

На правах рукописи

АБУБАКАРОВ ХАЛИД ГЕЛАНИЕВИЧ

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ МОРФОГЕНЕЗ И СЕЛЕКЦИЯ *IN VITRO*
ПРОМОЕА ВАТАТАС (L.) ЛАМ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ГИПОТЕРМИИ**

Специальность 1.5.6. - Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2023

Диссертация выполнена на кафедре биотехнологии ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Научный руководитель: **Киракосян Рима Нориковна**, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Официальные оппоненты: **Шуплецова Ольга Наумовна**, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологических методов селекции сельскохозяйственных растений ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого»

Домблидес Елена Алексеевна, кандидат сельскохозяйственных наук, заведующая лабораторией репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений, ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства»

Ведущая организация: ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»

Защита состоится «27» июня 2023 года в 14:00 час. на заседании диссертационного совета 35.2.030.09, созданного на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» по адресу: 127434, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 19.

Юридический адрес для отправки почтовой корреспонденции (отзывов): 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Н.И. Железнова ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» и на сайте www.timacad.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

И.о. ученого секретаря
диссертационного совета 35.2.030.09,
доктор сельскохозяйственных наук, доцент

И.И. Дмитриевская

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Одним из направлений селекции является получение новых форм, гибридов и сортов сельскохозяйственных растений, обладающих повышенной продуктивностью, а также устойчивостью к различным стрессовым факторам окружающей среды. Особый интерес представляют исследования, направленные на получение растений, обладающих высоким биосинтетическим потенциалом накапливать минеральные и органические соединения, витамины, вещества фенольной природы и др., которые оказывают благоприятное действие на организм как человека, так и животных. Особый интерес, в последнее время, привлекают растения, способные образовывать в тканях инулин - природный полисахарид не имеющий синтетических аналогов. Среди сельскохозяйственных растений первое место по содержанию инулина занимают топинамбур и цикорий. Однако поиск альтернативных источников инулина остается актуальным направлением исследований. Одной из перспективных сельскохозяйственных культур является батат.

Батат или сладкий картофель (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) - двудольное растение, относящееся к семейству Convolvu - laseae. Во всем мире батат возделывают на площади примерно 8,1 млн га с общим годовым производством 106-110 млн тонн (Ogero, Gitonga, Mwangi, et all, 2011; FAO (2011)). Интерес к данной культуре связан прежде всего с тем, что клубни являются источником минералов, витаминов, антиоксидантов и, конечно, инулина (Tumwegamire, Kapinga, Rubaihayo, et al., 2011).

В мире существует около 6000 сортов батата, которые возделывают в разных странах (Abubakar, Yahaya, Shaibu, et al., 2018; Melissa, Blay, Amisah, 2019): Перу, Колумбия, США, Израиле, Китае, Индии, Индонезии, Грузии, странах Средней Азии и в Украине. В Российской Федерации сладкий картофель возделывают в южных районах с достаточно жарким климатом, поэтому для расширения ареала возделывания батата в РФ необходимо создавать сорта с повышенной устойчивостью к низким положительным температурам.

Культура изолированных клеток и тканей растений – перспективное направление исследований, позволяющее получать генетически однородный, оздоровленный посадочный материал, проводить работы по селекции *in vitro*, и др. Работы по культивированию батата в условиях *in vitro* проводятся в различных лабораториях ряда стран Африки, Азии, Латинской Америки (Liu, Zhai, Wang, Zhang, 2001; Tewodros, 2010; Doliński, Olek, 2013; Addae-Frimpomaah, Amponsah, Tengey, 2014). Однако, предлагаемые технологии мало воспроизводимы и зависят от исследуемого генотипа.

Цель работы – разработать высокоэффективную технологию быстрого размножения и получения форм батата (*Ipomoea batatas* (L.)), устойчивых к низким положительным температурам в культуре *in vitro*.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- разработать протокол получения хорошо растущей стерильной культуры батата исследуемых сортов;
- изучить влияние условий культивирования (факторов гормональной и минеральной природы) на морфогенетический потенциал культивируемых эксплантов на разных этапах клонального микроразмножения;
- изучить влияние спектрального состава света на морфогенетический потенциал культивируемых эксплантов *in vitro*;
- изучить влияние гормонального состава питательной среды на формирование каллусной ткани и регенерацию из нее растений;
- изучить зависимость образования и локализации фенольных соединений в каллусной ткани от применяемых ауксинов;
- изучить влияние экзогенных регуляторов роста (препарат Мивал и препарат Крезацин) на устойчивость к гипотермическому стрессу каллусных культур батата;
- изучить химический состав клубнеплодов после клеточной селекции.

Научная новизна. Впервые создана коллекция *in vitro* асептических растений и разработана технология получения высококачественного посадочного материала батата методами клонального микроразмножения. Установлено, что наилучшим первичным эксплантом при клонировании батата являются изолированные микрочеренки, которые необходимо культивировать на питательной среде МС, содержащей $\frac{1}{2}$ нормы минеральных солей, а также БАП или кинетин в концентрации 0,5 мг/л в сочетании с ИУК 0,5 мг/л, что способствует получению максимального коэффициента размножения – 9. Экспериментально доказано, что применение ИМК в концентрации 0,5 мг/л на третьем этапе клонального микроразмножения оказывает существенное влияние на укоренение микропобегов батата. В этих условиях укореняемость микропобегов составила 100%, а длина корневой системы достигала 18-20 см.

Впервые проведены исследования по влиянию светокультуры на морфобиометрические показатели микроклонов батата изучаемых генотипов. Экспериментально доказано, что красный (R) и дальний красный (FR) спектр света в разных соотношениях усиливает рост корней и надземной биомассы микроклонов. Наилучшие результаты получены при соотношении R=FR. Установлено, что красный и синий спектр в разных соотношениях (К 70%: С

30%, К 30%:С 70%) не приводит к повышению морфогенетического потенциала культивируемых эксплантов. Удельная скорость роста (μ) основного и пазушных побегов была в 2 раза меньше, чем в контрольном варианте (освещение люминесцентными лампами).

Впервые для микроклонов батата показано, что применение аэропонной установки на последнем этапе клонального микроразмножения, позволяет проводить быструю адаптацию растений к условиям *ex vitro*, а также способствует активному росту как надземной, так и корневой системы клонированных растений.

На основании проведенных комплексных исследований установлено, что НУК в концентрации 0,5 мг/л способна индуцировать образование каллусной ткани, сохраняющей высокую пролиферативную активность на протяжении длительного культивирования. Дополнение питательной среды БАП в концентрации 5 мг/л способствует получению растений-регенерантов из каллусной ткани с частотой 31,8 – 40,2%.

Впервые для растений батата проведена клеточная селекция *in vitro* на устойчивость к гипотермическому стрессу. Установлено, что добавление в состав питательной среды МС препарат Мивал в концентрации 150 мг/л приводит к выживанию в 56,1-68,5% случаев каллусной ткани батата в условиях пониженной положительной температуры. В результате селекции *in vitro* получены растения-регенеранты и в условиях *ex vitro* – клубнеплоды. Химический анализ показал, что в клубнеплодах растений-регенерантов увеличивается содержание сахарозы и клетчатки, и уменьшается содержание крахмала.

На основе полученных данных разработаны технологии, которые подтверждены патентами: 1) Способ получения безвирусного, генетически однородного посадочного материала батата (*Ipomoea batatas* (L.)) *in vitro* (заявка №2021131437, от 27 октября 2021 г); 2) Способ получения холодоустойчивого посадочного материала батата (заявка № 2022100715, от 11 января 2023 г.).

Практическая значимость. Предложенная технология культивирования батата в условиях *in vitro* может быть применена и для размножения других видов семейства Convolvulaceae (Вьюнковые). Разработанные методы адаптации растений *I. batatas* к условиям *ex vitro* могут позволить получать более качественный растительный материал и снизить потери на этапе адаптации. Предлагаемая технология может быть применена не только к данному научному объекту, но и к растениям других таксономических групп. Полученные результаты можно использовать в учебном процессе при проведении лекционных и лабораторно-практических работ по дисциплинам: «Физиология растений», «Сельскохозяйственная биотехнология»,

«Прикладная биотехнология», «Культура клеток и тканей растений» для студентов, обучающихся по направлениям «Биотехнология» и «Агрономия».

