

УДК 576.54

DOI: 10.31857/2500-2082/2022/6/43-46, EDN: KDJKZU

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ  
УСТОЙЧИВЫХ ФОРМ БАТАТА (*IPOMOEA BATATAS* L.)  
К ГИПОТЕРМИЧЕСКОМУ СТРЕССУ\***

**Елена Анатольевна Калашникова<sup>1</sup>, доктор биологических наук, профессор, ORCID: 0000-0002-2655-1789**

**Рима Нориковна Киракосян<sup>1</sup>, кандидат биологических наук, ORCID: 0000-0002-5244-4311**

**Светлана Михайловна Зайцева<sup>1</sup>, кандидат биологических наук, ORCID: 0000-0001-9137-3774**

**Антон Вадимович Сумин<sup>1</sup>, ассистент, ORCID: 0000-0003-4929-1796**

**Халид Геланиевич Абубакаров<sup>1</sup>, аспирант**

**Анастасия Андреевна Десятерик<sup>1</sup>, студент, ORCID: 0000-0003-3045-8023**

**Сулухан Кудайбердиевна Темирбекова<sup>2</sup>, доктор биологических наук, профессор, ORCID: 0000-0001-9824-6364**

**Ольга Викторовна Мелешина<sup>2</sup>, кандидат сельскохозяйственных наук**

<sup>1</sup>Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, г. Москва, Россия

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Московская обл., Россия

E-mail: sul20@yandex.ru

**Аннотация.** Исследования по клеточной селекции батата (*Ipomoea batatas* L.) на устойчивость к гипотермическому стрессу в России и мире ранее не проводили. Цель – разработать технологию *in vitro* получения устойчивых форм растений бата-

\* Работа выполнена при поддержке Министерства сельского хозяйства в рамках выполнения научно-технического задания на 2022 год / The work was carried out with the support of the Ministry of Agriculture as part of the implementation of the scientific and technical task for 2022.

та к положительным низким температурам. Объект изучения — клубнеплоды батата сорта Джевел (*Jewel*). Первичным эксплантом служили молодые листья, изолированные с асептических растений, которые культивировали на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи МС, а также НУК в концентрации 1 мг/л в сочетании с БАП 0,5 мг/л. В этих условиях формировалась каллусная ткань, которая в дальнейшем была использована в клеточной селекции. Каллусы выращивали в термостате при температуре 14°C в течение 30 суток. Установлено, что присутствие препаратов Мивал или Крезацин в концентрации 150 мг/л в составе питательной среды положительно влияет на жизнеспособность каллусной культуры при гипотермическом стрессе (14°C). В этих вариантах жизнеспособность клеток составила 56,1...68,5%, а в контрольном — 3,5—4,2%. Из устойчивых клеточных культур получены растения-регенранты батата.

**Ключевые слова:** культура *in vitro*, батат, клеточная селекция, холодоустойчивость, микроклоны

## BIOTECHNOLOGICAL METHODS FOR OBTAINING SWEET POTATO (*IPOMOEA BATATAS* (L.) FORMS RESISTANT TO HYPOTHERMIC STRESS RESISTANCE

E.A. Kalashnikova<sup>1</sup>, *Grand PhD in Biological Sciences, Professor*

R.N. Kirakosyan<sup>1</sup>, *PhD in Biological Sciences*

S.M. Zaitseva<sup>1</sup>, *PhD in Biological Sciences*

A.V. Sumin<sup>1</sup>, *assistant*

H.G. Abubakarov<sup>1</sup>, *postgraduate student*

A.A. Desyaterik<sup>1</sup>, *student*

S.K. Temirbekova<sup>2</sup>, *Grand PhD in Sciences, Professor*

O.V. Meleshina<sup>2</sup>, *PhD in Agrocultural Sciences*

<sup>1</sup>Russian State Agrarian University — MTAA, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Federal Scientific Vegetable Center, Moscow region, Russia

