

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Глава 1 Литературный обзор	11
1.1 Ботанико-географические и морфо-физиологические особенности <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.	11
1.2 Хозяйственное значение и практическое применение <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.	13
1.3 <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam. - источник инулина	16
1.4 Способы размножения <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.	19
1.5 Проблема холодоустойчивости батата и пути ее решения	20
Глава 2 Объект и методы исследований	38
2.1 Объект исследования	38
2.2 Получение стерильной культуры	42
2.3 Питательные среды для культивирования изолированных эксплантов <i>in vitro</i>	43
2.4 Выращивание микрочеренков в условиях светокультуры	44
2.5 Селекция <i>in vitro</i> к гипотермическому стрессу	49
2.6 Адаптация растений-регенерантов к условиям <i>ex vitro</i>	50
2.7 Условия культивирования <i>in vitro</i> и <i>ex vitro</i>	53
2.8 Биохимические исследования	53
2.9 Статистическая обработка данных	54
Глава 3 Экспериментальный морфогенез <i>Ipomoea batatas</i> (L.) <i>in vitro</i>	55
3.1 Введение первичных эксплантов в культуру <i>in vitro</i>	55
3.2 Влияние минерального состава питательной среды на морфогенетический потенциал микрочеренков батата <i>in vitro</i>	57
3.3 Влияние гормонального состава питательной среды на морфогенетический потенциал микрочеренков батата <i>in vitro</i>	61
3.4 Выращивание микрочеренков в условиях светокультуры	66
3.5 Влияние ауксинов на укоренение микрочеренков батата <i>in vitro</i>	

<i>vitro</i>	73
3.6 Адаптация микроклонов батата к условиям <i>ex vitro</i>	75
Глава 4 Получение каллусной ткани и проведение клеточной селекции <i>Ipomoea batatas</i> (L.) на устойчивость к гипотермическому стрессу	80
4.1 Получение каллусной ткани	81
4.1.1 Влияние гормонального состава питательной среды на каллусогенез	81
4.1.2 Локализация фенольных соединений в каллусной ткани ..	87
4.2 Регенерация растений из каллусной ткани	93
4.3 Влияние регуляторов роста на устойчивость каллусной ткани к гипотермическому стрессу	96
Заключение	103
Список литературы	105
Приложение 1	125
Приложение 2	126

ВВЕДЕНИЕ

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 (Калашникова, 2020). Особый интерес, в последнее время, привлекают растения, способные образовывать в тканях инулин - природный полисахарид не имеющий синтетических аналогов. Он содержится более чем в 3000 растениях, преимущественно в их корнях и клубнях. Среди сельскохозяйственных растений первое место по содержанию инулина занимают топинамбур и цикорий (Калашникова, Киракосян, 2016). Однако поиск альтернативных источников инулина остается актуальным направлением исследований. Одной из перспективных таких сельскохозяйственных культур является батат.

Батат или сладкий картофель (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) - двудольное растение, относящееся к семейству Convolvu - laseae. Его съедобный клубневидный корень имеет гладкую кожицу, цвет которой может быть желтым, оранжевым, красным, коричневым и фиолетовым. Как правило, это сельскохозяйственная культура, устойчивая к неблагоприятным условиям произрастания и поэтому ее часто выращивают на почвах с ограниченными ресурсами (Namanda, Gibson Kirimi, 2011). Во всем мире батат возделывают на площади примерно 8,1 млн га с общим годовым производством 106-110 млн тонн (Ogero KO, Gitonga NM, Mwangi M, et all, 2011; FAO (2011)). Интерес к данной культуре связан прежде всего с тем, что клубни являются источником минералов, витаминов, антиоксидантов и, конечно, инулина, а

также является хорошим источником бета-каротина, предшественника витамина А (Tumwegamire S, Kapinga R, Rubaihayo PR, et al., 2011). Благодаря содержанию в клубнях различных компонентов, его диетологи считают более здоровым продуктом, чем картофель. Он менее калориен, обладает низким гликемическим индексом, а значит, не влияет на уровень сахара в организме. Поэтому его смело можно использовать в рационе питания диабетикам. Более того, батат борется с плохим холестерином, улучшает кровоток, помогает при пониженном артериальном давлении, нормализует работу кишечника и отвечает за молодость и красоту кожи, а также за зрение.

В мире существует около 6000 сортов батата, которые возделывают в разных странах (Abubakar AS, Yahaya SU, Shaibu AS, et al., 2018; Melissa SS, Vlay ET, Amissah N., 2019). Родиной батата являются Перу и Колумбия, а сегодня эту культуру выращивают в 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.

Основной способ размножения батата – вегетативный – черенками. Однако при таком способе размножения, не редко, происходит передача инфекции, в частности, вирусов от исходного растения-донора к последующему посадочному материалу (Hettiarachchi, 1988; Dugassa, Feyissa, 2011; Cha-um, Kirdmanee, 2006). Поэтому поиск альтернативных путей размножения и получения оздоровленного посадочного материала в массовом количестве остается актуальной проблемой. Кроме того, для расширения ареала возделывания батата в Российской Федерации 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*, осуществлять соматическую гибридизацию, а также позволяет

преодолевать постгамную и прогамную несовместимость растений (Калашникова, Киракосян, 2016; Калашникова, 2020). 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, Ampronsah, Tengey, 2014). Показано, что реализация морфогенетического потенциала изолированными органами растений батата *in vitro*, осуществляется благодаря изменению соотношения факторов гормональной природы. Однако существуют и факторы физической природы, в частности, регулирование системы освещения. Спектральный состав света должны обеспечить наиболее благоприятные режимы для морфофизиологических ответных реакций исследуемых объектов на стресс. В климатических камерах или световых комнатах для культивирования растений используют искусственные источники света, например, люминесцентные лампы, натриевые лампы, металлогалогенные лампы и др. Самыми популярными и распространенными являются люминесцентные облучатели. Однако, по мнению многих исследователей, эти источники, с одной стороны, имеют излишне широкий спектр длин волн, который находится в интервале 350-750 нм, с другой стороны, излучение имеет линейчатую структуру, с неравномерно распределёнными пиками мощности излучения. Светодиодные источники света, получившие распространение, позволяют создавать линейчатые спектры с точно заданными соотношениями участков спектра. Кроме того, традиционные источники света потребляют больше электрической энергии, и при этом излучают больше тепла. Поэтому для повышения эффективности технологий, снижения материальных затрат и увеличения качества получаемой продукции, необходимо проводить усовершенствование технологии размножения батата *in vitro*.

Цель работы – разработать высокоэффективную технологию быстрого размножения и получения холодоустойчивых форм батата (*Ipomoea batatas* (L.)) в культуре *in vitro*.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

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

корней 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 *Ipomoea batatas* к условиям *ex vitro* могут позволить получать более качественный растительный материал и снизить потери на этапе адаптации. Данная 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 (*Ipomoea batatas* (L.)) девяти сортов (Винницкий розовый, Пурпл (Purple), Тайнунг Т-65, Рубин Каролины, Джевел (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 РФ, 2 статьи в международных изданиях (Scopus, и Web of Science), 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 126 страницах; состоит из введения, 4 глав; содержит 15 таблиц, 44 рисунка. Библиографический список включает 171 источник, в том числе 134 – на иностранных языках и 6 – интернет источников.

ГЛАВА 1

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Ботанико-географические и морфо-физиологические особенности *Ipomoea batatas* (L.) Lam.

Вид *Ipomoea batatas* (L.) Lam. относится к роду *Ipomoea* L. (Ипомея), отделу Magnoliophyta (Покрывосеменные), классу Magnoliopsida (Двудольные), семейству Convolvulaceae (Вьюнковые). Более полную таксономию вида можно увидеть в таблице 1.

Таблица 1. - Таксономия вида *Ipomoea batatas* (www.ncbi.nlm.nih.gov, www.theplantlist.org)

Таксономические единицы	Таксоны рода
Regio/Домен	Eukaryota Chatton/Эукариоты
Regnum/Царство	Plantae Haeckel/Растения
Subregnum/Подцарство	Embryobionta Engler/Высшие растения
Divisio/Отдел	Magnoliophyta Cronq., Takht. & W.Zimm./ Цветковые
Classis/Класс	Magnoliopsida Brongn./Двудольные
Ordo/Порядок	Solanales Dumort./Пасленоцветные
Familia/Семейство	Convolvulaceae Juss./Вьюнковые
Tribus/Триба	<i>Ipomoeae</i> Hallier f./Ипомеевые
Genus/Род	<i>Ipomoea</i> L./Ипомея
Species/Вид	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam./ Батат

Согласно базе данных The Plant List, род *Ipomoea* содержит 449 официально признанных видов.