Методология и методы исследования. Основой методологии данного исследования являются методы культуры клеток и тканей растений и биохимического анализа основных показателей в корнеплодах и фенольных соединений в каллусной ткани. Объектом исследования является батат (*I. batatas* (L.)) девяти сортов (Винницкий розовый, Пурпл (Purple), Тайнунг Т-65, Рубин Каролины, Жевел (Jewel), Американский бежевый, Мускатный, Порту Баттераба, Порто Рико), предметом – режимы культивирования изолированных тканей и органов *in vitro* в контрольных и стрессовых условиях, управление морфогенезом *in vitro*, технология клонального микроразмножения.

Апробация работы. Основные положения и результаты исследований были представлены на научных конференциях: Всероссийская научная конференция с международным участием «Растениеводство и луговодство» (Москва, 2020); Международная научная конференция молодых ученых и специалистов, посвященной 135-летию со дня рождения А.Н.Костякова (Москва, 2022); Всероссийская конференция молодых исследователей «Аграрная наука-2022» (Москва, 2022).

Публикации. По материалам диссертации опубликована 12 научных работ в отечественных и зарубежных изданиях, в том числе 2 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК, 2 статьи в изданиях Web of Science, Scopus, 6 – в других изданиях, 2 патента.

Личный вклад соискателя. Результаты исследований, представленные в диссертации, получены соискателем и под его руководством на кафедре биотехнологии ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева. Автором разработана тема исследования, получены основополагающие результаты, подготовлены и опубликованы научные статьи по теме диссертации в соавторстве.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 123 страницах; состоит из введения, 4 глав; содержит 15 таблиц, 44 рисунка. Библиографический список включает 145 источника, в том числе 108 – на иностранных языках и 6 – интернет источников.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объект исследования. В работе исследовали 9 сортов овощного батата (Винницкий розовый, Пурпл (Purple), Тайнунг Т-65, Рубин Каролины, Жевел (Jewel), Американский бежевый, Мускатный, Порту Баттераба,

Порто Рико). Исследуемые сорта отличаются цветом мякоти и кожурой клубнеплодов, а также разными сроками созревания.

Первичным эксплантом служили черенки, или верхушки побегов, изолированные с проросших клубнеплодов батата.

Получение стерильной культуры. Перед введением в культуру *in vitro* клубнеплоды батата помещали во влажный почвенный субстрат для активации роста спящих меристем. Со сформировавшихся побегов в дальнейшем нарезали первичные экспланты (черенки с одной пазушной почкой и верхушки побегов). Первичные экспланты перед введением в культуру *in vitro* подвергали поверхностной стерилизации 0,1%-ный раствором сулемы (HgCl_2) в течение 10 минут, после чего их промывали трижды стерильной дистиллированной водой и помещали на питательную среду МС в биологические пробирки.

Питательные среды для культивирования изолированных эксплантов *in vitro*. Для активации роста существующих меристем, микрочеренки культивировали на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи Мурасига и Скуга (МС), в концентрациях 1/2 МС, 1/3 МС, 1 МС и 1 1/2 МС. Кроме того, в работе изучали влияние различных регуляторов роста на морфогенетическую активность культивируемых эксплантов: БАП, кинетин в концентрациях 0,5-2 мг/л и препарат Дропп в концентрациях 0,1-1 мг/л. В качестве ауксина во всех вариантах питательных сред использовали ИУК в концентрации 0,5 мг/л.

Пересадку микрочеренков на свежую питательную среду осуществляли один раз в 6 недель. При этом учитывали: количество адвентивных побегов (шт) и их высоту (см), наличие корней (%) и их длину (см).

Укоренение микропобегов осуществляли на питательной среде 1/2 МС с добавлением ИУК и ИМК в концентрациях 0,5 и 1 мг/л. При этом учитывали укореняемость микропобегов (%), а также индекс роста корней (I) и удельную скорость роста корней (μ).

Для получения каллусной ткани использовали питательную среду, содержащую минеральные соли по МС, а также ауксины ИУК, НУК или 2,4-Д в концентрации 1 мг/л в сочетании с БАП 0,5 мг/л. В качестве первичных эксплантов использовали сегменты листовых пластинок и междоузлий. Пересадку каллусной ткани на свежую питательную среду осуществляли один раз в 4 недели. При этом учитывали: интенсивность образования каллуса, его консистенцию и цвет.

Выращивание микрочеренков в условиях светокультуры.

Выращивание в гроутентах

Исследуемые микрочеренки батата помещали в светонепроницаемые гроутенты (Urban Grower 60x60x200 см (Gorshkoff, Россия)) с излучением

выровненным по плотности потока фотосинтетических фотонов, и различным соотношением уровней излучения в области 660 нм (R - красный) и 730 нм (FR - дальний красный). Контрольный вариант размещали в световой комнате, где было создано освещение белыми линейно-люминесцентными лампами (марка «OSRAM AG», производство – Германия) с интенсивностью 150 мкмоль/м²с.

Варианты соотношения R/FR: 1) R/FR = 1, PPFD = 142 (±10) мкмоль/м²с; 2) R/FR = 1/2, PPFD = 142 (±10) мкмоль/м²с; 3) R/FR = 2, PPFD = 142 (±10) мкмоль/м²с; 4) Контроль: линейно-люминесцентные лампы, 4000К, PPFD 150 мкмоль/м²с.

Выращивание в светокультуре

1 вариант – облучатели на базе белых светодиодов (СД) цветовой температуры 3500 К и 6000 К, и монохроматический красных СД с пиком 660 нм (марка «OSRAM AG», производство – Германия) с интенсивностью 150 мкмоль/м²с.

2 вариант – многоканальный облучатель на базе белых светодиодов (СД) цветовой температуры 3500К и 6000К, и монохроматический красных и синих СД с пиками 660nm и 460nm соответственно. Мощность каналов монохроматических СД настроена в соотношении К:70% / С:30%.

3 вариант – многоканальный облучатель на базе белых светодиодов (СД) цветовой температуры 3500К и 6000К, и монохроматический красных и синих СД с пиками 660nm и 460nm соответственно. Мощность каналов монохроматических СД выставлена в соотношении К:30% / С:70%.

Измерения спектров излучения выполнены прибором PLA-20 (Everfine, Китай).

Для определения действия различных спектров на динамику роста микрочеренков и корневой системы определяли индекс роста (I) и удельную скорость роста (μ) 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 содержания клеток в 1 мл среды соответственно, кл/мл, X_2 и X_1 — высота побега/длина корневой системы (см), в моменты времени t_2 и t_1 , сут, соответственно.

Селекция *in vitro* к гипотермическому стрессу проводили на каллусной ткани, полученной из листовых сегментов асептических растений. Каллусную ткань культивировали на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи МС, НУК в концентрации 1 мг/л в сочетании с БАП 0,5 мг/л, а также препараты Мивал или Крезацин в концентрации 150 мг/л, выращивали в термостате при температуре 14⁰С. Контроль – питательная среда без добавления препаратов Мивал или Крезацин.

Адаптацию растений-регенерантов к условиям ex vitro проводили двумя способами: на аэропонной установке и непосредственно в почве.

Выращивание на аэропонике. В качестве оборудования для адаптации микрорастений использовали GrowPlant X-Stream 120 (Нидерланды) — аэропонный клонер на 120 посадочных мест с системой орошения корневой зоны. В установке применяли гранулированное минеральное удобрение «Растворин» (Россия), в состав которого включены: калий (от 18 до 28%), азот (8-18%), фосфор (5-18%), марганец 0,1%, бор 0,01%, медь 0,01%, цинк 0,01%, молибден 0,001%. Так же в систему добавляли 3 жидких комплексных минеральных удобрения марки General Hydroponics серии FloraSeries - FloraGrow, FloraBloom, FloraMicro.

Выращивание в почве. Адаптацию микрорастений в почвенных условиях проводили на стеллажах УГС-4. Источником освещения служили натриевые лампы ДНаТ, мощностью 400 Вт, цоколь Е40.

