНК.

Таблица – Содержание ДНК в препаратах, полученных из проростков, которые росли при различной концентрации соли, и пороговый цикл амплификации (Ct)

Table – DNA content in germ-derived preparations that grew at different salt concentrations and threshold amplification cycle (Ct)

Концентрация NaCl / NaCl concentration	0 mM	1 mM	10 mM	50 mM	100 mM	150 mM
Концентрации ДНК, нг/мкл (мин-макс) / DNA concentration, ng/μl (min-max)	4-70	25-99	63-130	28-130	4-38	7-27
Ct (мин-макс) / (min-max)	20-25	20-25	20-23	21-25	19-22	16-21

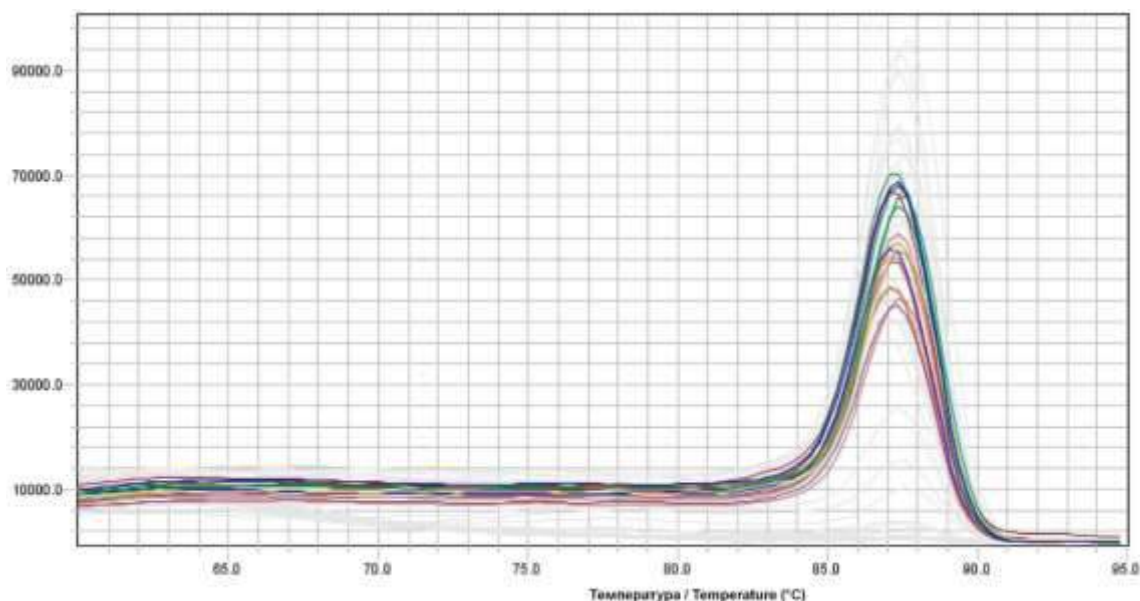


Рисунок 6 – Кривые плавления ампликонов, полученных при ПЦР анализе ДНК из проростков робинии по ядерному ДНК штрих-коду ITS2

Figure 6 – Melting curves obtained by PCR analysis of DNA from robinia seedlings using the ITS2 nuclear DNA barcode

Выводы. По результатам проведенных экспериментов было выявлено, что всхожесть семян робинии снижалась при увеличении концентрации NaCl. при выращивании в присутствии соли также наблюдались определенные изменения в морфологических характеристиках и биохимических показателях. Соотношение длин надземной части и корней проростков показало наиболее выраженное изменение: выявлена сильная отрицательная корреляция между этим показателем и концентрацией NaCl. Биохимические показатели изменялись в меньшей степени. Используемая методика выделения ДНК позволила получить препараты с приемлемым для молекулярно-генетических исследований качеством. Таким образом, полученные нами результаты подтвердили возможность использования разработанной системы для скрининга солеустойчивых растений робинии лжеакация на стадии прорастания и раннего развития.

Conclusions. Our experiments demonstrated that black locust seed germination capacity decreased with an increase in the concentration of NaCl (from 93% at 0 mM to 9% at 300 mM). Seedlings grown in the presence of NaCl had some morphological alterations and changes in the biochemical marker values. Strong negative correlation between NaCl concentration in irrigation water and aerial part length to root length ratio was observed. Biochemical markers were less sensitive to NaCl concentration elevation. Proposed DNA extraction method allowed to prepare DNA with good quality for molecular genetic research. Therefore, developed screening system could be used to find salt stress tolerant black locust seedling for following identification of stress tolerant genotypes.