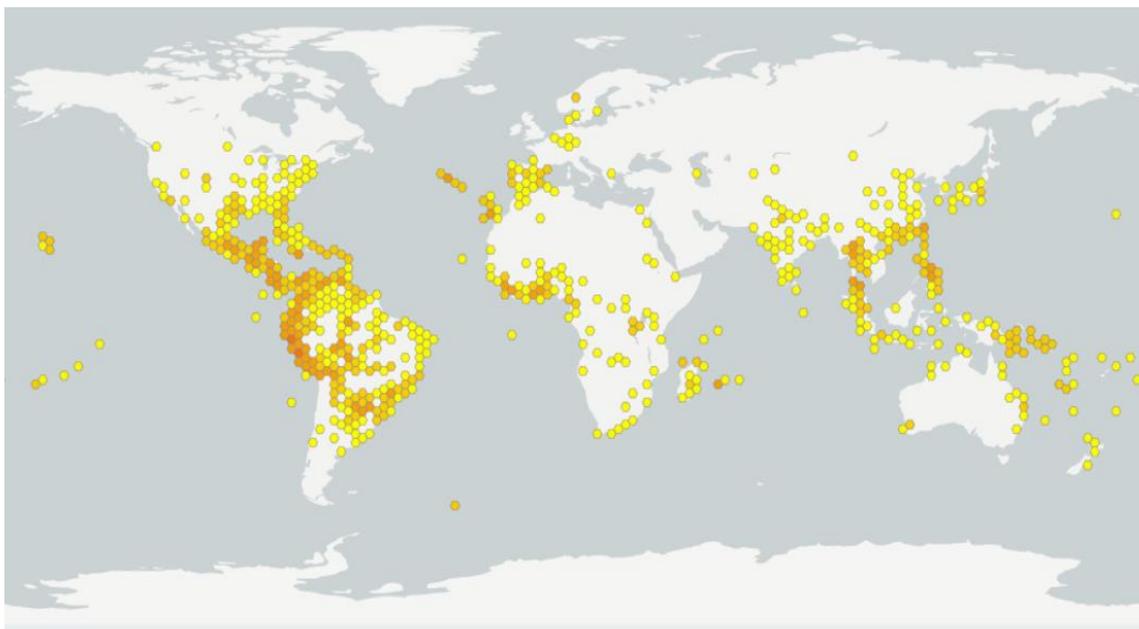


Рис. 1 Распространение вида *Ipomoea batatas* (L.) Lam. за 2021 год
(www.gbif.org)

В Российской Федерации в настоящее время практически повсеместно царствует картофель, достоинства которого неоспоримы (ценный продукт питания и сырье для переработки, хорошая технологичность возделывания), но и недостатки – очевидны. Картофель сильно подвержен поражению вредителями и болезнями, настоящий бич для него – фитофтора и колорадский жук. Это требует больших затрат на фунгицидные и инсектицидные химические препараты, которыми зачастую приходится обрабатывать посадки несколько раз за сезон. Разумеется, это не способствует повышению экологической безопасности пищевой продукции. Картофель хорошо хранится при низких положительных температурах (3-5 °С), что удобно для его заготовки в подземных хранилищах, подвалах и погребах, однако быстро портится в условиях городских квартир – прорастает, становится дряблым, непригодным для использования. Этих недостатков лишен батат. Данный клубнеплод не только не интересен для колорадского жука и не подвержен фитофторозу, но и практически не имеет

болезней и вредителей на территории России, что делает его менее затратным в производстве с точки зрения защиты растений, способствует получению экологически безопасного продукта питания. Батат, в отличие от картофеля, непригоден для хранения при низких температурах, зато до полугода и более хранится в условиях дома или квартиры при 15-20°C, что для потребителя является несомненным плюсом. Еще одним технологическим преимуществом перед картофелем является исключительно высокий коэффициент размножения: с 1 клубня батата получают от 10-15 до 30-50 посадочных единиц (рассады). Наконец, урожайность батата ни в чем не уступает картофельной. При том, что в России за последние годы средняя урожайность картофеля составляет около 150 ц/га, средняя урожайность батата в мире – 200-300 ц/га, а многие фермеры в США, Израиле, и лучшие хозяйства Китая получают 400-600 ц/га (Подлесный, 2013).

1.2 Хозяйственное значение и практическое применение

***Ipomoea batatas* (L.) Lam.**

Сладкий картофель является представителем семейства вьюнковых, или ипомей (Convolvulaceae), которое объединяет ~ 60 родов и > 1650 видов. Эта многолетняя травянистая лиана является двудольным растением, первоначально описанным Линнеем в 1753 году как *Convolvulus batatas* и в дальнейшем отнесенным Жан-Батистом Ламарком в 1791 году к роду *Ipomoea*, основываясь на форме рыльца и поверхности пыльцевых зерен. Систематическая ботаника, основанная на фенотипических особенностях типичного растения батата, ранее была описана Хуаманом (Huaman, 1992), который описал, что корнеплоды для хранения — коммерческая съедобная фракция, ошибочно известная как клубень, — различаются по размеру, цвету кожуры, мякоти (центральная паренхима) и форме (Amoanima-Dede et al., 2020).

Происхождение, сроки и географическое положение культивируемого батата были выяснены недавно с появлением молекулярной филогенетики (Khoury et al., 2015; Laurie et al., 2013). Одомашненный сладкий картофель первоначально произошел от двух несъедобных предков: дикого «сладкого картофеля» (полиплоидный; корни в форме карандаша) и *I. trifida* (диплоидный; корнеобразование отсутствует). Они спонтанно эволюционировали в других тетраплоидных или гексаплоидных предшественников с гораздо более толстыми клубневидными запасующими корнями (Yang et al., 2017; Muñoz-Rodríguez et al., 2019; Gemenet et al., 2020). В настоящее время широко признано, что сладкий картофель произрастает в Южной и Центральной Америке (одомашнены более 5000 лет назад) и были завезены в Испанию и Европу (Колумбом), Африку, Индию, Юго-Восточную Азию и Филиппины (португальскими исследователями) между 14 и 16 веками, и что их интенсивное распространение культивирование началось ~630 лет назад в Азии и в 1960-х годах в Африке (Roullier et al., 2013). Примечательно, что кечуа и полинезийские названия сладкого картофеля ("куумала" и "кумара/кумал"), а также дальнейшее генотипирование ДНК подтверждают перуанское происхождение и передачу полинезийского сладкого картофеля человеку (Loebenstein, 2009; Samiyarsih et al., 2020).

Это седьмая по объему производства культура в мире после пшеницы, риса, кукурузы, картофеля, ячменя и маниоки и пятая в развивающихся странах (Jung et al., 2011). Клубни, листья и побеги сладкого картофеля являются хорошими источниками питательных веществ для людей и животных, при этом около 50% урожая используется на корм животным.

Клубни сладкого картофеля содержат макроэлементы, такие как крахмал, пищевые волокна и белки, в дополнение к широкому спектру микроэлементов, включая минералы (марганец, медь, калий и железо), витамины (в основном группы В, С и Е) и провитамин А (в виде каротиноидов), антоцианы (фиолетовый сладкий картофель), флавоноиды и кумарины (Bovell-Benjamin, 2007). По сравнению с другими корнеплодными

и клубнеклубнеплодными культурами сладкий картофель содержит больше углеводов и белков, а также определенных витаминов и минералов, и в нем более высокий уровень провитамина А, витамина С и минералов, чем в пшенице или рисе (Shih et al., 2007; Wang et al., 1997).

Благодаря содержанию нескольких биологически активных вторичных метаболитов сладкий картофель привлекает внимание пищевой промышленности, потребителей и ученых не только как полезный продукт, но и как ингредиент для функциональных продуктов питания (Parveen et al., 2020; Mohanraj, Sivasankar, 2014). Эти фитохимические вещества обеспечивают физиологические преимущества, которые в конечном счете, как по отдельности, так и в совокупности, способствуют здоровью и долголетию потребителей (Shandilya, Sharma, 2017).

Цвет этого продукта связан с его полезным воздействием на здоровье (Mohanraj, Sivasankar, 2014). Сообщается, что сорта с более светлой мякотью содержат более высокий уровень фенольных соединений, тогда как более интенсивный желтый цвет связан с более высоким содержанием каротиноидов, главным образом β -каротина (Tang et al., 2015). Кроме того, сладкий картофель с желтой и оранжевой мякотью богат фенольными кислотами, в то время как фиолетовые сорта содержат очень высокий уровень антоцианов (Teow et al., 2007; Li, et al., 2009).

В работах Nguyen et al (2021) и Behera et al (2022) продемонстрировано данные о биологически активном составе и возможном воздействии на здоровье именно листьев сладкого картофеля. Помимо широко изученного потенциала листьев сладкого картофеля и методов их выращивания, корни сладкого картофеля – это нечто большее, чем просто пища, веками используемая в качестве основного источника углеводов. Сегодня они признаны высокопитательным и полезным продуктом питания для профилактики хронических заболеваний.