В качестве субстрата при адаптации в почвенных условиях использовали готовый грунт «Универсальный» (Россия) торговой марки «Родная Земля». Содержание питательных веществ, мг/л: суммарный азот (NH_4+NO_3) - не менее 240, фосфор (P_2O_5): не менее 290, калий (K_2O): не менее 330.

Выращивание в поле. Полученные микроклоны батата высаживали в грунт после установления погоды без заморозков. Работа выполнена на территории опытного поля ФГБНУ ВНИИ фитопатологии (ОПИ, Раменки, Одинцовского района, МО) при поддержке д.б.н. Темирбековой С.К. Почва опытного поля плодородная, по составу достаточно легкая и дренированная. Кислотность почвы была в пределах 5,5-6,5 pH. Урожай собирали в конце сентября, в ручную. Собранные клубнеплоды освобождали от остатков земли, подсушивали и отправляли на хранение.

Биохимические исследования. Определение основных биохимических показателей проводили в корнеплодах батата. Предварительно корнеплоды высушивали на лиофильной сушке, после чего их мелко измельчали с применением кофемолки. Методом ближней инфракрасной спектроскопии (БИК) определяли содержание следующих показателей (%): влажность, зола, клетчатка, протеин, жир, крахмал, сахар (модель прибора SpectraStar 2600XT-R), ГОСТы 30131–96, 32749–2014, 12099–2017. Кроме того, в корнеплодах были определены кальций и фосфор.

Суммарное содержание фенольных соединений (ССФС) определяли спектрофотометрическим методом в каллусной ткани по общепринятой методике (Запрометов, 1971) с реактивом Фолина-Дениса. В экстрактах спектрофотометрическим методом определяли содержание флаванов (с ванилиновым реактивом) и флавонолов (с хлористым алюминием). Калибровочные кривые для определения суммарного содержания

растворимых фенольных соединений и флаванов строили по (-)-эпикатехину, для определения флавонолов - по рутину (Запрометов, 1971).

Изучение локализации фенольных соединений проводили в листьях, стеблях и апикальной почке микроклонов батата, культивируемого *in vitro*. Локализацию фенольных соединений определяли гистохимическими методами: на сумму фенольных соединений материал окрашивали 0,08% раствором реактива Fast Blue (Soukupova, 2000), для изучения локализации флаванов (катехины и проантоцианидины) использовали реакцию с ванилиновым реактивом в парах соляной кислоты. С целью сохранения внутриклеточного распределения фенольных соединений, все реакции проводили в неполярных растворителях. Препараты просматривали с помощью светового микроскопа "Karl Ziess".

Статистическая обработка данных. Исследования проводили в 2 аналитических и 10 биологических повторностях. Статистическая обработка результатов проведена по стандартным методикам (Лакин, 1990). Данные в таблицах приведены в виде средней арифметической со стандартной ошибкой ($M \pm mM$). Оценка различий выборочных средних проведена при значении доверительной вероятности 0,95.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ МОРФОГЕНЕЗ *IPOMOEA BATATAS* (L.) *IN VITRO*

Введение первичных эксплантов в культуру *in vitro*

Исследования по клеточной инженерии растений начинаются с получения хорошо растущей стерильной культуры. Как показывают многочисленные публикации, выбор стерилизующего агента, его концентрации и экспозиции воздействия на первичный эксплант является важным этапом исследований, от которого зависит успех эксперимента.

Экспериментально установлено, что выбранный режим стерилизации (0,1% сулема в течение 10 мин) позволил получить хорошо растущую стерильную культуру в 100% случаев. Визуальные наблюдения показали, что при использовании в качестве первичного экспланта микрочеренков, уже на 7 сутки наблюдали активацию развития пазушных почек, формирование микропобегов и корневой системы в базальной части. В случае использования верхушки побегов, рост апикальных меристем не был отмечен (Рис. 1а,б). Причем эта особенность была нами отмечена в процессе всех циклов культивирования верхушек побегов *in vitro*. Отсутствие роста апикальных почек, нами было объяснено после проведения исследований по гистохимическому окрашиванию тканей. Установлено, что именно в апикальных почках, а также в листовых зачатках накапливаются в большом количестве фенольные соединения, которые, вероятно, и ингибировали деление и рост клеток (Рис. 1 в,г).

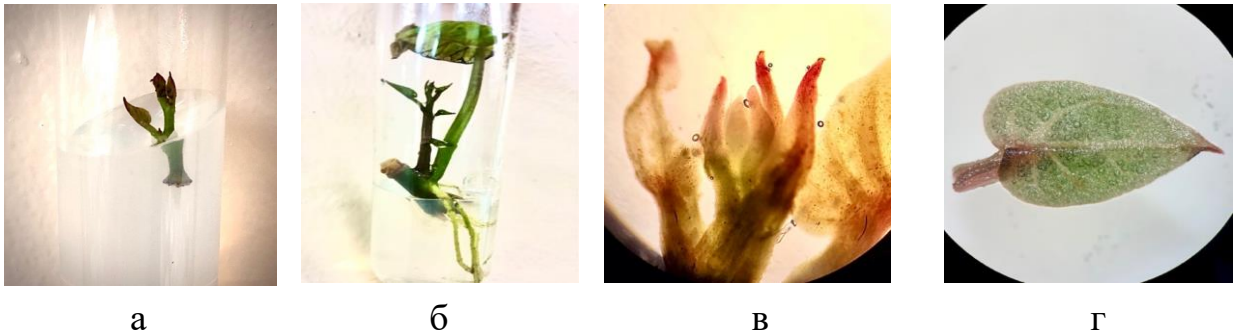


Рис. 1 Морфогенетическая активность первичных эксплантов (сорт Jewel): а – верхушка побега, б – микрочеренок, в - накопление фенольных соединений в апикальных почках, (г) – в листьях

Поэтому, исходя из полученных экспериментальных результатов, мы рекомендуем вводить в культуру *in vitro* только микрочеренки с одной или двумя пазушными почками.

Влияние минерального состава питательной среды на морфогенетический потенциал микрочеренков батата *in vitro*

Известно, что рост побегов зависит от сбалансированного состава минеральных солей в питательной среде. Поэтому в последующей серии экспериментов изучали влияние минеральных солей по прописи МС в концентрации $\frac{1}{2}$ нормы, $\frac{1}{3}$ нормы, 1 нормы и $1 \frac{1}{2}$ нормы.

Установлены некоторые закономерности роста и развития микропобегов из вегетирующих почек на разных питательных средах: 1) уже на 7 сутки с начала культивирования *in vitro* наблюдали активацию роста существующих меристем, 2) на 14 сутки наблюдали образование корневой системы в базальной части, 3) к концу первого пассажа формировались побеги высотой до 5-6 см с хорошо развитой корневой системой.

Следует отметить, что уменьшение минерального состава питательной среды приводила к интенсивному росту пазушных почек и наилучшие результаты по росту побегов и укоренению были получены на среде, содержащей минеральные соли МС в $\frac{1}{2}$ нормы. Установлено, что с увеличением концентрации солей в среде уменьшаются учитываемые биометрические показатели. Причем, ярко выраженный эффект влияния минеральных солей проявился на формировании побегов, в то время как на рост корней минеральный состав не оказал существенного влияния. Во всех вариантах средняя длина корней составила 6,5-7 см. Исключение составил вариант, в котором минеральные соли были увеличены в полтора раза. В этом варианте наблюдали ингибирующий эффект по отношению к росту корней и средняя длина не превышала 4 см, что примерно в 2 раза ниже по сравнению с наилучшим вариантом ($\frac{1}{2}$ МС) (Рис. 2).

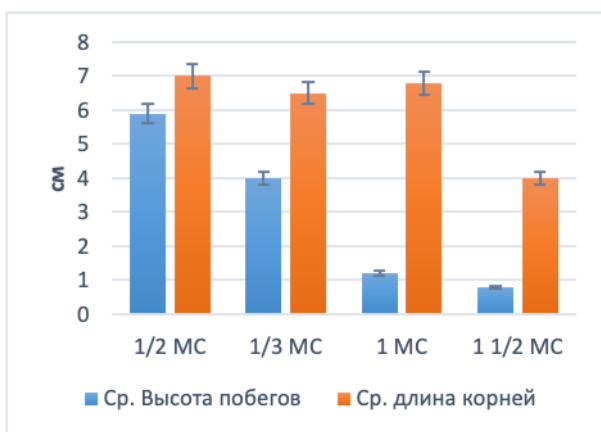


Рис. 2 Влияние минерального состава питательной среды на биометрические показатели адвентивных побегов (сорт Jewel)

Аналогичные результаты по активации развитию пазушных и адвентивных почек, а также их активному росту были получены и для других исследуемых сортов батата.