E-mail: sul20@yandex.ru

**Abstract.** The creation of new forms, hybrids and varieties of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* (L.)) resistant to hypothermic stress is an urgent area of research. Studies on the cell selection of sweet potatoes for resistance to this stress have not been conducted in Russia and the world before. The aim of the work is to develop *in vitro* technology for obtaining resistant forms of sweet potato plants to positive low temperatures. The object of the study was sweet potato tubers of the Jewel variety. The primary explant was young leaves isolated from aseptic plants, which were cultivated on a nutrient medium containing mineral salts according to the MS recipe, as well as NAA at a concentration of 1 mg/l in combination with BAP 0.5 mg/l. Under these conditions, callus tissue was formed, which was later used in cell selection. The callus was grown in a thermostat at 14°C for 30 days. It was found that the presence of Mival or Crezacin preparations at a concentration of 150 mg/l in the nutrient medium has a significant positive effect on the viability of the callus culture under hypothermic stress (14°C). In these variants, cell viability was 56.1...68.5%, and in the control variant — 3.5...4.2%. Yam regenerant plants were obtained from stable cell cultures.

**Keywords:** *in vitro* culture, sweet potato, cell selection, cold resistance, microclones

Современное развитие экономики Российской Федерации страны связано с импортозамещением. Необходимо пересмотреть системы управления производством и получать свою конкурентоспособную продукцию высокого качества.

Одно из направлений научных исследований — создание новых форм, гибридов и сортов сельскохозяйственных растений с повышенной продуктивностью, а также устойчивостью к различным стрессовым факторам окружающей среды. [2] Особый интерес представляет работа, направленная на получение растений с высоким биосинтетическим потенциалом накапливать минеральные и органические соединения, витамины, вещества фенольной природы и другие, оказывающие благоприятное действие на организм человека и животных. [4, 6] Вторичные соединения, обладающие сладким вкусом, принадлежат к разным химическим классам, например, лактонам и фенолам, флавоноидам, терпеноидам и сапонидам, а также белкам. Только несколько натуральных молекул (глициризин, стевиол) широко применяют из-за трудоемкости культивирования (растениям требуются особые условия для их роста) или отсутствия простых методов для выделения соединений.

Наиболее перспективная область развития пищевой промышленности — производство продуктов питания функционального и диетического назначения, в состав которых входят пищевые волокна, антиоксиданты, пребиотики. Потребление таких продуктов в России составляет примерно 1400 т/г. Внимание ученых привлекают растения, способные образовывать в тканях инулин — природный полисахарид не имеющий синтетических аналогов. Он содержится более чем в 3000 растений, преимущественно в их корнях и клубнях. Актуальным направлением исследований остается поиск альтернативных источников инулина.

Батат (*Ipomoea batatas* L.) — сельскохозяйственная культура, в корнеплодах которой содержится инулин. В мире возделывают около 6000 сортов батата. [5] В Российской Федерации сладкий картофель выращивают в регионах с жарким климатом, так как при 14°C замедляется рост зеленой биомассы растения, 10°C — полностью останавливается обмен веществ, и формирование клубнеплодов прекращается. Поэтому стоит задача получения толерантных к низкотемпературному стрессу растений батата для расширения районов его возделывания в РФ.

Клеточная селекция *in vitro* – наиболее перспективный метод биотехнологии в создании новых форм растений, обладающих устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессовым факторам окружающей среды. [2] Исследований по клеточной селекции *in vitro* батата к действию низких положительных температур не было.

Цель работы – провести клеточную селекцию батата на устойчивость к гипотермическому стрессу.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение стерильной культуры.** Объект исследования – клубнеплоды батата сорта *Джевел (Jewel)*. Сорт привезен в Россию из США, выведен селекционерами университета Северной Каролины. Кожура имеет оранжевый цвет, мякоть – интенсивно-оранжевая, вкус – сладкий, консистенция – влажная. Сорт средне-ранний.

В качестве первичных эксплантов использовали молодые проростки, изолированные с клубнеплодов батата. Работу выполняли в стерильных условиях по методическим рекомендациям, разработанным на кафедре биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. [3]

Для получения стерильного растительного материала применяли ступенчатую стерилизацию: 1) проростки стерилизовали в 70% спирте в течение 40 сек.; 2) промывали стерильной дистиллированной водой три раза; 3) помещали в 0,1% раствор сулемы ( $HgCl_2$ ) на 8 мин.; 4) промывали в стерильной дистиллированной воде; 5) помещали на безгормональную питательную среду, содержащую  $\frac{1}{2}$  минеральных солей по прописи Мурасиге-Скуга (МС), 3% сахарозы и 0,7% агара. [7] рН среды – 5,5...5,8.