Большинство видов рода *Ipotoea* проявляют биологическую активность, способствующую укреплению здоровья, например, связанную с

их фитохимическим профилем: противовоспалительное (*Ipomoea cairica*), против запоров (*Ipomoea digitata*), обезболивающее (*Ipomoea stans*), противодиабетическое и гипотензивное (*Ipomoea aquatica*, *Ipomoea batatas*), кровоостанавливающее и сосудосуживающее (*Ipomoea tricolor*) и противораковую (*Ipomoea horsfalliae*, *Ipomoea turpethum*) активность (Meira et al., 2012). Сладкий картофель (*I. batatas* (L.) Lam) содержит широкий спектр питательных веществ и ксенобиотических фитохимикатов, обладающих антиоксидантным, гепатопротекторным/спазмолитическим, антикоагулянтным, антибактериальным и противодиабетическим потенциалом.

Следует отметить, что программы генетической селекции, направленные на получение новых сортов сладкого картофеля, остаются под вопросом, поскольку это аллогексаплоидная культура с большим числом хромосом ($2n = 6x = 90$), сложной спорофитной само- и перекрестной несовместимостью и высокой степенью дублирования генома (Mwanga et al., 2017; Yang et al., 2017; Muñoz-Rodríguez et al., 2019; Gemenet et al., 2020; Tanaka et al., 2017; Kim et al., 2020).

1.3 *Ipomoea batatas* (L.) Lam. - источник инулина

Инулин - это функциональное соединение, которое может обеспечивать физиологические функции организма и полезно для здоровья. Инулин принадлежит к группе полисахаридов, состоящей из прямой цепи D - фруктозы с одной единицей глюкозы на каждом конце. Инулин широко применяется в медицине в качестве пребиотика, в пищевой промышленности используется в качестве крахмало- и сахарозаменителя, а также может добавляться в пищевые заменители жира. Инулин полезен для людей с заболеваниями пищеварительной системы, его рекомендуют к употреблению при диабете, панкреатите, гастрите. Кроме того, инулин обладает многими другими полезными свойствами, например: способствует усвоению

минералов, регулирует уровень глюкозы и липидов в крови и повышает иммунитет (Shoaib et al., 2016).

Инулин содержится в клубнях, корнях и стеблях многих растений. В промышленности инулин в основном добывают из таких растений, как цикорий и топинамбур. Было проведено множество исследований по изучению и улучшению содержания инулина в различных продуктах питания, таких как клубни георгина, различные виды ямса, корни одуванчиков (Yudhistira et al., 2020). Что касается батата, то он так же является потенциальным источником инулина. Однако в разных сортах его содержание не одинаковое.

В составе батата сорта Bestak индонезийского происхождения были обнаружены пребиотические компоненты фруктоолигосахариды (ФОС), инулин и раффиноза. В экстракте клетчатки данного растения был обнаружен показатель пребиотической активности, аналогичный ФОС, но более высокий, чем инулина, по отношению к *Lactobacillus plantarum* Mut. и *Bifidobacterium longum* JCM 1217, что указывает на то, что этот экстракт можно использовать в качестве пребиотического компонента (Lestari et al., 2013).

Однако, Mudannayake et al. (2015) в своем исследовании сообщали, что по результатам тонкослойной хроматографии и ферментативной спектрофотометрии у таких растений, как *Caryota urens*, *Ipomoea batatas*, *Lasia spinosa* и *Maranta arundinaceus*, в экстрактах концентрация инулина была очень низкой или вовсе отсутствовал ($<0,4$ г / 100 г в пересчете на сырую массу).

В работе Arfiani (2016), было изучено содержание инулина в растениях батата с белой, фиолетовой и желтой окраской клубнеплодов. По полученным в ходе указанного исследования данным, было зафиксировано, что самый высокий выход инулина – более 5% от массы, было получено в белом батате при экстрагировании. Показано, что проведение экстракции в течение 12 часов растворителями 1:2 приводило к получению инулина 7,7%.

При использовании данной методики экстрагирования, но с использованием растворителей 1:3 позволило получить для желтого батата 8,8% инулина (Yudhistira et al., 2020). Кроме того, авторами показано, что бланширование и сушка при экстракции инулина из белого батата дает более высокий выход (до 22,5%). Многочисленные эксперименты подтвердили тот факт, что изменение соотношения растворителя при экстракции оказывает существенное влияние на физические характеристики производимого инулина, а именно на цвет, растворимость, водопоглощение и содержание воды. В то время как другие характеристики в виде зольности существенно не различались в зависимости от соотношения и времени осаждения.

В настоящее время все больше исследований направлено на изучение батата в качестве альтернативного источника инулина. В связи с постоянным развитием методов культивирования растений, а также качественного и количественного улучшения содержания в них различных химических компонентов и их детекции, в том числе в сфере биотехнологий и генетической инженерии, предположительно будет наблюдаться все больший рост количества научных работ, сообщающих о перспективах использования батата как источника инулина.

1.4 Способы размножения *Ipomoea batatas* (L.) Lam.

Размножают батат семенами, корнеплодами или их частями, черенками и молодыми побегами или порослью, которая образуется в любом месте корнеплода из скрытых почек. К семенному размножению чаще прибегают в селекционной практике. В субтропической и умеренной зонах батат размножают черенками, полученными с маточных корнеплодов (Синеблудзе, 1951; Тютин, 1955). Маточные корнеплоды для получения черенков обычно закладывают на проращивание за 40-45 суток до высадки. Однако вегетативный способ размножения не всегда позволяет получать качественный посадочный материал и продукцию, вследствие передачи

вируса от растения-донора к размножаемому материалу (Aloufa, 2002; El-Afifi et al., 2012). Поэтому поиск альтернативных путей его размножения остается актуальной проблемой.

Решить данную проблему можно с использованием методов биотехнологии, в частности клеточной и генной инженерии.

Рядом авторов сообщалось, что посредством культуры клеток и тканей растений получается большое количество однородного и свободного от вирусов посадочного материала (Doliński, Olek, 2013). Отмечено, что использование почек, в качестве первичного экспланта является лучшим объектом для регенерации большого количества генетически стабильных растений сладкого картофеля (Doliński, Olek, 2013). Установлено, что ряд факторов, включая генотип, происхождение и концентрация различных регуляторов роста, определяют морфогенетический потенциал сладкого картофеля (Shaibu et al., 2016). Так, например, Thorpe (1994) сообщил, что регуляторы роста растений играют важную роль в таких процессах, как формирование каллусной ткани, органогенез или соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* (Калашникова, 2020). Кроме того, показано, что минеральный состав питательной среды, и в частности, источники азота, является одним из важных факторов, оказывающих влияние на рост и развитие растений *in vitro*.

Abubakar et al. (2018) сообщали, что добавление в питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) 6-бензиламинопурина (БАП), гибберелловой кислоты и α -нафтилуксусной кислоты (НУК) в различных соотношениях приводило к появлению множества побегов на культивируемых почках батата различных сортов. В работе Addae-Frimpomaah et al. (2014) описывается получение каллусной ткани на среде с низкой концентрацией БАП или кинетина (Кин). Они сообщили, что содержание в среде БАП в концентрации 0,25 мг/л приводило к формированию растений-регенерантов из каллусной ткани в 80% случаев. Наибольшее количество побегов на один

эксплант так же было получено на питательной среде, содержащей тидиазурон (ТДЗ) в концентрации 1 мг/л (El-Afifi et al., 2012).

Таким образом, исходя из анализа литературных данных, следует заключить, что выращивание растений батата в России – перспективное направление исследований, которое необходимо развивать. Кроме того, привлечение методов биотехнологии, позволит получать высококачественный посадочный материал отечественной селекции за короткое время.

1.5 Проблема холодоустойчивости батата и пути ее решения

В отличие от основных продовольственных культур, сладкий картофель дает сравнительно высокий урожай в относительно неблагоприятных условиях. На рост, развитие корней и продуктивность, сильно влияют абиотические стрессы, такие как засуха, низкая температура и засоление (Shao et al., 2014). Среди абиотических стрессов известно, что холодовой стресс является одним из основных факторов окружающей среды, ограничивающих сельскохозяйственное производство, вызывая ущерб до и после сбора урожая, что ежегодно приводит к огромным финансовым потерям в сельском хозяйстве. Холодовой стресс также оказывает огромное влияние на выживание и географическое распространение растений (Jan et al, 2009).

Несмотря на то, что батат - тропическое растение, перспективы выращивания в зонах умеренного климата достаточно высоки. Изначально тропические растения, такие как картофель, томаты, кукуруза, соя, ячмень, рис и др. успешно выращивают в странах с умеренным климатом. В будущем, благодаря достижениям селекции и биотехнологии, удастся устранить основные лимитирующие факторы размножения теплолюбивых растений в северных регионах.