При визуальном обследовании сформировавшихся микропобегов, было обнаружено, что на вновь образовавшихся молодых листьях, на нижней ее части образовывались в массовом количестве прозрачные наросты. При более тщательном изучении было установлено, что это формируются секреторные образования - колетеры (клейкие волоски) (Рис. 3).

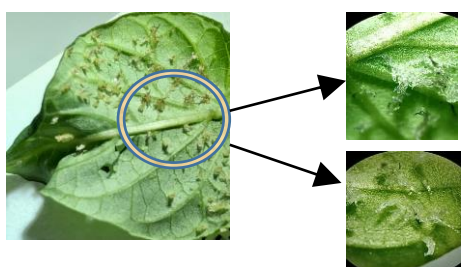


Рис. 3 Секреторные образования (колетеры) на нижней стороне листовой пластинки

Начало формирования колетер на листовой пластинке отмечено в середине пассажа, примерно через 15 суток с начала культивирования. Колетеры образовывались по всей нижней площади листа, асинхронно. Под бинокулярной лупой можно одновременно увидеть как молодые, так и старые колетеры которые перестают функционировать и приобретают темно-бурую окраску. Все колетеры – кистевидного типа. Внутри колетер находится клейкая жидкость, которая не растворяется в воде. На колетерах были обнаружены секреторные клетки, которые равномерно распределялись по всей поверхности выростов. Вероятно, образование колетер, связано с защитной реакцией растений от новых условий выращивания *in vitro*. Следует отметить, что массовое образование колетер на листьях было характерно для всех изучаемых сортов батата на первом пассаже. В процессе культивирования интенсивность образования уменьшалась и на 3 пассаже образование колетер на листьях не было обнаружено.

Влияние гормонального состава питательной среды на морфогенетический потенциал микрочеренков батата *in vitro*.

Исследования показали, что на 5% уровне значимости различия наблюдали в вариантах по таким показателям как: количество эксплантов, способных образовывать пазушные и адвентивные побеги (%), количеству полученных побегов с одного экспланта (шт) и выживаемость исследуемых эксплантов *in vitro* (%) (Табл.1).

Таблица 1 - Влияние гормонального состава питательной среды на морфогенетический потенциал микрочеренков батата (сорт Jewel) *in vitro*

Цитокинины мг/л	Учитываемые показатели		
	кол-во эксплантов, образующие пазушные и адвентивные побеги, %	кол-во побегов с одного эксплан- та, шт	выживаемость ис- следуемых эксплан- тов <i>in vitro</i> , %
БАП 0,5	77,4±3,9	3,2±0,2	100
БАП 1	38,1±3,1	1,8±0,5	89,3±1,9
БАП 2	25,6±0,9	1,6±0,3	79,6±2,6
Кинетин 0,5	85,2±4,6	3,9±0,1	100
Кинетин 1	45,7±2,8	2,6±0,1	83,4±4,7
Кинетин 2	37,7±3,1	2,0±0,4	79,5±4,0
препарат Дропп 0,1	23,7±1,9	1,5±0,2	98,5±1,3
препарат Дропп 1	20,9±1,6	0,8±0,1	85,8±4,4

Анализируя полученные результаты следует отметить, что с увеличением концентрации регуляторов роста в питательной среде, снижается способность эксплантов (микрочеренков) формировать пазушные и адвентивные побеги, рост которых так же снижается с увеличением концентрации гормонов. Установлено, что самые высокие показатели были получены на среде, содержащей кинетин в концентрации 0,5 мг/л, а самые низкие – на среде с препаратом Дропп. Вариант питательной среды, в котором присутствовал БАП – занимал промежуточное положение. Кроме того, были установлены различия по высоте побегов и количеству листьев из расчета на один побег (Рис. 4, 5).

Полученные результаты показали, что на среде ½ МС, содержащей 0,5 мг/л кинетина, получены самые высокие средние значения высоты побега (6,1 см) и количества листьев (9,2 шт). На втором месте по эффективности была среда МС, содержащая 0,5 мг/л БАП: средняя высота побегов составила 5,2 см, а среднее количество листьев – 8,2 шт. В остальных вариантах формировались медленно растущие побеги с очень укороченными междоузлиями.

Таким образом, применение кинетина или БАП в низких концентрациях (0,5 мг/л) способствует образованию дополнительных микропобегов и коэффициент размножения в этих вариантах был максимальным – до 9. Однако следует отметить, что подобранные условия культивирования батата сорта Jewel, не гарантирует получение таких

высоких показателей для других сортов. Поэтому наилучший и плохой состав питательной среды, был применен и для культивирования микрочеренков других исследуемых сортов батата (Табл. 2).

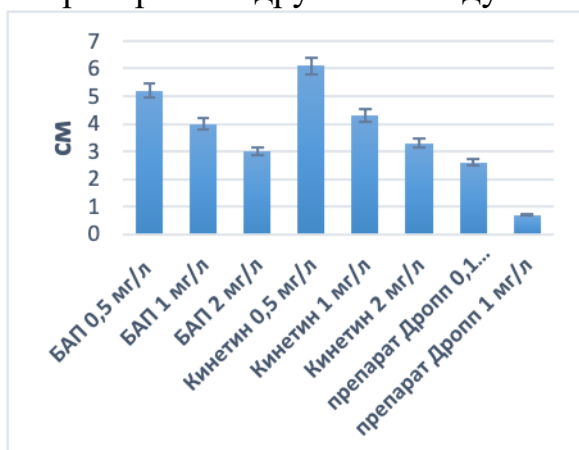


Рис. 4 Влияние гормонального состава питательной среды на высоту пазушных и адвентивных микропобегов (сорт Jewel)

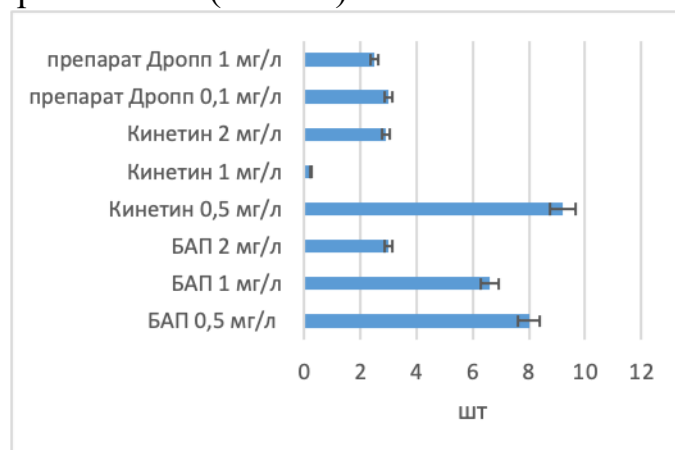


Рис. 5 Влияние гормонального состава питательной среды на среднее количество листьев на одном микропобеге (сорт Jewel)

Таблица 2 - Влияние гормонального состава питательной среды ($\frac{1}{2}$ МС+ИУК 0,5 мг/л) на высоту микропобегов батата (см)

Сорт	БАП 0,5 мг/л	кинетин 0,5 мг/л	Дропп 1 мг/л
Jewel	5,2±0,2	6,1±0,3	0,6±0,1
Порту баттераба	5,5±0,2	5,9±0,2	0,6±0,1
Американский бежевый	5,0±0,2	5,6±0,2	0,5±0,2
Порто рико	4,8±0,2	5,0±0,2	0,4±0,1
Мускатный	5,2±0,2	5,9±0,3	0,6±0,1
Винницкий розовый	6,2±0,3	7,4±0,3	0,9±0,2
Рубин каролины	4,4±0,2	4,6±0,2	0,3±0,1
Пурпул I	5,9±0,2	6,4±0,3	0,8±0,2
Тайнунг	5,8±0,2	6,8±0,2	0,9±0,1

На основании проведенных исследований, установлено, что для всех изучаемых сортов батата наилучшие условия для роста микропобегов и формирования адвентивных побегов была среда $\frac{1}{2}$ МС + кинетин 0,5 мг/л и ИУК 0,5 мг/л, а не эффективной – с препаратом Дропп. В этом варианте сформировавшиеся микропобеги не превышали 0,9 см. В варианте с БАП учитываемые показатели занимали промежуточное положение.

