

СЕЛЕКЦИЯ *IN VITRO* *IPOMOEA BATATAS* (L.) К ГИПОТЕРМИЧЕСКОМУ СТРЕССУ

Киракосян Рима Нориковна, к.б.н., доцент, доцент кафедры биотехнологии, E-mail: mia41291@mail.ru

Абубакаров Халид Геланьевич, аспирант кафедры биотехнологии

Сумин Антон Вадимович, ассистент кафедры биотехнологии

Десятерик Анастасия Александровна студент кафедры биотехнологии

Калашикова Елена Анатольевна, д.б.н., профессор, зав. кафедрой биотехнологии, E-mail: kalash0407@mail.ru

ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А.Тимирязева»

Аннотация. В работе приведены результаты по клеточной селекции батата на устойчивость к низким положительным температурам. Установлено, что культивирование каллусной ткани, полученной из листовых сегментов асептических растений батата на питательной среде МС, содержащей препарат Мивал или препарат Крезацин в концентрации 150 мг/л позволяет получать устойчивые клеточные линии. Из устойчивых каллусных культур получены растения-регенеранты.

Ключевые слова: клеточная селекция, культура тканей, каллус *in vitro*, гипотермический стресс

Введение. Изменение климата, увеличение численности населения на планете, ухудшение экологической обстановки, требует уделить особое внимание селекционерам на создание новых форм, сортов и гибридов сельскохозяйственных растений, обладающих устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды. Перспективным направлением исследований, является биотехнология растений, в частности, применение клеточной селекции, в результате которого получают новые формы растений с заранее заданными признаками [1]. Данное направление исследований актуально для *Ipomoea batatas* (L.), так как ареал возделывания данной культуры очень ограничен. Как правило, культуру выращивают в ограниченных регионах с достаточно жарким климатом. Ценность батата заключается в том, что в клубнеплодах синтезируется инулин - природный полисахарид не имеющий синтетических аналогов. В пищевой промышленности РФ используют импортный инулин, привезенный из Германии, Бельгии и Китая. В настоящее время глобализация и информационная революция обострили существенные проблемы мировой экономики. Поэтому необходимо пересмотреть системы управления производством и получать свою конкурентоспособную продукцию высокого качества. Применение методов клеточной инженерии в селекции позволяет получать устойчивые формы растений за короткий промежуток времени [2].

Цель работы – разработать технологию клеточной селекции батата на устойчивость к гипотермическому стрессу.

Материалы и методы. Объектом исследования служили клубнеплоды батата сорта Джемел (Jewel). Сорт привезен в Россию из США, выведен селекционерами университета Северной Каролины. Этот сорт называют еще «королевой бататов». Кожура имеет оранжевый цвет, мякоть — интенсивно-оранжевая, вкус — сладкий, консистенция — влажная. Сорт средне-ранний. Первичным эксплантом служили листовые сегменты, изолированные с асептических растений батата. Для получения стерильного растительного материала применяли ступенчатую стерилизацию: 1) проростки первоначально стерилизовали в 70% спирте в течение 40 секунд; 2) затем промывали стерильной дистиллированной водой 3 раза; 3) далее помещали в 0,1% раствор сулемы ($HgCl_2$) на 8 минут; 4) после чего промывали их в стерильной дистиллированной воде; 5) затем помещали на безгормональную питательную среду, содержащую $\frac{1}{2}$ минеральных солей по прописи Мурасиге – Скуга (МС) [4], 3% сахарозы и 0,7% агара. рН среды составлял 5.5...5.8. Каллусную ткань получали на питательной среде МС, содержащей НУК в концентрации 1 мг/л в сочетании с БАП 0,5 мг/л. Пересадку каллусной ткани осуществляли один раз в 4 недели. Каллусную ткань выращивали в световой комнате, при температуре 22...24°C., с фотопериодом 16 ч, при освещении белыми люминесцентными лампами (марка «OSRAM AG 36/25» с интенсивностью 3 тыс. лк, и плотностью потока фотонов (ППФ) 150...180 мкмоль/м²·сек. Клеточную селекцию *in vitro* проводили на хорошо пролиферирующей каллусной ткани. В качестве адаптагена использовали препарат Мивал и препарат Крезацин в концентрации 150 мг/л. Контролем служила питательная среда без исследуемых препаратов. Каллусную ткань контрольного и опытных вариантов выращивали в условиях термостата при температуре 140С и в условиях световой комнаты при температуре 230С в течение 30 суток. В работе придерживались правил работы в стерильных условиях, изложенных в методических рекомендациях, разработанных на кафедре биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева [3]. Исследования проводили в двух аналитических и десяти биологических повторностях. Результаты статистически обрабатывали в программах MS Excel и AGROS (версия 2.11, Россия). Данные в таблицах представлены в виде средней арифметической со стандартной ошибкой ($M \pm mM$). Оценка различий выборочных средних проведена при значении доверительной вероятности 0,95.