Стандартные методы селекции демонстрируют ограниченный успех в создании устойчивых к холоду сельскохозяйственных растений, поскольку для большинства чувствительных к холоду растений существует потребность в межвидовой или даже межродовой гибридизации.

Среди методов биотехнологии, наиболее перспективных в создании новых форм растений, обладающих устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессовым факторам окружающей среды, следует отметить клеточную и генную инженерию.

Среди методов клеточной инженерии особое место занимает клеточная селекция *in vitro*, основанная на культивировании дедифференцированных клеток на питательных средах в присутствии селективного фактора с последующим отбором устойчивых клеточных культур к изучаемому стрессу и получением из них растений-регенерантов (Калашникова, 2020). Работы по клеточной селекции на устойчивость к низкотемпературным факторам ограничены. Холодовой стресс у растений может быть вызван температурами большого диапазона: от 10-15 градусов до нуля. Такому стрессу наиболее подвержены растения тропических и субтропических зон, в которых и произрастает батат. Первые исследования, в которых описывается возможность применения клеточной селекции на устойчивость к низким температурам клеточных линий, опубликованные еще в 1976 году (Калашникова, 2020). Основными объектами исследований были каллусные и суспензионные культуры табака и перца. Показано, что устойчивость клеток к охлаждению обусловлена способностью липидов мембран оставаться в жидком состоянии благодаря наличию большой пропорции ненасыщенных жирных кислот и/или повышенного содержания стеролов. Нарушения, вызванные отрицательными температурами, могут быть предотвращены аккумуляцией криопротекторов, уменьшением количества несвязанной воды при обезвоживании и увеличением способности переохлаждаться. Многие авторы отмечают, что в условиях температурного стресса в клетках растений происходят глубокие превращения запасных

питательных веществ, в частности, у не устойчивых растений, наблюдается накопление сахаров. Следует отметить, что среди работ по клеточной инженерии батата, выделяются только исследования по клональному микроразмножению (El-Afifi et al., 2012; Doliński, Olek, 2013; Addae-Frimpong et al. 2014; Abubakar et al. 2018). Что касается исследований по клеточной селекции батата на холодоустойчивость, то такие работы в доступной нам литературе не были обнаружены.

Генная инженерия - наиболее эффективный подход к повышению устойчивости растений к биотическим и абиотическим факторам, который не только переносит гены-мишени от одного организма к другому, но также направленно регулирует экспрессию собственных генов растений (Sanghera et al., 2011).

В настоящее время проблема повышения холодоустойчивости растений решается различными методами генной инженерии, наиболее эффективным следует признать получение трансгенных растений, конститутивно экспрессирующих ряд белков, связанных с адаптацией растений к холоду.

Среди этих белков следует отметить ряд факторов транскрипции (CBF1 / DREB1A, ThpI, MYBS3, ZAT12, HOS10, abi3 и др.) (Kolodyazhnaya et al., 2009).

Чтобы создать устойчивое к холоду растение, важно понимать механизмы акклиматизации и реакцию растения на стресс.

Первое, что происходит после холодового стресса в растительных клетках, — это повышение цитозольного Ca^{2+} как важного вторичного мессенджера (Dod et al., 2006).

При холодовом стрессе у растений на клеточном уровне наблюдаются нарушения функций, такие как дегградация мембран, образование АФК, денатурация белков и накопление, токсичных продуктов (Yuan et al., 2009). Кроме того, растения пытаются отреагировать на этот стресс изменением экспрессии генов, изменением состава мембран, синтезом белков холодового шока и антиоксидантных ферментов, которые, как считается,

играют роль в защите клеток от повреждений, индуцированных холодом. В частности, когда растения постепенно подвергаются холодовому стрессу, эти изменения на клеточном уровне могут вызывать устойчивость к холодовому стрессу, процесс, известный как «холодовая акклиматизация» (Shabala et al., 2017).

Модификация мембранного состава происходит, когда растения подвергаются холодовому стрессу, вследствие изменения липидного состава плазматической мембраны и оболочки хлоропластов. Предполагается, что эти изменения играют роль в приобретении морозостойкости при холодной акклиматизации: они могут предотвратить повреждение мембраны, вызванное замерзанием, за счет стабилизации двухслойной ламеллярной конфигурации (Uemura et al., 1997).

Углеводы, аминокислоты (пролин, глицин, аланин и серин) и полиамины считаются осмопротекторами. Это низкомолекулярные вещества, которые вырабатываются в больших количествах при воздействии различных стрессовых факторах, таких как засоление, засуха, холод и помогают пережить стрессовые условия. В случае холодового стресса, в период замерзания, с начальным образованием льда в апопластическом пространстве, водный потенциал снижается, что приводит к выходу воды из клетки во внеклеточный компартмент, вызывая внутриклеточную дегидратацию. Чтобы предотвратить обезвоживание клеток, осмопротекторы, такие как углеводы, накапливаются в клетке, чтобы уменьшить разницу в водном потенциале между апопластическим пространством и внутри клетки. Дегидрины могут играть роль в сопротивлении холоду, возможно, предотвращая дестабилизацию мембран, которая происходит во время осмотического сокращения, связанного с холодом (Uemura et al., 1997).

Несмотря на то, что было проведено значительное количество исследований для характеристики белков холодового шока (Cold shock

proteins - CSP) у бактерий и животных, то мало что известно об их функции у растений.

Основная цель белков холодового шока - помочь клетке преодолеть стрессовые изменения во время холода. Когда температура снижается, текучесть клеточной мембраны уменьшается, что влияет на активный транспорт и секрецию белка. Кроме того, эффективность транскрипции и трансляции снижается из-за стабилизации вторичных структур ДНК и РНК, фолдинг белка неэффективен, и рибосомы должны быть адаптированы к холоду, прежде чем они смогут нормально функционировать (Karlson et al., 2002).

Первым функционально охарактеризованным растительным белком с CSD (Cold shock domain - домен холодного шока) был белок CSP пшеницы (WCSP1). WCSP1 содержит область, богатую глицином, с вкраплениями трех С-концевых цинковых пальцев ССНС. МРНК WCSP1 активируется в ответ на холод, соответствующий белок накапливается в коронарной ткани при длительной акклиматизации к холоду. Уровни транскрипции WCSP1 не модулируются другими стрессами окружающей среды, такими как засоление, засуха, высокие температуры или обработка абсцизовой кислотой, что позволяет предположить, что WCSP1 специфичен для холодового стресса. WCSP1 связывается с ДНК и РНК и плавит двухцепочечные нуклеиновые кислоты *in vitro* и *in vivo* (Nakaminami et al., 2006).

Известно, что рис содержит два белка CSD [OsCSP1 (Os02g0121100) и OsCSP2 (Os08g0129200)]. Экспрессия OsCSP незначительно увеличивалась в тканях побегов и корней при кратковременном низкотемпературном воздействии. Однако уровни белка OsCSP не увеличивались в апикальной части в течение 10 суток низкотемпературного воздействия (Chaikam, et al., 2008). Эти данные сильно отличаются от наблюдаемых характеристик экспрессии WCSP1.

Четыре белка CSD (AtCSP1-AtCSP4) были идентифицированы у *Arabidopsis thaliana*. Мутант с нокаутом AtCSP3 (At2g17870) (*atcsp3-2*) был

более восприимчив к холоду, чем дикий тип, как при неакклиматизации, так и при акклиматизации в холодных условиях. Сверхэкспрессия AtCSP3 обеспечивает повышенную устойчивость к низким температурам у *Arabidopsis thaliana* без явных дефектов развития. AtCSP3 не влияет на экспрессию генов CBF и COR, но регулирует экспрессию генов, связанных со стрессом, роль которых в устойчивости к замораживанию неизвестна (Kim et al., 2009).

Одна из реакций растений на холодовой стресс - накопление гидрофильных белков, которые по гипотезе образуют амфипатическую α -спираль. Многие из генов, кодирующих эти белки, сначала были охарактеризованы как гены чувствительности к холоду, засухе и абсцизовой кислоте (АБК). Поэтому многие из них были названы COR (cold-responsive - отвечающие на воздействие холода), KIN (cold-induced - индуцированное холодом) или ERD (early responsive to dehydration - ранняя реакция на обезвоживание). К ним относятся дегидрины, которые определяют белки группы II с избыточным поздним эмбриогенезом (LEA). Дегидрины могут играть роль в устойчивости к замораживанию, возможно, предотвращая дестабилизацию мембран, которая происходит во время осмотического сокращения, связанного с замораживанием. Дегидрины, принадлежащие к LEA-белкам группы II, считаются стрессовыми белками, участвующими в формировании защитных реакций растений на обезвоживание. Их также можно отнести к гидрофилинам (Liu et al., 2017).