Выращивание микрочеренков в условиях светокультуры.

Выращивание в гроутентах. Изучали влияние отношения красного света (R) к дальнему красному свету (FR) на морфометрические показатели микрочеренков батата.

Микрочеренки батата выращивали на двух вариантах питательной среды: 1 - $\frac{1}{2}$ минеральных солей по МС и агар, 2 - не содержащие солей (дистиллированная вода и агар). Вариант с водой был выбран не случайно, так как в этих условиях более показательно влияние красного и дальнего

красного света и их соотношений на реакцию микрочеренков на условия выращивания. Результаты приведены в таблице 3 и 4.

Таблица 3 - Влияние режимов выращивания на биометрические показатели микрорастений батата, культивируемых на среде ½ МС

Показатели	R<FR	R=FR	R>FR	Люминесцентные лампы
R/FR	0,5	1	3	10
Ср. число корней, шт	5,25 ± 0,25	3,75 ± 0,15	3,25 ± 0,16	2,25 ± 0,11
Ср. длина корней, см	11,87 ± 0,63	14,37 ± 0,75	11,75 ± 0,60	7,62 ± 0,38
Ср. число листьев, шт	4,25 ± 0,22	5,25 ± 0,20	4,00 ± 0,24	2,25 ± 0,11
S листа, см ²	3,23 ± 0,15	3,88 ± 0,15	2,89 ± 0,13	2,35 ± 0,12
Ср. длина стебля, см	3,87 ± 0,10	4,37 ± 0,12	3,80 ± 0,10	2,72 ± 0,10

Таблица 4 - Влияние режимов выращивания на биометрические показатели микрорастений батата, культивируемых на дистиллированной воде

Показатели	R<FR	R=FR	R>FR	Люминесцентные лампы
R/FR	0,5	1	2	10
Ср. число корней, шт	5,67 ± 0,38	4,33 ± 0,25	2,33 ± 0,15	2,25 ± 0,11
Ср. длина корней, см	6,83 ± 0,30	11,75 ± 0,63	7,33 ± 0,33	7,62 ± 0,38
Ср. число листьев, шт	2,00 ± 0,10	2,00 ± 0,10	1,33 ± 0,10	2,25 ± 0,11
S листа, см ²	4,51 ± 0,22	3,96 ± 0,15	6,11 ± 0,39	2,35 ± 0,12
Ср. длина стебля, см	0,95 ± 0,10	0,90 ± 0,10	1,33 ± 0,10	0,72 ± 0,10

Показано, что изученные режимы выращивания и состав питательной среды оказывают не однозначное влияние на морфометрические показатели микрорастений батата. Так, в условиях ограниченного питания (вода) и при всех режимах освещения (R<FR, R=FR и R>FR), а так же в контрольном варианте все учитываемые показатели были существенно ниже, чем при использовании ½ МС. Однако следует отметить, что режимы освещения (соотношение R и FR) оказали существенное стимулирующее влияние как на рост корней, так и на рост побегов, не зависимо от состава среды. Яркие отличия были получены по показателям, связанных с корнями.

Во всех вариантах средняя длина корневой системы и среднее количество корней превышало контрольный вариант (люминесцентные лампы) в среднем на 155-200% и 250% соответственно. Что касается длины побегов, то в варианте культивирования микропобегов на среде ½ МС длина стебля превышала контроль в 2,5-3 раза, в то время как при культивировании микропобегов на воде этот показатель превышал контрольный вариант на 38-86%. Особенно следует отметить влияние условий культивирования на площадь листа. Выращивание микропобегов на воде и в условиях грунтоентов, привело к увеличению площади листа по сравнению с

контрольным вариантом примерно в 2 раза, в то время как в варианте использования $\frac{1}{2}$ МС этот показатель был выше контроля в среднем на 22-65%. Вероятно, недостаток питательных элементов (выращивание на воде), обеспечивающих рост и развитие растений, было компенсировано увеличением листовой пластинки, а следовательно и повышением фотосинтетической их активности.

Таким образом, проведенные исследования показали, что красный и дальний красный свет оказывает существенное влияние на морфофизиологические показатели микропобегов батата. Причем при соотношении R=FR все учитываемые показатели были выше контроля на 5% уровне значимости. Поэтому данный вариант освещения можно рекомендовать для выращивания батата *in vitro*.

Выращивание в светокультуре

Известно, что спектральный состав света является важным физическим фактором, оказывающий влияние на морфогенетические процессы. Показано, что разные спектры света влияют на пролиферацию и дифференциацию клеток растений по-разному. Исследования такого плана ранее с бататом не проводились (Табл 5).

Таблица 5 - Влияние соотношения красного и синего спектров на рост пазушных почек батата *in vitro* (см)

Сорт	Контроль	К 70%: С 30%	К 30%: С 70%
Джевел	7,76±0,32	2,95±0,11	1,80±0,08
Пурпл	5,95±0,22	2,26±0,17	2,31±0,10
Порто Рико	4,20±0,20	2,80±0,12	1,54±0,11
Винницкий розовый	5,43±0,15	2,28±0,12	1,10±0,07

Установлено, что добавление в нормальное освещение дополнительно красного и синего спектра в разных соотношениях не приводило к повышению морфогенетического потенциала культивируемых эксплантов. Удельная скорость роста (μ) основного побега из пазушных почек была в среднем в 2 раза меньше, по сравнению с контролем.

Следует отметить, что для сорта Пурпл во всех вариантах освещения, как на внешней, так и на внутренней стороне листовой пластинки наблюдали массовое образование колетер, что не было отмечено для других сортов. Кроме того, для этого сорта в вариантах освещения К 70%:С 30% и К 30%:С 70% было также отмечено образование корней с антоциановой окраской. В контрольном варианте формировалась мощная корневая система без антоциановой окраски.

Влияние ауксинов на укоренение микрочеренков батата *in vitro*

Для укоренения микропобегов в состав питательной среды, содержащей $\frac{1}{2}$ нормы минеральных солей по прописи МС добавляли ИУК и ИМК в концентрациях 0,5 и 1 мг/л.

Исследования показали, что независимо от применяемого ауксина (0,5 мг/л) в базальной части микропобегов сначала формировалась каллусная ткань, светло-желтого цвета, плотной консистенции (Рис. 8а) и только в 12%-ах случаев наблюдали образование корневой системы непосредственно из базальной части микропобегов. При использовании ауксинов в концентрации 1 мг/л, формирование каллусной ткани происходило более интенсивно.

В процессе культивирования каллусная ткань зеленела, из которой в дальнейшем формировалась мощная корневая система (Рис. 6 б). Причем 100% укоренение микропобегов было отмечено во всех вариантах и для всех изучаемых сортов батата.

Отличия были отмечены по таким показателям, как индекс роста корней (I) и удельная скорость роста корней (μ). Установлено, что I и μ зависели от применяемого ауксина (Табл. 6).