Библиографический список / References

1. Ainsworth E. A., Gillespie K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*. 2007. V. 2. № 4. Pp. 875-877.
2. Eswar D., Karuppusamy R., Chellamuthu S. Drivers of soil salinity and their correlation with climate change. *Current Opinion in Environmental Sustainability*. 2021. V. 50. Pp. 310-318.
3. Gu J., Weina L., Akinagbe A., Wang J., Jia L., Yang M. Effect of salt stress on genetic diversity of *Robinia pseudoacacia* seedlings. *African Journal of Biotechnology*. 2012. V. 11. № 8. Pp. 1838-1847.
4. Isah T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*. 2019. V. 29. № 52 (1). P. 39.

5. Liang H., Meng Z., Li Z., Liu G. The Effect of Robinia pseudoacacia Plantation on Soil Desiccation across Different Precipitation Zones of the Loess Plateau, China. *Forests*. 2022. V. 13. № 2. P. 321.
6. Liu L., Huang F.-L., Luo Q.-X., Pang H.-Y., Meng F.-J. cDNA- AFLP analysis of the response of tetraploid black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) to salt stress. *African Journal of Biotechnology*. 2012. V. 11. № 13. Pp. 3116-3124.
7. Liu S., Jiang Y., Guo X., Xu L., Lei P., Luo Q., Liu J., Li W., Tao L., Meng F. The lectin gene TRpL1 of tetraploid *Robinia pseudoacacia* L. response to salt stress. *Journal of Forestry Research*. 2022. doi:10.1007/s11676-022-01479-0.
8. Luo Q., Peng M., Zhang X., Lei P., Ji X., Chow W., Meng F., Sun G. Comparative mitochondrial proteomic, physiological, biochemical and ultrastructural profiling reveal factors underpinning salt tolerance in tetraploid black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *BMC Genomics*. 2017. V. 18. P. 648.
9. Mantovani D., Veste M., Böhm C., Vignudelli M., Freese D. Spatial and temporal variation of drought impact on black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) water status and growth. *iForest*. 2015. V. 8. Pp. 743-747.
10. Mao P., Zhang Y., Cao B., Guo L., Shao H., Cao Z., Jiang Q., Wang X. Physiological and Proteomic Responses of Diploid and Tetraploid Black Locust (*Robinia pseudoacacia* L.) Subjected to Salt Stress. *Int J Mol Sci*. 2013. V. 14. № 10. Pp. 20299-20325.
11. Mao P., Zhang Y., Cao B., Guo L., Shao H., Cao Z., Jiang Q., Wang X. Effects of salt stress on eco-physiological characteristics in *Robinia pseudoacacia* based on salt-soil rhizosphere. *Science of The Total Environment*. 2016. V. 568. Pp. 118-123.
12. Matić P., Sabljčić M., Jakobek L. Validation of spectrophotometric methods for the determination of total polyphenol and total flavonoid content. *Journal of AOAC International*. 2017. V. 100. Pp. 1795-1803.
13. Meng F., Luo Q., Wang Q., Zhang X., Qi Z., Xu F., Lei X., Cao Y., Soon Chow W., Sun G. Physiological and proteomic responses to salt stress in chloroplasts of diploid and tetraploid black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Scientific Reports*. 2016. V. 6. P. 23098.
14. Moorhouse-Gann R. J., Dunn J. C., de Vere N., Goder M., Cole N., Hipperson H., Symondson W. O. C. New universal ITS2 primers for high-resolution herbivory analyses using DNA metabarcoding in both tropical and temperate zones. *Scientific Reports*. 2018. V. 8. № 8542.
15. Nicolescu V. N., Rédei K., Mason W. L. et al. Ecology, growth and management of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.), a non-native species integrated into European forests. *Journal of Forestry Research*. 2020. V. 31. Pp. 1081-1101.
16. Niu Ch., Kebede H., Auld D. L., Woodward J. E., Burow G., Wright R. J. A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment. *African Journal of Biotechnology*. 2008. V. 7. № 16. Pp. 2818-2822.
17. Sahu S. K., Thangaraj M., Kathiresan K. DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN Molecular Biology*. 2012. P. 205049.
18. Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., Johne R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*. 2012. V. 113. № 5. Pp. 1014-1026.
19. Staruhina A. O., Popova A. S., Zaitsev V. G. The Quantification of Chlorophylls and Carotenoids in the Same Sample of an Individual Condition Assessment of Agricultural Plant's Seedlings. *Scientific Agronomy Journal*. 2021. V. 2. № 113. Pp. 18-22.
20. Uçarlı C. Effects of Salinity on Seed Germination and Early Seedling Stage. *Abiotic Stress in Plants*. London. IntechOpen. 2020.
21. Weina L., Haiyue J., Minsheng Y., Juntao G. Selection of salt-tolerance on *Robinia pseudoacacia* seedlings and impact of salt stress on seedlings physiological characteristics. *Journal of Agricultural University of Hebei*. 2010. V. 33. № 3. Pp. 62-66.