Хотя роль дегидринов полностью не определена, различные исследования продемонстрировали их роль в устойчивости к холодному стрессу. В частности, была обнаружена совместная сегрегация гена дегидрина с устойчивостью к холоду в вигне, а трансгенный табак со сверхэкспрессией дегидрина показал большую устойчивость к морозу, чем растения дикого типа без акклиматизации к холоду (Hara et al., 2001). Таким образом, биосинтез дегидрина, как и ожидалось, является одной из важных стратегий для растений по достижению устойчивости к холодному стрессу.

Есть много сообщений, которые демонстрируют продукцию активных форм кислорода (АФК) в условиях холодового стресса. Для удаления активных форм кислорода в нормальных и стрессовых условиях растения используют различные антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, глутатион, и ферменты, поглощающие АФК, такие как супероксиддисмутаза (SOD), аскорбатпероксидаза (APX), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GPX) и пероксиредоксин (PrxR), тем самым защищая потенциальное повреждение клеток и тканевую дисфункцию (Maleki et al., 2017).

Среди нескольких холодовых сигнальных путей CBF / DREB1-холодозависимый сигнальный путь лучше всего охарактеризован и является ключевым регуляторным путем (Chinnusamy et al., 2007). У арабидопсиса три CBF / DREB1 участвуют в регуляции экспрессии гена COR и устойчивости к холоду (Gilmour et al., 2000). Путь CBF / DREB1 (в основном CBF3 / DREB1A) контролируется фактором транскрипции MYC ICE1 (индуктор экспрессии CBF1) (Lee et al., 2005).

ICE1 может связываться с цис-распознающими элементами MYC (CANNTG) в промоторе CBF3 / DREB1A и индуцировать экспрессию CBF3 / DREB1A и его регуляцию во время акклиматизации к холоду (Maruyama et al., 2004). Приблизительно 40% генов COR и 46% генов факторов транскрипции, регулируемых холодом, регулируются с помощью ICE1, подтверждая, что ICE1 функционирует как главный регулятор, контролирующий CBF3 / DREB1A и многие другие гены COR (Maruyama et al., 2004).

CBF / DREB1 может связываться с цис-элементами CRT / DRE, A / GCCGAC в промоторе генов COR для регулирования экспрессии генов COR и принадлежит к группе факторов транскрипции (APF) ERF / AP2 (Mizoi et al., 2012). Геномный анализ показал, что гены CBF / DREB1 организованы в тандеме (CBF1 / DREB1B-CBF3 / DREB1A-CBF2 / DREB1C) на хромосоме IV арабидопсиса, CBF1 / DREB1B и CBF3 / DREB1A индуцируются

одновременно и раньше, чем CBF2 / DREB1C, а CBF2 / DREB1C – непосредственно после воздействия низких температур (Medina et al., 2011).

Некоторые факторы транскрипции, такие как ERF / AP2, RAP2.1 и RAP2.6 и цинковый палец C2H2-типа, STZ / ZAT10, приписываются регулону CBF (Vogel et al., 2005).

CBF1 / DREB1B и CBF3 / DREB1A имеют другие функции, чем CBF2 / DREB1C. Хотя CBF1 / DREB1B и CBF3 / DREB1A контролируют одну и ту же группу генов, они неизменно необходимы для индукции всех регулонов CBF / DREB1 и завершения холодной акклиматизации (Novillo et al., 2007).

Среди перечисленных транскрипционных факторов, связанных с холодоустойчивостью, можно выделить несколько перспективных для использования в генетической трансформации батата:

1) CBF3. Как отмечалось выше, фактор транскрипции CBF и его гены являются одними из наиболее важных элементов, участвующих в реакции на холод. Сверхэкспрессия AtCBF1 и AtCBF3 повышала устойчивость к холоду, тогда как сверхэкспрессия AtCBF2 не давала таких результатов (Pino et al., 2007).

Еще одно свидетельство перспективности данного гена - подавление экспрессии CBF1 и CBF3, что привело к 60% снижению устойчивости к воздействию холода (Novillo et al., 2007). Напротив, конститутивная сверхэкспрессия CBF1 или CBF3 в растениях арабидопсиса вызывает повышенную устойчивость к холоду. Тот факт, что сверхэкспрессия CBF приводит к конститутивной устойчивости к замораживанию, был отмечен у *Thlaspi arvense*, *Oryza sativa*, *Lolium perenne*, *Brassica napus* и *Ipomoea batatas* (Medina et al., 2011).

2) BZR1. Hui et al. исследовали функцию сигнальных компонентов брассинастерида при низкотемпературном стрессе (Li et al., 2017). Брассинастероиды - сигнальные киназы BZR1 (устойчивые к брассиназолу 1) играют положительную роль в регуляции реакции растений на низкотемпературный стресс. BZR1 усиливает экспрессию генов CBF путем

прямого связывания с их промоторами *in vitro* и *in vivo*. Более того, некоторые гены и пути, независимые от пути CBF, регулируются BZR1. Эти данные показывают, что BZR1 положительно регулирует устойчивость растений к воздействию холода посредством CBF-зависимых и CBF-независимых путей.

Нечувствительный brassinостероид 2 (BIN2) представляет собой GSK3-подобную киназу в передаче сигналов BR (Kim et al., 2010). В отсутствие BR активный BIN2 конститутивно фосфорилирует два гомологичных фактора транскрипции, резистентный к брассиназолу 1 (BZR1) и супрессор 1 BRI1-EMS (BES1), чтобы способствовать их деградации. В присутствии BR BIN2 дефосфорилируется с помощью BSU1 и расщепляется протеасомой 26S, которая впоследствии высвобождает ингибирование BZR1 и BES1 с помощью BIN2 (Yu, Chen, Hong, et al, 2008; Zang, Zhai, Gao, et al, 2009; Zhai, Liu, 2009). Дефосфорилированные BZR1 и BES1 накапливаются в ядре и связываются со своими генами-мишенями, запуская ответ BR (He, et al., 2002). BZR1 и BES1 представляют собой два хорошо охарактеризованных основных фактора транскрипции спираль-петля-спираль в сигнальном пути BR, которые имеют 88% идентичность последовательностей на аминокислотном уровне. И BZR1, и BES1 связывают BRRE (CGTGT / CG) и E-box (CANNTG) через консервативный N-концевой ДНК-связывающий домен и нацелены на ряд общих генов, регулирующих ответы, связанные с BR (Yin, et al., 2005). Холод вызывает накопление дефосфорилированного BZR1, а активация BZR1 вызывает экспрессию CBF1 / 2 и CBF-независимых генов путем связывания их промоторов с консервативными мотивами E-box / BRRE, тогда как BIN2 негативно регулирует реакцию растений на холодовой стресс, путем ингибирования индуцированного холодом дефосфорилированного белка BZR1. BZR1 также напрямую регулирует некоторые COR-гены, включая WRKY6, SAG21 и SOC1, которые не зависят от CBF, чтобы модулировать устойчивость растений к воздействию низких температур.

3) WRKY31. Факторы транскрипции WRKY являются одним из крупнейших семейств регуляторов транскрипции в растениях и составляют неотъемлемую часть сигнальных путей, которые регулируют многие процессы в растении. Новые данные показывают, что белки WRKY часто действуют как репрессоры, а также активаторы важных процессов в растении. Кроме того, становится ясно, что один фактор транскрипции WRKY может участвовать в регуляции нескольких, казалось бы, несопоставимых процессов.

Механизмы передачи сигналов и регуляции транскрипции распределяются путем определения функций белка WRKY посредством взаимодействия с разнообразным набором белков-партнеров, включая киназы MAP, киназы MAP, белки 14-3-3, кальмодулин, гистоновые деацетилазы, резистентные белки и другие транскрипционные факторы WRKY (Rushton et al., 2010).

Некоторые ранние исследования WRKY показали, что изолированный ген WRKY из ксерофитного вечнозеленого кустарника ларреи, является активатором передачи сигналов АБК (Zou et al., 2004). АБК служит связующим звеном в реакциях растений на абиотические стрессы, в том числе низкотемпературные, поэтому ее называют «гормоном стресса». При исследовании алейроновых клеток было показано, что OsWRKY24 и OsWRKY45 действуют как репрессоры индуцибельного промотора АБК, а OsWRKY72 и OsWRKY77 являются активаторами одного и того же промотора (Xie et al., 2005). АБК также участвует в реакции на низкотемпературный стресс, уровень АБК повышается у многих растений в ответ на низкую температуру, включая арабидопсис, и многие гены, реагирующие на холод, отвечают на АБК (Lang et al., 2004).

Например, у риса, индуцированного белком теплового шока HSP101 со сверхэкспрессией OsWRKY11, повышалась устойчивость к высоким температурам и засухе (Wu et al., 2009). Сходным образом сверхэкспрессия OsWRKY45 приводила к повышенной устойчивости к соли и засухе в

дополнение к повышенной устойчивости к различным заболеваниям. У *Arabidopsis thaliana* избыточная экспрессия AtWRKY25 или AtWRKY33 увеличивает устойчивость к засолению (Jiang et al., 1994).