Результаты и их обсуждение. Каллусогенез высших растений *in vitro* находится под контролем многих факторов, взаимосвязанных между собой. Известно, что управлять процессом каллусогенеза можно путем изменения гормонального статуса питательных сред, изменением условий освещения, рН среды и др. Однако, данный подход не всегда эффективен при изучении способности исследуемых эксплантов формировать каллусную ткань. Наши эксперименты показали, что образовании каллусной ткани происходило в местах среза и поранений первичного экспланта. Начало каллусогенеза отмечено на 12-15 сутки с начала культивирования и, как правило, каллусная ткань формировалась средней плотности, светло-желтого цвета из мезофилла листовой

пластинки, располагающейся между центральной и боковых жилок. Полученная каллусная ткань была размножена путем пересадки ее на свежую питательную среду в течение 3 пассажей. В дальнейшем ее использовали в работе по клеточной селекции. Известно, что для растений батата критической температурой при выращивании является 14⁰С. При такой температуре наблюдается замедление роста зеленой биомассы. Однако для растений батата выявлена и температура 10⁰С, при которой полностью останавливается обмен веществ и формирование клубнеплодов прекращается. Исходя из этого, в работе по селекции *in vitro* батата на устойчивость к гипотермическому стрессу нами был испытан только один температурный режим - 14⁰С. В качестве адаптогена в состав питательной среды добавляли препарат Мивал или препарат Крезацин в концентрации 150 мг/л. Экспериментально установлено, что изучаемые препараты оказали существенное влияние на жизнеспособность каллусной культуры в условиях гипотермического стресса (14⁰С). В этих вариантах жизнеспособность клеток составила 56,1...68,5%, в то время как в контрольном варианте этот показатель не превышал 3,5-4,2%. В контрольном варианте в каллусной ткани образовывались некротические участки, что приводило к частичной или полной гибели ткани. В дальнейшем каллусные культуры после гипотермического стресса были перенесены на питательные среды для регенерации. В качестве индуктора морфогенеза использовали цитокинин БАП в концентрации 1 мг/л в сочетании с ауксином ИУК 0,5 мг/л. В результате селекции *in vitro* получено 43 растения, которые можно использовать в качестве исходного материала для включения их в процесс классической селекции по созданию новых сортов батата устойчивых к низким положительным температурам.

Заключение. Таким образом, в результате проведенных исследований была разработана технология быстрого получения новых форм батата, обладающих устойчивостью к гипотермическому стрессу. Включение полученных форм в схему классической селекции позволит в значительной степени ускорить селекционный процесс. Работа выполнена в рамках тематического план-задания на выполнение научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» по заказу Минсельхоза России за счет средств федерального бюджета в 2022 году.

Библиографический список

1. Калашникова Е.А. Клеточная инженерия растений. Учебник и практикум для вузов. 2-е изд. / Е.А. Калашникова. – М.: Издательство Юрайт, 2020. – 333 с.
2. Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н. Современные аспекты биотехнологии. – М.: РГАУ-МСХА, 2016. – 145 с.
3. Калашникова Е.А., Чередниченко М.Ю., Киракосян Р.Н., Зайцева С.М. Лабораторный практикум по культуре клеток и тканей растений. – М.: КноРус, 2017. – 163 с.
4. Murashige T. A, Skoog F. / Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. – V.15. – P.473-497.