Информация об авторах

Бабакова Татьяна Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной селекции Федерального научного центра агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук (Российская Федерация, 400062, г. Волгоград, проспект Университетский, д. 97), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5593-0286>, e-mail: babakova-t@vfanc.ru

Фефелова Наталья Петровна, инженер-исследователь лаборатории молекулярной селекции Федерального научного центра агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук (Российская Федерация, 400062, г. Волгоград, проспект Университетский, д. 97), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8219-6291>, e-mail: fefelova-n@vfanc.ru

Какоткина Маргарита Сергеевна, инженер-исследователь лаборатории молекулярной селекции Федерального научного центра агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук (Российская Федерация, 400062, г. Волгоград, проспект Университетский, д. 97), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4068-0552>, e-mail: samycheva-ms@vfanc.ru

Матвеева София Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной селекции Федерального научного центра агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук (Российская Федерация, 400062, г. Волгоград, проспект Университетский, д. 97), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4290-2021>, e-mail: matveeva-s@vfanc.ru

Васильева Алёна Александровна, лаборант-исследователь лаборатории молекулярной селекции Федерального научного центра агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук (Российская Федерация, 400062, г. Волгоград, проспект Университетский, д. 97), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4734-5300>, e-mail: vasilieva-aa@vfanc.ru

Попова Анна Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной селекции Федерального научного центра агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук (Российская Федерация, 400062, г. Волгоград, проспект Университетский, д. 97), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5983-4080>, e-mail: popova-a@vfanc.ru

Зайцев Валерий Геннадьевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры биоинженерии и биоинформатики, ФГАОУ ВО Волгоградский государственный университет (Российская Федерация, 400062, г. Волгоград, проспект Университетский, д. 100), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9191-2862>, e-mail: valeryzaitsev@gmail.com

Author's Information

Babakova Tatiana Sergeevna, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Selection, Federal Research Centre of Agroecology, Complex Reclamation and Protective Forest Breeding of the Russian Academy of Sciences (Russian Federation, 400062, Volgograd, Universitetskiy Prospekt, 97), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5593-0286>, e-mail: babakova-t@vfanc.ru

Fefelova Natalya Petrovna, Research Engineer of the Laboratory of Molecular Selection of the Federal Research Centre of Agroecology, Complex Reclamation and Protective Forest Breeding of the Russian Academy of Sciences (Russian Federation, 400062, Volgograd, Universitetskiy Prospekt, 97), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8219-6291>, e-mail: fefelova-n@vfanc.ru

Kakotkina Margarita Sergeevna, research engineer of the molecular selection laboratory of the Federal Research Centre of Agroecology, Complex Reclamation and Protective Forest Breeding of the Russian Academy of Sciences (Russian Federation, 400062, Volgograd, Universitetskiy Prospekt, 97), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4068-0552>, e-mail: samycheva-ms@vfanc.ru

Matveeva Sofia Vladimirovna, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Selection, Federal Research Centre of Agroecology, Complex Reclamation and Protective Forest Breeding of the Russian Academy of Sciences (Russian Federation, 400062, Volgograd, Universitetskiy Prospekt, 97), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4290-2021>, e-mail: matveeva-s@vfanc.ru

Vasilyeva Alyona Aleksandrovna, laboratory assistant-researcher of the laboratory of molecular selection of the Federal Research Centre of Agroecology, Complex Reclamation and Protective Forest Breeding of the Russian Academy of Sciences (Russian Federation, 400062, Volgograd, Universitetskiy Prospekt, 97), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4734-5300>, e-mail: vasilieva-aa@vfanc.ru

Popova Anna Sergeevna, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Selection, Federal Research Centre of Agroecology, Complex Reclamation and Protective Forest Breeding of the Russian Academy of Sciences (Russian Federation, 400062, Volgograd, Universitetskiy Prospekt, 97), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5983-4080>, e-mail: popova-a@vfanc.ru

Zaitsev Valery Gennadievich, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Bioengineering and Bioinformatics, Volgograd State University (Russia, 400062, Volgograd, Universitetskiy Avenue, 100), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9191-2862>, e-mail: valeryzaitsev@gmail.com