Эти примеры показывают, что факторы транскрипции WRKY являются частью процессов передачи сигналов, связанных с ответом растений на различные условия абиотического и биотического стресса. Выбранные гены WRKY31 и BZR1 также показали значительные изменения в экспрессии до и после 12 часов низкотемпературного стресса, что указывает на их роль при воздействии низких температур.

Введение чужеродных генов в растения посредством генетической трансформации - очень многообещающее дополнение к традиционной селекции. Использование агробактериальной трансформации все еще остается наиболее широко применяемой среди различных стратегий переноса генов, поскольку не требует сложного оборудования, а сама технология адаптирована для многих культур. Данная технология не теряет своей актуальности.

На сегодняшний день система трансформации, опосредованная *Agrobacterium tumefaciens*, была разработана для широкого спектра генотипов сладкого картофеля. Несколько генов, связанных с засолением и засухоустойчивостью, устойчивостью к болезням и вредителям, а также биосинтезом крахмала, каротиноидов и антоцианов, были выделены и охарактеризованы из сладкого картофеля. Генная инженерия использовалась для улучшения устойчивости к абиотическим и биотическим стрессам и повышения качества этой культуры.

Используя трансформацию, опосредованную *A. rhizogenes*, Otani et al. (1993) наблюдали образование побегов из волосистых корней, индуцированное на листовых эксплантатах пяти сортов сладкого картофеля из 14 испытанных. Листья, черешки, стебли, запасные корни и эмбриогенные каллусы сладкого картофеля были использованы для трансформации, опосредованной *A. tumefaciens*, также были получены стабильные

трансгенные растения, но большинство исследований показали лишь низкую эффективность трансформации (Otani, et al., 2003, Song, et al. 2004, Liu, et al., 2011).

Несколько трансгенных растений были получены из эмбриогенных суспензионных культур сладкого картофеля cv. Lizixiang с использованием штаммов *A. tumefaciens* A208SE и LBA4404 (Jiang, et al. 2004). Используя штамм *A. tumefaciens* EHA105 и эмбриогенные суспензионные культуры cv. Lizixiang, Yu et al. (2007) удалось разработать эффективную систему трансформации сладкого картофеля, опосредованную *A. tumefaciens*. Клеточные агрегаты из эмбриогенных суспензионных культур совместно культивировали с EHA105, несущим бинарный вектор pCAMBIA1301 с генами *gusA* и *hptII* в течение трех суток. Добавление 30 мг/л ацетосирингона в среду для совместного культивирования привело к значительному увеличению эффективности трансформации. Селекционную культуру проводили с использованием гигромицина 25 мг/л. Приблизительно 500 трансгенных растений были получены из клеточных агрегатов одного грамма сырой массы с помощью этой системы трансформации. Таким образом, штамм *A. tumefaciens* EHA105 и эмбриогенные суспензионные культуры настоятельно рекомендуются для трансформации сладкого картофеля. Исследование Zang et al. (2009) показали, что ген *bar* можно использовать в качестве селективируемого маркерного гена с уровнем фосфинотрицина (PPT) 0,5 мг/л, который можно комбинировать с другими агрономически важными генами для улучшения сладкого картофеля. Эта опосредованная *A. tumefaciens* система трансформации эмбриогенными суспензионными культурами подходит для широкого спектра генотипов сладкого картофеля (Fan, et al. 2012, 2015, Gao, et al., 2012, Liu, et al., 2014, Wang, et al., 2016). Показано, что трансгенные растения батата, были устойчивые к абиотическим факторам. Развитие стрессовой реакции на воздействие абиотических факторов связано с различными биохимическими изменениями.

Осмотический стресс часто приводит к более высокому накоплению пролина и супероксиддисмутазы и более низкому уровню малонового альдегида, что связано со степенью устойчивости к осмотическому стрессу (Liu, et al., 2014). Абсцизовая кислота (АБК) широко накапливается в растениях в неблагоприятных условиях, что повышает устойчивость растений к стрессам окружающей среды (Ikegami, et al., 2009). Ожидается, что усиление системы поглощения активных форм кислорода (АФК) повысит устойчивость растений к различным типам стрессов (Kikuchi, et al., 2015).

Ген LOS5, который кодирует сульфуразный кофактор молибдена (MCSU), катализирует образование сульфурированной формы кофактора молибдена, необходимого для функционирования альдегидоксидазы на последнем этапе биосинтеза АБК в растениях. LOS5 / ABA3 является ключевым регулятором устойчивости арабидопсиса к холоду, засолению или засухе (Xiong, et al., 2001). Растения сладкого картофеля (сорт Lizixiang), сверхэкспрессирующие ген AtLOS5, проявляли повышенную солеустойчивость (Gao, et al., 2011). Их солеустойчивость оценивалась с помощью раствора Хогланда, содержащего 86 мМ NaCl в теплице, и число копий интегрированного гена AtLOS5 в диапазоне от 1 до 3 было подтверждено саузерн-блот-анализом. У арабидопсиса ионный гомеостаз опосредуется в основном кластером генов SOS (Salt Overly Sensitive), состоящим из SOS1, SOS2 и SOS3, сигнального пути (Yang, et al., 2009). Gao et al. (2012) перенесли SOS1 + SOS2 + SOS3 в сладкий картофель (сорт Xushu 18) и получили солеустойчивые трансгенные растения. В этих исследованиях трансгенные растения имели значительно более высокие уровни пролина, SOD и АБК и значительно более низкое содержание малонового альдегида, чем в нетрансформированных контрольных растениях.

Белки позднего эмбриогенеза (Late embryogenesis-abundant - LEA) относятся к большой группе растительных белков, которые в большом количестве синтезируются и сохраняются во время созревания семян. Эти белки играют защитную роль в условиях осмотического стресса. кДНК белка

позднего эмбриогенеза 14 (LEA14) была выделена из библиотеки EST, полученной из обработанных дегидратацией волокнистых корней сладкого картофеля. Трансгенные каллусы, сверхэкспрессирующие IbLEA14, обнаруживают повышенную устойчивость к засухе и солевому стрессу, подтверждая, что IbLEA14 может положительно регулировать ответ на различные стрессы путем усиления лигнификации (Park, et al., 2011).

Кластерный каркасный белок железо-сера (IbNFU1), пирролин-5-карбоксилатредуктаза (IbP5CR), маспардин (IbMas), индуцированная солью метилтрансфераза (IbSMT1) и гены вакуолярных Na⁺ / H⁺ -антипортеров (IbNHX2) были выделены из устойчивых к засолению линий сладкого картофеля. Эти пять генов были введены в сорта сладкого картофеля Lizixiang, Kokei 14, Shangshu 19, Shangshu 19 и ND98, соответственно, и растения со сверхэкспрессией данных генов продемонстрировали значительно более высокую солеустойчивость по сравнению с диким типом (Liu, et al., 2015, Wang, et al., 2016). Сверхэкспрессирующие IbNHX2 растения сладкого картофеля также показали улучшенную засухоустойчивость (Wang, et al., 2016). Содержание пролина, активность SOD и фотосинтеза были значительно увеличены, тогда как содержание МДА было значительно снижено в трансгенных растениях. Также было обнаружено, что H₂O₂ значительно меньше накапливается в трансгенных растениях. Их сверхэкспрессия активировала гены, участвующие в реакции на стресс, фотосинтез и систему удаления АФК. Эти данные свидетельствуют о том, что эти гены повышают устойчивость трансгенных растений сладкого картофеля к соли и засухе за счет регулирования осмотического баланса, защиты целостности мембран и фотосинтеза и активации системы поглощения АФК. Эти гены, особенно IbP5CR, потенциально могут быть использованы для улучшения сладкого картофеля с точки зрения устойчивости к засолению и засухоустойчивости и других растений. Кроме того, ген AtNHX1 был введен в сладкий картофель (сорт

Xushu 22) для придания устойчивости к засолению и холоду (Fan, et al., 2015).

Мио-инозитол-1-фосфатсинтаза (MIPS) является ключевым ферментом, ограничивающим скорость биосинтеза мио-инозитола. Было показано, что ген MIPS улучшает устойчивость к абиотическим стрессам, включая засоление, обезвоживание и воздействие низких температур у арабидопсиса (Kaur, et al., 2013), риса, табака (Tan, et al., 2013) и *Brassica juncea* (Goswami, et al., 2014). Ген IbMIPS1 был выделен из сладкого картофеля cv. Nongda 603 (Zhai, Liu, 2009), и его экспрессия индуцировалась NaCl, полиэтиленгликолем (PEG) и АБК (Zhai, et al., 2016). Его сверхэкспрессия активировала различные гены, участвующие в биосинтезе инозита, сигнальных путях фосфатидилинозита и АБК, стрессовых реакциях, фотосинтезе и системе удаления АФК в условиях солевого стресса и засухи, что значительно повышало устойчивость трансгенного сладкого картофеля к соли и засухе в полевых условиях (Zhai, et al., 2016).