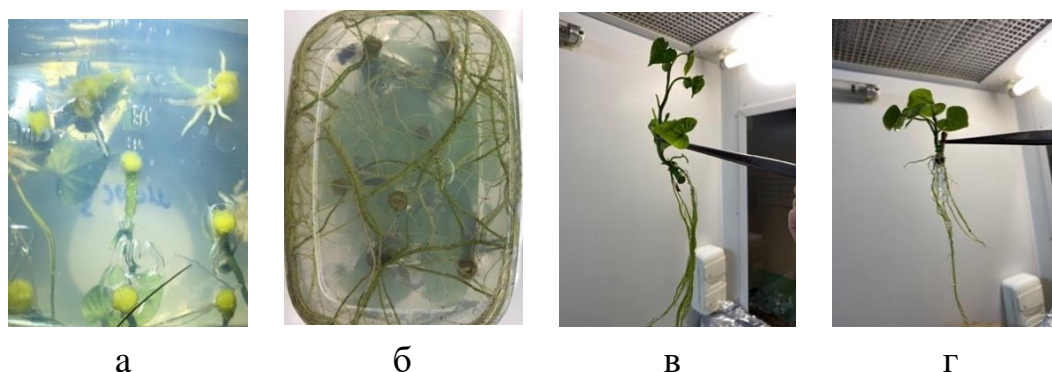


Рис. 6 Формирование каллусной ткани в базальной части микропобегов батата (а), образование корневой системы (б), на питательной среде, содержащей ИМК (в), ИУК (г)

Таблица 6 - Влияние ауксинов на индекс роста (I) и удельную скорость роста (μ) корней (концентрация ауксинов 0,5 мг/л)

Сорт	Индекс роста (I)		Удельная скорость роста (μ)	
	ИМК	ИУК	ИМК	ИУК
Джевел (Jewel)	2,4	1,9	0,3	0,2
Порту батгеба	2,0	1,6	0,2	0,2
Американский бежевый	1,5	1,2	0,1	0,1
Порто Рико	1,9	1,3	0,2	0,2
Мускатный	1,9	1,7	0,1	0,1
Винницкий розовый	2,3	1,9	0,3	0,2
Рубин каролины	1,6	1,0	0,2	0,2
Пурпул	2,3	2,0	0,3	0,2
Тайнунг	2,4	1,8	0,3	0,2

Так, на среде с ИМК индекс роста (I) корней составил в среднем 1,5-2,4, в то время как на среде с ИУК этот показатель был существенно ниже и составил 1,2-2,0. Аналогичная тенденция была отмечена и при учете удельной скорости роста (μ) корней. Учитываемые показатели зависели не только от исследуемого ауксина, но и от сортовых особенностей батата. Самые длинные корни (18-20 см) формировались на среде с ИМК у микропобегов батата сортов Джewel, Винницкий розовый, Пурпл и Тайнунг, а самые короткие (8,3 см) - у микропобегов батата сорта Американский бежевый. На среде с применением ИУК учитываемые показатели были в среднем на 25% меньше. Установлено, что оптимальная среда для укоренения батата - $\frac{1}{2}$ МС в сочетании с ИМК 0,5 мг/л.

Адаптация микроклонов батата к условиям *ex vitro*

Исследования показали, что применение аэропонной установки привело к 100%-ой акклиматизации микроклонов батата к условиям *ex vitro*. В этих условиях наблюдали активный рост как надземной, так и корневой системы. Следует отметить, что на 7 сутки с начала адаптации микроклонов, длина корневой системы составил 25-28 см и была хорошо разветвленной, а средняя высота побегов составила 10-12 см.

Что касается адаптации в почвенных условиях, то число адаптированных растений не превышало 85%. Причем, рост надземной части был замедлен и только на 14 сутки с начала адаптации формировались побеги высотой 5-7 см.

В дальнейшем адаптированные микроклоны были перенесены на поля института фитопатологии РАН (Московская область, Голицино). При посадке корневая система микроклонов не заглублялась. В процессе выращивания отмечено, что боковые ответвления утолщались и превращались в клубнеплоды. В процессе роста, микроклоны батата прошли фазу вегетации и перешли в фазу цветения. Осенью, за 2 недели до сбора урожая полив прекращали. Сбор батата происходил вручную. Форма клубнеплодов в зависимости от сорта была округлой, конусообразной, ветеренообразной и соответствовала исходному сорту.

Таким образом, впервые для батата (*Ipomoea batatas* (L.)), проведены многоплановые исследования *in vitro* и предложена технология быстрого размножения и получения высококачественного посадочного материала. Проведенные исследования являются начальным этапом в работах по клеточной селекции *Ipomoea batatas* (L.) на устойчивость к низким положительным температурам.

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ И ПРОВЕДЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ *IROMOEA BATATAS* (L.) НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ГИПОТЕРМИЧЕСКОМУ СТРЕССУ

Низкие положительные температуры оказывают негативное влияние на рост, развитие, продуктивность и урожай растений *Ipomoea batatas* (L.). Это, прежде всего, связано с биологическими особенностями самого растения. Для батата критической температурой является 14°C, при которой приостанавливается рост надземной части растений, а при температуре 10°C полностью останавливается обмен веществ и надземная биомасса погибает.

Поэтому стоит задача получения толерантных к низким положительным температурам новых форм, гибридов и сортов батата. Ускорить процесс получения толерантных генотипов можно посредством применения тканевой и клеточной селекции *in vitro*. Успехи в этом направлении исследований достигнуты для многих сельскохозяйственных, ягодных и плодовых культур. Что касается растений батата, то такие работы ранее не проводились.

Как правило, основным объектом исследований при селекции *in vitro* является каллусная ткань. Поэтому на первом этапе работы необходимо разработать протокол получения хорошо пролиферирующей каллусной ткани.

Влияние гормонального состава питательной среды на каллусогенез

Исходным эксплантом для получения каллусной ткани служили сегменты стеблей и листьев, изолированные с асептических растений батата трех сортов – Пурпл (фиолетовый), Порто Рико (белый), Jewel (оранжевый). Изучали влияние ИУК, НУК, 2,4-Д в концентрации 0,5 мг/л на процесс каллусогенеза.

В результате исследований были установлены некоторые закономерности в образовании каллусной ткани: 1 – начало каллусогенеза отмечено на 12-15 сутки с начала культивирования; 2 – как правило, каллусная ткань формировалась средней плотности желто-зеленого цвета; 3 – во всех вариантах образование каллусной ткани наблюдали в местах среза, поранений, а также формировалась из мезофила листовой пластинки, располагающейся между центральной и боковых жилок (Рис. 7 а,б).

Следует отметить, что образование каллусной ткани в определенных местах не случайно и это зависело от наличия фенольных соединений и их локализации в первичных листовых пластинках. Наши гистохимические исследования демонстрируют специфическую локализацию полифенолов в листовой пластинке (Рис. 7 в,г). Как правило, они преимущественно

располагаются в покровных и проводящих тканях, а также наблюдается незначительное их присутствие в паренхимных клетках, в фенольном комплексе экспланта доминируют соединения флавоноидного ряда.

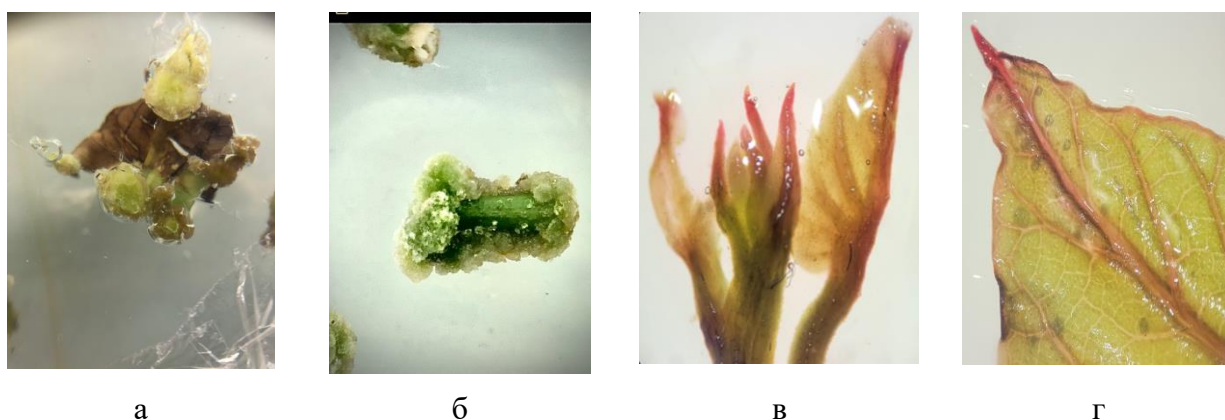


Рис. 7 Каллусная ткань в местах поранения: а,– лист, б – стебель, в – локализация фенольных соединений в меристематических тканях г – в проводящих тканях листовой пластинки

На основании полученных результатов мы заключили, что каллусная ткань формировалась в тех местах листовой пластинки, в которых образование и локализация фенольных соединений было незначительным. Вероятно, это связано с тем, что высокое содержание фенольных соединений приводит к ингибированию многих физиологических процессов.