**Каллусную ткань** получали из сегментов листовых пластинок, изолированных с асептических растений батата. Листья культивировали на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи МС, а также ауксин НУК в концентрации 1 мг/л в сочетании с БАП 0,5 мг/л. Каллусную ткань пересаживали один раз в четыре недели. При этом учитывали интенсивность образования каллуса, его консистенцию и цвет.

Каллусную ткань выращивали в световой комнате, при температуре 22...24°C, фотопериодом 16 ч и освещении белыми люминесцентными лампами OSRAM AG 36/25 с (интенсивность – 3 тыс. лк, плотность потока фотонов (ППФ) – 150...180 мкмоль/м<sup>2</sup>·сек.).

**Локализацию фенольных соединений** изучали в листьях асептических микроклонов батата, используя гистохимический метод с окрашиванием материала 0,08% раствором реактива Fast Blue. [8] Препараты просматривали с помощью светового микроскопа Karl Zeiss.

**Клеточную селекцию *in vitro*** проводили на хорошо пролиферирующей каллусной ткани. В качестве адаптагена использовали препараты Мивал Крезацин в концентрации 150 мг/л. Контроль – питательная среда без препаратов. Каллусную ткань контрольного и опытных вариантов выращивали в термостате при температуре 14°C и световой комнате (23°C) в течение 30 сут.

Для характеристики каллусной ткани определяли индекс роста (I) и удельную скорость роста ( $\mu$ ) по формулам:

$$I = \frac{X_{\max} - X_0}{X_0}, \quad \mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1},$$

где  $X_{\max}$  и  $X_0$  – максимальное и начальное значения массы каллусной ткани, мг,  $X_2$  и  $X_1$  – масса каллусной ткани (мг) в момент времени  $t_2$  и  $t_1$ , сут. соответственно.

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 ( $M \pm mM$ ). Оценивали различия выборочных средних при значении доверительной вероятности 0,95.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения на первом этапе клеточной селекции хорошо пролиферирующей каллусной ткани использовали питательную среду, определенную нами ранее экспериментальным путем. [4] При культивировании листовых эксплантов на оптимизированной питательной среде образование каллусной ткани наблюдали в местах среза и ранений первичного экспланта. Начало каллусогенеза отмечено на 12...15 сут. с начала культивирования и, как правило, каллусная ткань формировалась средней плотности, светло-желтого цвета из мезофилла листовой пластинки, располагающейся между центральной и боковых жилок (рис. 1 а, б, 2-я стр. обл.). Образование каллусной ткани в определенных местах зависело от наличия фенольных соединений и их локализации в первичных листовых пластинках. Нами показано, что фенольные соединения образуются и локализируются в большей степени в покровных и проводящих тканях, а также присутствуют в клетках паренхимы (рис. 1 в, г, 2-я стр. обл.).

Полученная каллусная ткань была размножена путем пересадки ее на свежую питательную среду в течение трех пассажей. Она характеризовалась высокими индексом роста (I) – 2,24 и удельной скоростью роста ( $\mu$ ) – 0,04 и в дальнейшем была использована в исследованиях по клеточной селекции батата на устойчивость к низким положительным температурам.

В качестве адаптогена в состав питательной среды добавляли препараты Мивал и Крезацин в концентрации 150 мг/л (табл. 1), так как доказано их положительное влияние на продуктивность сельскохозяйственных культур: пшеница, овес, шпинат, картофель и другие, выращиваемые в нормальных и стрессовых условиях. [1] Один из основных компонентов препаратов – кремний, который выступает в роли активатора физиологических процессов в клетке, облегчает выброс шлаков и ускоряет процессы метаболизма, обеспечивает функциональную активацию клеточных органелл. Кремний способствует образованию соединений, которые связывают

**Морфометрические характеристики каллусной ткани батата, культивируемой в разных температурных условиях**

Вариант	Жизнеспособность, %	Цвет	Индекс роста (I)	Удельная скорость роста (m)
14°C				
Контроль	3,5...4,2	Коричневый	0	0
Мивал	68,5±2,0	Светло-желтый	1,61	0,02
Крезацин	56,1±3,1	Светло-желтый	1,03	0,01
23°C				
Контроль	97,2...100	Светло-желтый	2,24	0,04
Мивал	100	Светло-желтый	2,61	0,05
Крезацин	100	Светло-желтый	2,23	0,04

свободную воду в клетке, повышая ее водоудерживающую способность. Таким образом, кремний препятствует образованию кристаллов льда при заморозке и испарению воды при высокой температуре в засуху.