Известно, что накопление глицинбетаина (ГБ) в высших растениях повышает устойчивость растений к различным абиотическим стрессам, таким как засуха, засоление и холод. Ген, кодирующий бетаинальдегиддегидрогеназу (BADH), участвует в биосинтезе ГБ у растений, и его сверхэкспрессия увеличивает накопление ГБ и впоследствии повышает устойчивость растений к абиотическим стрессам (Zhang. et al., 2011). Хлоропластный ген BADH из *Spinacia oleracea* (SoBADH) был введен в сладкий картофель (сорт Xushu 2), и трансгенные растения показали улучшенную устойчивость к различным абиотическим стрессам, включая засоление, окислительный стресс и низкие температуры (Fan, et al., 2012). Повышенная активность BADH и накопление ГБ в трансгенных растениях усиливают защиту от повреждения клеток за счет поддержания целостности клеточной мембраны, более сильной фотосинтетической активности и активации поглощения АФК (Fan, et al., 2012).

Окислительный стресс - один из основных факторов, вызывающих повреждение растений, подверженных стрессам окружающей среды. Kwak et al. (1995) и Kim et al. (2003) клонировали ген сильной индуцируемой окислительным стрессом пероксидазы (SWPA2) из культивируемых клеток сладкого картофеля и впоследствии охарактеризовали его функцию в трансгенных растениях табака и трансгенных культивируемых клетках сладкого картофеля, подверженных стрессам окружающей среды. Трансгенные растения сладкого картофеля (сорт Yulmi) с повышенной устойчивостью к метилвиологен-опосредованному окислительному стрессу, холоду и засухе были разработаны путем экспрессии генов супероксиддисмутазы CuZn (CuZnSOD) и аскорбатпероксидазы (APX) под контролем окислительного индуцируемый стрессом промотор SWPA2 (Li, et al., 2006, Lim, et al., 2007). Белки цинковых пальцев связаны с реакциями растений на абиотический стресс. Трансгенные растения сладкого картофеля (сорт Yulmi), экспрессирующие ген хладо-индуцируемого белка цинкового пальца сои (SCOF-1) под контролем промотора SWPA2, показали повышенную устойчивость к низкотемпературному стрессу (Kim, et al., 2011).

Трегалоза играет важную роль в устойчивости растений к абиотическому стрессу, и ее биосинтез катализируется двумя ключевыми ферментами: трегалозо-6-фосфатсинтазой (TPS) и трегалозо-6-фосфатфосфатазой (TRP). Jiang et al. (2014) выделили ген TPS, названный IbTPS, из сладкого картофеля (сорт Lushu 3). Растения табака со сверхэкспрессией IbTPS (сорт Wisconsin 38) проявляли значительно более высокую солеустойчивость по сравнению с диким типом. Было обнаружено, что содержание трегалозы и пролина значительно больше накапливается в трансгенных растениях табака, и несколько генов, чувствительных к стрессу, подвергались повышенной регуляции. Это исследование предполагает, что IbTPS может повышать солеустойчивость растений за счет увеличения

количества тряхалозы и пролина, которые регулируют экспрессию генов, чувствительных к стрессу.

Yu et al. (2008) в арабидопсисе идентифицировали новый ген засухоустойчивости HOMEODOMAIN GLABROUS 11 (HDG11), который кодирует белок из семейства факторов транскрипции HD-START. HDG11 играет важную роль в устойчивости к засухе и засолению. Ruan et al. (2012) передали ген HDG11 сладкому картофелю (сорт Lizixiang) и обнаружили, что трансгенные растения демонстрируют повышенную засухоустойчивость.

Каротиноиды и антоцианы являются важными антиоксидантами в растениях, и их накопление часто повышает устойчивость растений к абиотическим стрессам. Подавление генов бета-каротин-гидроксилазы (CHY-beta) и ликопин-ε-циклазы (LCY-ε), IbCHY-beta и IbLCY-ε, повышение солеустойчивости трансгенных культивируемых клеток или каллусов сладкого картофеля из-за повышенного накопления каротиноидов (Kim, et al., 2013). Трансгенные каллусы с геном сладкого картофеля (IbOr) также проявляли повышенную антиоксидантную активность и устойчивость к солевому стрессу (Kim, et al., 2013). Ген геранилпирофосфатсинтазы сладкого картофеля (GGPS), IbGGPS, повышал устойчивость к осмотическому стрессу у арабидопсиса, предполагается, что этот ген участвует в устойчивости сладкого картофеля к осмотическому стрессу (Chen, et al., 2015). Подавление гена дигидрофлавонол-4-редуктазы (DFR) (IbDFR) у трансгенного сладкого картофеля с использованием подхода РНКи снижает антиоксидантную активность из-за снижения накопления антоцианов по сравнению с диким типом (Wang, et al., 2013). Сорт с апельсиновой мякотью (Sinhwangmi) с высоким уровнем каротиноидов был трансформирован геном IbMYB1, и трансгенные линии показали гораздо более высокую антиоксидантную активность (Park et al. 2015).

Металлотионеины (МТ) - это богатые цистеином низкомолекулярные металлсвязывающие белки, которые широко распространены в живых организмах. Растения производят металлохелатирующие белки, такие как

MT, чтобы преодолеть токсическое действие тяжелых металлов. Kim et al. (2014) клонировали три гена MT, IbMT1, IbMT2 и IbMT3, из листьев сладкого картофеля. Уровень экспрессии IbMT1 и IbMT3 сильно повышался в ответ на Cd и Fe. Кроме того, IbMT1 сильно реагировал на метилвиологен (MV; паракват) и NaCl, тогда как IbMT3 индуцировался низкой температурой и PEG. Эти результаты показывают, что эти гены могут участвовать в ответах сладкого картофеля на тяжелые металлы, MV и абиотические стрессы.

Таким образом, приведенные данные указывают на перспективность использования агробактериальной трансформации для развития устойчивости батата (сладкий картофель) к различным абиотическим факторам, прежде всего к фактору холода. В России возможно промышленное выращивание сладкого картофеля. Для повышения продовольственной и сельскохозяйственной безопасности страны необходимо разработать агротехнику, позволяющую получать высокий урожай и высокое качество сельскохозяйственной продукции. В конечном итоге сладкий картофель, как ценный диетический продукт, может пополнить основной список продуктов, доступных населению страны.

ГЛАВА 2

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работу проводили на кафедре Биотехнологии Российского государственного аграрного университета-МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва).

2.1 Объект исследования

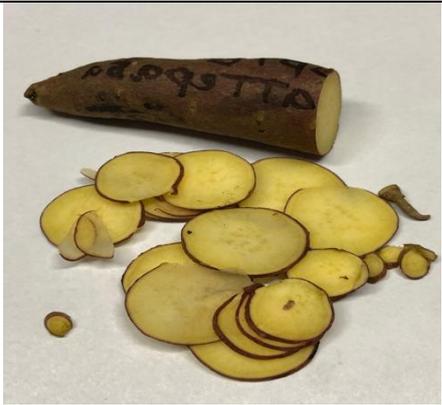
В работе исследовали 9 сортов овощного батата. Исследуемые сорта отличаются цветом мякоти и кожурой клубнеплодов, а также разными сроками созревания. Основные характеристики сортов и внешний вид клубнеплодов представлены в таблице 2 и внешний вид листьев – на рисунке 2.