Следует отметить, что существенное влияние на интенсивность образования каллусной ткани, ее консистенцию и цвет оказывали применяемые ауксины. Так, культивирование эксплантов на питательной среде, содержащей ИУК приводило к формированию каллусной ткани желто-зеленого цвета, средней плотности, на среде с НУК каллусная ткань имела рыхлую консистенцию и была светло-желтого цвета, а на среде с 2,4-Д каллусная ткань имела рыхлую консистенцию, была светло-коричневого цвета и в процессе культивирования погибала.

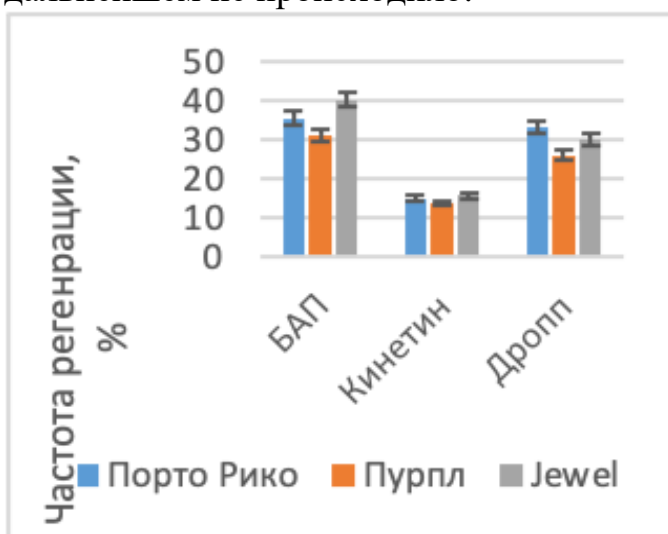
Исследования показали, что наиболее благоприятные условия для получения хорошо пролиферирующей каллусной ткани - это присутствие в составе питательной среды НУК. В этом варианте каллусная ткань сохраняла высокую пролиферативную активность на протяжении ряда субкультивирований. Что касается питательной среды с ИУК, то в этом варианте в процессе культивирования каллусная ткань становилась ризогенной, что не позволяет нам использовать ее в дальнейших экспериментах по клеточной селекции.

Регенерация растений из каллусной ткани

Важным этапом клеточной селекции *in vitro* является подбор оптимальных условий, обеспечивающих регенерацию растений из клеточных

культур. В работе изучали каллусную ткань, полученную после 3 циклов выращивания.

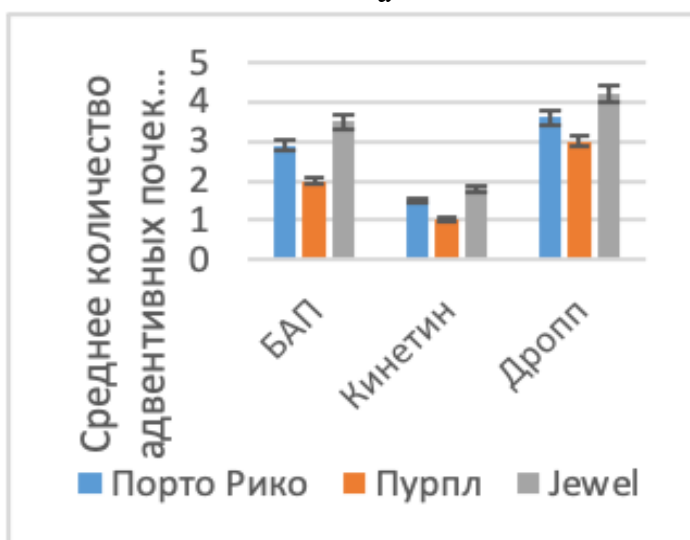
Установлено, что изучаемые цитокинины (БАП, кинетин, препарат Дропп) оказывают не одинаковое действие на регенерацию растений из каллусной ткани. По своей активности гормоны располагаются в следующей последовательности: БАП, препарат Дропп и кинетин (Рис. 8). Однако следует отметить, что несмотря на высокую морфогенетическую активность препарата Дропп, в этом варианте формировались побеги с укороченными междоузлиями и ланцетовидной листовой пластинкой, развитие которых в дальнейшем не происходило.



а

Рис. 8

а - частота регенерации растений из каллусной ткани (%)



б

б - среднее число адвентивных побегов на один каллус (шт)

Таким образом, на основании полученных данных следует заключить, что для получения хорошо пролиферирующей каллусной ткани батата целесообразно добавлять в состав питательной среды НУК в концентрации 0,5 мг/л в сочетании с БАП 1 мг/л, а на этапе получения растений-регенерантов из длительно пассируемой каллусной ткани – БАП 5 мг/л в сочетании с ИУК 0,5 мг/л. Данный протокол был нами использован в

следующей серии работ по клеточной селекции *I. batatas* (L.) на устойчивость к низким положительным температурам.

Влияние регуляторов роста на устойчивость каллусной ткани к гипотермическому стрессу

Для отбора *in vitro* клеток или тканей на устойчивость к таким абиотическим стрессорам используют метод клеточной селекции *in vitro*. Известно, что при гипотермическом стрессе в растениях происходят изменения на биохимическом уровне, которые позволяют клеткам выживать в экстремальных условиях. Например, повышается уровень пролина, аскорбата и глутатиона, изменяется активность антиоксидантных ферментов, усиливается экспрессия генов белков холодового шока и др.

Кроме того, известно, что регуляторы роста выполняют в растениях не только важную роль в регуляции формообразовательных процессов, но и активно участвуют в их защите от воздействия факторов абиотической и биотической природы. Известны препараты, которые оказывают стимулирующее действие на рост, продуктивность, урожайность растений, а также способны предавать растениям неспецифическую устойчивость к стрессовым факторам. К таким препаратам относятся Мивал и Крезацин.

В работе препарат Мивал и препарат Крезацин изучали в концентрации 150 мг/л, которая была выбрана на основании исследований, проведенных разными авторами с сельскохозяйственными растениями, например, огурец, томаты и др. Контролем служила питательная среде без исследуемых препаратов (Табл. 7).

Таблица 7 - Морфометрические характеристики каллусной ткани батата (Порто Рико), культивируемой в условиях контроля и гипотермического стресса (14⁰С)

Вариант	Жизнеспособность каллусной ткани, %	Цвет каллусной ткани	Индекс роста (I)	Удельная скорость роста (μ)
Условия выращивания 14⁰С				
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
Условия выращивания 23⁰С				
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

Установлено, что изучаемые препараты оказывают 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 контроле этот показатель не превышал 3,5-4,2%, так

как в каллусной ткани образовывались некротические участки, что приводило к частичной или полной гибели ткани.

Что касается культивирования каллусной ткани в стандартных режимах выращивания (23⁰С), то действие препаратов было не столь ярко выражено. Во всех вариантах наблюдали активную пролиферацию клеток, что подтверждается высоким индексом роста (I). Следует отметить, что препарат Мивал оказал больший стимулирующий эффект на рост каллусных культур, а действие препарата Крезацин достоверно не отличалось от контрольного варианта.

Определив положительное влияние препарата Мивал на выживаемость каллусной ткани в стрессовых условиях, данный регулятор роста был использован для других генотипов – Джемел и Пурпл в циклах выращивания каллусной ткани при температуре 14⁰С. Количество циклов культивирования составило 3. В результате проведенных исследований были отобраны каллусные ткани, хорошо пролиферирующие в условиях гипотермического стресса, из которых в дальнейшем были получены растения-регенеранты (43 растения для генотипа Порто Рико, по 4 растения для генотипов Пурпл и Джемел).