Экспериментально установлено, что изучаемые препараты существенно влияют на жизнеспособность каллусной культуры (56,1...68,5%) в условиях гипотермического стресса (14°C), в контрольном варианте этот показатель не превышал 3,5...4,2%. В каллусной ткани образовывались некротические участки, что приводило к частичной или полной гибели ткани (рис. 2, 2-я стр. обл.).

При стандартных режимах выращивания каллусной ткани (23°C) влияние препаратов не было существенным. Во всех вариантах наблюдали активную пролиферацию клеток, что подтверждается высоким индексом роста (I). Препарат Мивал оказал стимулирующий эффект на рост каллусных культур, а действие препарата Крезацин достоверно не отличалось от контрольного варианта.

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 получено 43 растения, у которых формировались мелкие листья, отмечен слабый рост побегов, но образовывалась мощная корневая система (рис. 2 г, 2-я стр. обл.). Полученные после клеточной селекции растения можно использовать в качестве исходного материала для включения их в процесс классической селекции по созданию новых сортов батата устойчивых к положительным пониженным температурам.

Таким образом, были определены условия для проведения клеточной селекции, обеспечивающие получение с высокой эффективностью растения батата устойчивые к гипотермическому стрессу. Это позволит расширить ареал возделывания культуры, в частности, выращивать в Московской области.

**СПИСОК ИСТОЧНИКОВ**

1. Воронков, М.Г., Расулов М.М. Трекрезан – родоначальник нового класса адаптогенов и иммуномодуляторов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2007. № 41 (1). С. 3–7.
2. Калашникова Е.А. Клеточная инженерия растений: учебник и практикум для вузов. М.: Юрайт, 2020. 333 с.
3. Калашникова Е.А., Чередниченко М.Ю., Киракосян Р.Н. и др. Лабораторный практикум по культуре клеток и тканей. М.: КноРус, 2017. 163 с.
4. Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н., Десятерик А.А. Роль светового режима в регулировании продукционного процесса растений в системе интенсивного культивирования in vitro // Естественные и технические науки. 2021. № 5 (156). С. 58–63.
5. Alam M.K. A comprehensive review of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam): Revisiting the associated health benefits // Trends in Food Science & Technology. 2021. V. 115. P. 512–529.
6. Franck A. Technological functionality of inulin and oligofructose. // Br. J. Nutr. 2002. V. 87. S. 287–291.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473–497.
8. Soukupova J., Cvikrova M., Albrechtova J. et al. Histochemical and Biochemical Approaches to the Study of Phenolic Compounds and Peroxidases in Needles of Norway Spruce (*Picea abies*) // New Phytol. 2000. V. 146. P. 403–414.

**REFERENCES**

1. Voronkov, M.G., Rasulov M.M. Trekrezan – rodonachal'nik novogo klassa adaptogenov i immunomodulyatorov (obzor) // Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. 2007. № 41 (1). S. 3–7.
2. Kalashnikova E.A. Kletochnaya inzheneriya rastenij: uchebnik i praktikum dlya vuzov. M.: Yurajt, 2020. 333 s.
3. Kalashnikova E.A., Cherednichenko M.Yu., Kirakosyan R.N. i dr. Laboratornyj praktikum po kul'ture kletok i tkanej. M.: KnoRus, 2017. 163 s.
4. Kalashnikova E.A., Kirakosyan R.N., Desyaterik A.A. Rol' svetovogo rezhima v regulirovanii produkcionnogo processa rastenij v sisteme intensivnogo kul'tivirovaniya in vitro // Estestvennye i tekhnicheskie nauki. 2021. № 5 (156). S. 58–63.
5. Alam M.K. A comprehensive review of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam): Revisiting the associated health benefits // Trends in Food Science & Technology. 2021. V. 115. P. 512–529.
6. Franck A. Technological functionality of inulin and oligofructose. // Br. J. Nutr. 2002. V. 87. S. 287–291.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473–497.
8. Soukupova J., Cvikrova M., Albrechtova J. et al. Histochemical and Biochemical Approaches to the Study of Phenolic Compounds and Peroxidases in Needles of Norway Spruce (*Picea abies*) // New Phytol. 2000. V. 146. P. 403–414.