Все растения были высажены в почву на поля института фитопатологии РАН (Московская область, Голицино). Агротехника выращивания стандартная. В середине сентября был проведен сбор урожая, а полученные клубнеплоды были отправлены на химический анализ. Основные результаты приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Химический состав клубнеплодов батата, % на абсолютно сухое вещество

Образец	влажность	зола	протеин	жир	клетчатка	крахмал	кальций	фосфор	сахар
Контрольные растения									
Джемел	6,620	3,720	10,970	2,811	1,509	49,855	0,834	0,511	16,019
Пурпл	8,887	2,194	3,309	1,627	0,573	44,862	0,837	0,295	17,700
Порто Рико	3,169	2,539	9,569	0,756	0,556	53,035	0,447	0,327	10,320
Растения-регенеранты после селекции									
Джемел	6,701	3,870	10,831	2,800	1,892	45,336	0,849	0,518	18,102
Пурпл	8,932	2,212	3,327	1,598	0,668	43,287	0,838	0,300	18,20
Порто Рико	3,569	2,539	9,569	0,756	0,828	53,000	0,534	0,327	11,893

Химический анализ показал, что в клубнеплодах растений, полученных после клеточной селекции, увеличивается содержание сахарозы и клетчатки,

и уменьшается содержание крахмала. Полученные результаты свидетельствуют об изменениях, которые произошли в клубнеплодах на биохимическом уровне.

Таким образом, 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате многоплановых исследований были получены результаты, которые имеют как теоретическое, так и практическое значение, а на предложенные технологии получено 2 патента. На основании результатов были сделаны следующие выводы:

1. Создана коллекция асептических растений и разработана технология получения высококачественного посадочного материала батата методами клонального микроразмножения.
2. Установлено, что наилучшим первичным эксплантом при клонировании батата являются изолированные микрочеренки, которые необходимо культивировать на питательной среде МС, содержащей $\frac{1}{2}$ нормы минеральных солей, а также БАП или кинетин в концентрации 0,5 мг/л в сочетании с ИУК 0,5 мг/л, что способствует получению максимального коэффициента размножения – 9.
3. Установлено, что применение ИМК в концентрации 0,5 мг/л на третьем этапе клонального микроразмножения оказывает существенное влияние на укоренение и рост корней микропобегов батата.
4. Экспериментально доказано, что спектральный состав света оказывает существенный стимулирующий эффект на морфометрические показатели микроклонов батата. Установлено, красный (R) и дальний красный (FR) спектр света в разных соотношениях усиливает рост корней и надземной биомассы микроклонов. Наилучшие результаты получены при соотношении R=FR.
5. Показано, что применение аэропонной установки на последнем этапе клонального микроразмножения, позволяет проводить быструю адаптацию растений к условиям *ex vitro*, а также способствует активному росту как надземной, так и корневой системы клонированных растений.
6. На основании проведенных исследований установлено, что НУК в концентрации 0,5 мг/л способна индуцировать образование каллусной ткани, сохраняющей высокую пролиферативную активность на протяжении длительного культивирования. Дополнение питательной среды БАП в

концентрации 5 мг/л способствует получению растений-регенерантов из каллусной ткани с частотой 31,8 – 40,2%.

7. Установлено, что добавление в состав питательной среды МС препарат Мивал в концентрации 150 мг/л приводит к выживанию в 56,1-68,5% случаев каллусной ткани батата в условиях гипотермического стресса. В результате селекции *in vitro* получены растения-регенеранты и в условиях *ex vitro* – клубнеплоды. Химический анализ показал, что в клубнеплодах растений-регенерантов увеличивается содержание сахарозы и клетчатки, и уменьшается содержание крахмала.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные и в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Калашникова, Е.А. Роль светового режима в регулировании продукционного процесса растений в системе интенсивного культивирования *in vitro* / Е. А. Калашникова, Р. Н. Киракосян, А. А. Десятерик, Д. Р. Ганаева, **Х. Г. Абубакаров**, Н. Н.Слепцов // Естественные и технические науки. – 2021. – №. 5. – Р. 58–63.
2. Калашникова, Е.А. Влияние гормонального состава питательной среды и эндогенных полифенолов на формирование каллусной ткани *Ipomoea batatas* (L.) / Калашникова, Р.Н. Киракосян, **Х.Г.Абубакаров**, С.М.Зайцева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2022. – №. 25(11). – Р. 46-58.

Работы, опубликованные в изданиях, индексируемых в международных цитатно-аналитических базах данных:

3. Abubakarov, H.G. Influence of lightculture on obtaining planting material of *Ipomoea batatas* (L.) *in vitro* / **H.G. Abubakarov**, N.N. Sleptsov, A.V. Sumin, E.A. Kalashnikova, R.N. Kirakosyan // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2022. – Т. 1112. – №. 1. – Р. 012112. (**Scopus**).
4. Kirakosyan, R.N. Influence of mineral treatment, plant growth regulators and artificial light on the growth of jewel sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam. cv. Jewel) *in vitro* / R.N. Kirakosyan, E.A. Kalashnikova, **H.G. Abubakarov**, N.N. Sleptsov, Y.A. Dudina, S.K. Temirbekova, V.I. Trukhachev, A.V. Sumin // Life. – 2023. – Т. 13. – №. 1. – С. 52 (**Scopus, WoS**).

Авторские свидетельства, патенты, лицензии:

5. Способ получения безвирусного, генетически однородного посадочного материала батата (*Ipomoea batatas* L.) *in vitro* / Калашникова Елена Анатольевна, Киракосян Рима Нориковна, **Абубакаров Халид Геланиевич**, Десятерик Анастасия Андреевна, Ганаева Дарья Рассовна//

Патент на изобретение 2783183 С1, 09.11.2022. Заявка № 2021131437 от 27.10.2021.

6. Способ получения холодоустойчивого посадочного материала батата / Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н., **Абубакаров Х.Г.**, Карсункина Н.П., Чередниченко М.Ю., Поливанова О.Б., Темирбекова С.К. // Патент на изобретение 2787700 С1, 11.01.2023. Заявка № 2022100715 от 14.01.2022.

Работы, опубликованные в рецензируемых научных изданиях:

7. **Абубакаров Х.Г.** Размножение *Ipomoea batatas* (L.) Lam. В культуре *in vitro* / **Х.Г. Абубакаров**, Е.А. Калашникова, Р.Н. Киракосян, А.В. Шитикова // Всероссийской научной конференции с международным участием «Растениеводство и Луговое хозяйство». – 2020. – С. 468-470.

8. Калашникова Е.А. Выращивание *Ipomoea batatas* (L.) Lam. в условиях светокультуры *in vitro* и *ex vitro* / Е.А. Калашникова, Р.Н. Киракосян, А.В. Гущин, **Х.Г. Абубакаров**, Н.Н. Слепцов, С.К. Темирбекова, М.М. Тареева // Овощи России. – 2021. – №. 6. – С. 22-29.

9. Калашникова Е.А. Биотехнологические методы получения устойчивых форм батата (*Ipomoea batatas* L.) к гипотермическому стрессу / Е.А. Калашникова, Р.Н. Киракосян, С.М. Зайцева, А.В. Сумин, **Х.Г. Абубакаров**, А.А. Десятерик, О.В. Мелешина // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2022. – №. 6. – С. 43-46.

10. Калашникова, Е.А. Клеточная селекция батата *Ipomoea batatas* (L.) на устойчивость к положительным низким температурам / Е.А. Калашникова, Р.Н. Киракосян, А.В. Сумин, **Х.Г. Абубакаров**, С.К. Темирбекова // Биосфера. – 2022. – Т. 14. – №. 4. – С. 331-332.

11. Киракосян Р.Н. Селекция *in vitro* батата (*Ipomoea batatas* L.) на устойчивость к действию гипотермического стресса / Р.Н. Киракосян, **Х.Г. Абубакаров**, А.А. Десятерик // Материалы Международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 135-летию со дня рождения АН Костякова. – 2022. – С. 294-297.

12. Киракосян Р.Н. Селекция *in vitro* *Ipomoea batatas* (L.) к гипотермическому стрессу / Р.Н. Киракосян, **Х.Г. Абубакаров**, А.В. Сумин, А.А. Десятерик, Е.А. Калашникова // В сборнике: АГРАРНАЯ НАУКА - 2022. материалы Всероссийской конференции молодых исследователей. 2022. С. 85-87.