Таблица 2. - Характеристика сортов батата, используемых в работе

Сорт	Описание сорта	Фотография (автора)
Овощные сорта – ранние сорта (90-100 дней)		
Винницкий розовый	Сорт имеет клубнеплоды большого размера, кожура имеет розовый цвет, светлая и сочная мякоть, имеет краевые кольца насыщенного белого окраса, формирует мощный куст, клубнеплоды залегают на большой глубине. Этот сорт по праву считается самым востребованным, так как отличается не только высокой урожайностью, но и неприхотливостью к условиям выращивания. Является ранним сортом, поэтому пригоден для выращивания в северных регионах. Само растение формирует достаточно мощный куст, который цветет не часто. С одного куста можно собрать всего 2-3 клубнеплода, которые хорошо хранятся. https://nasotkah.com/ovoshhi/batat/obzor-sortov.html	

<p>Пурпл (Purple)</p>	<p>Сорт американской селекции, имеет удлиненные клубнеплоды темно-фиолетового цвета, мякоть фиолетовая с неярким белым мраморным рисунком, сухая, плотная, малосладкая. Сорт устойчив к насекомым. Сорт ранний. При термообработке цвет не изменяется, вкус напоминает лучшие сорта картофеля, с легким оттенком каштанов. Сорт считается особенно полезным для здоровья из-за большого содержания антоцианов. Этот сорт хорошо использовать при приготовлении борща.</p>	
<p>Тайнунг Т-65</p>	<p>Сорт селекции тайваньских ученых и привезен в Россию из Великобритании. Самый урожайный и скороспелый сорт, образует крупные клубнеплоды с розовой кожицей и желтой сладкой мякотью, длинные тонкие плети с бордовыми стеблями, длина стеблей достигает до 3м, срок вегетации 90 суток, поэтому наслаждаться нежно-сладковатым вкусом можно уже в августе жителям средней полосы России. Идеален для жарки. Не повреждается вредителями и болезнями. Источник: https://nasotkah.com/ovoshhi/batat/obzor-sortov.html</p>	
<p>Рубин Каролины</p>	<p>Сорт привезен в Россию из США, выведен селекционерами университета Северной Каролины. Сорт ранний, с темно-оранжевой сладкой мякотью клубнеплодов и рубиново-красной кожицей. Урожайный, отличается компактным расположением клубнеплодов под растением. Интенсивно плетистый и активно цветущий сорт. Устойчив к фузариозу и корневой гнили.</p>	

Овощные сорта – средние сорта батата (110-120 дней)		
Джевел (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. В сыром виде похож на морковь. Имеет аромат картофеля, тыквы и сливы. Каждый куст образует небольшие плети и большое количество среднеразмерных клубнеплодов. Сорт средне-ранний, успевает вызревать в условиях средней полосы. Растение компактное, формирует 3-4 плети до 50 см длиной. Все клубнеплоды расположены в основание куста.	
Американский бежевый	Сорт американской селекции. Клубнеплоды бежевого цвета, плотные, крахмалистые, имеют умеренно сладкий вкус. Образует компактный куст с трёхзубчатым листом. Вегетационный период составляет 100-110 суток. Можно использовать как заменитель картофеля в блюдах или дополнение к нему (супы, борщи, запекание в глиняном горшке, котлеты, салаты и т.д.)	
Овощные сорта – среднепоздние сорта батата (120-150 суток)		
Мускатный	Сорт, который отличается отсутствием цветения и не повреждается грызунами. Куст имеет не очень длинные плети, листья темно-зеленые округлой формы. Клубнеплоды чаще всего овальной формы, с небольшими добавлениями в виде «хвостиков», кожура светлая, мякоть бежево-желтая и очень шершавая. Сырая мякоть очень хрустящая и достаточно плотная. При длительном хранении не теряет своих свойств, а наоборот становится более сладкой.	

<p>Порту Баттераба</p>	<p>Сорт создан селекционерами Португалии. Клубнеплод имеет кожу и подкожный слой свеклоного цвета, мякоть сладкая желтого цвета плотной консистенции. Растения образуют плети средней длины с очень толстыми стеблями красно-свеклоного цвета. Клубнеплоды расположены компактно, урожайность высокая, при условии 130-140 дней.</p>	
<p>Порто Рико</p>	<p>Сорт привезен в Россию из Португалии. Клубнеплод плотный, сильно крахмалистый, сладкий, слабоволокнистый, режется очень трудно. Для сыроядения не подходит. Срок вегетации до 150 суток. В запечённом виде сладкий, очень вкусный, напоминает заварной крем. Урожайный. Листья сильно рассеченные.</p>	

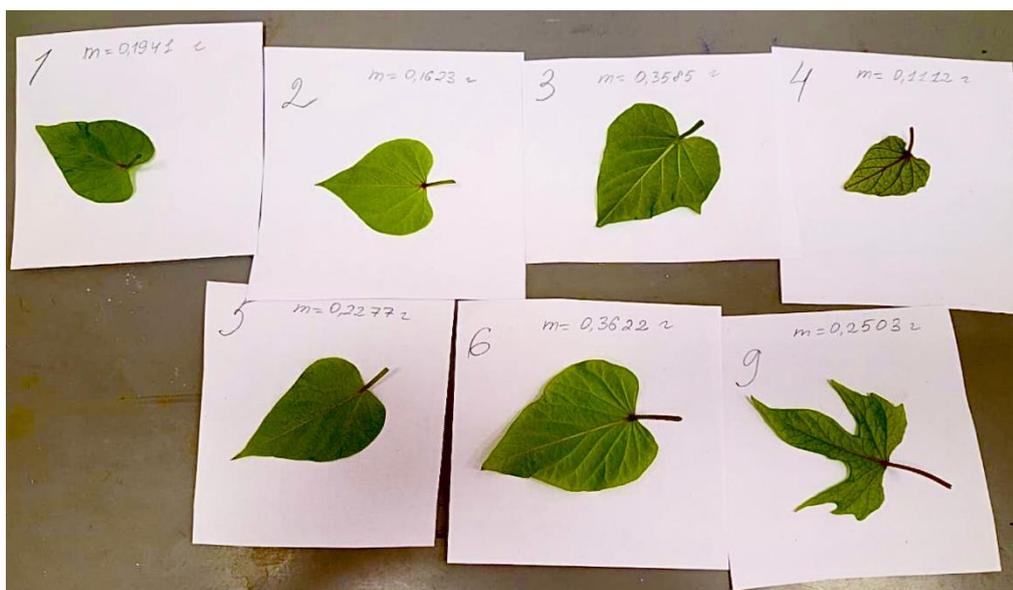


Рис. 2 Внешний вид листьев разных сортов батата, изучаемых в работе

Первичным эксплантом служили черенки, содержащие одну пазушную почку или верхушки побегов, изолированные с проросших клубнеплодов батата (Рис. 3).

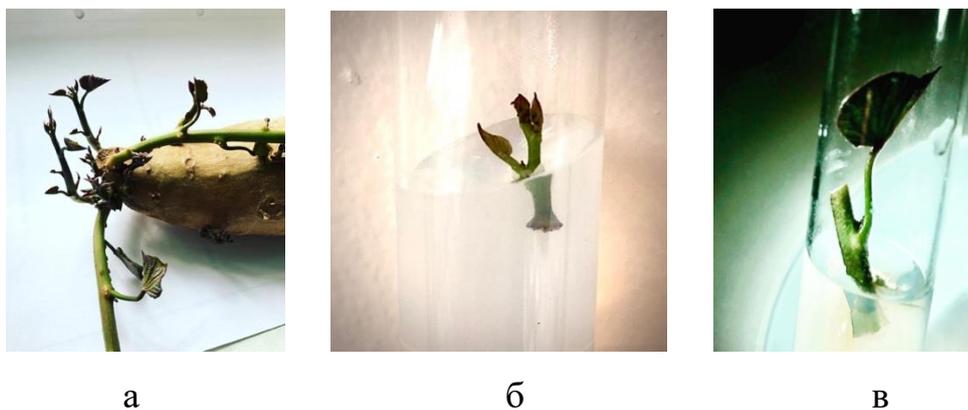


Рис. 3 Первичные экспланты: а – формирование побегов из спящих почек, б – верхушечная часть побега, в - сегмент стебля

2.2 Получение стерильной культуры

Перед введением в культуру *in vitro* клубнеплоды батата помещали во влажный почвенный субстрат для активации роста спящих меристем. Начало формирования побегов из почек наблюдали уже на 7-е сутки, а на 21 сутки наблюдали образование побегов разной длины. Скорость роста побегов зависела от исследуемого сорта (Рис. 4). С таких побегов в дальнейшем нарезаали первичные экспланты (черенки и верхушки побегов).



Рис. 4 Побеги, сформированные из клубнеплодов батата: а – сорт Тайнунг Т-65; б – Порто Рико

Первичные экспланты перед введением в культуру *in vitro* подвергали поверхностной стерилизации. В качестве стерилизующего агента использовали 0,1%-ный раствор сулемы (HgCl_2). Экспланты выдерживали в сулеме в течение 10 минут, после чего их промывали трижды стерильной дистиллированной водой. Работу проводили в условиях ламинар-бокса по методике, разработанной на кафедре Биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева (Калашникова, Чередниченко, Киракосян и др, 2017).

2.3 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) (Murashige, Skoog, 1962), в концентрациях 1/2 МС, 1/3 МС, 1 МС и 1 ½ МС. Кроме того, в работе изучали влияние различных регуляторов роста на морфогенетическую активность культивируемых эксплантов. В качестве цитокининов изучали действие 6-бензиламинопурина (БАП), кинетина в концентрациях 0,5-2 мг/л и препарата Дропп в концентрациях 0,1-1 мг/л. В качестве ауксина во всех вариантах питательных сред использовали индолил-3-уксусную кислоту (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, содержащей ½ нормы минеральных солей по прописи МС с добавлением ауксинов: индолил-3-уксусная кислота (ИУК) и индолил-масляная кислота (ИМК) в концентрациях 0,5 и 1 мг/л. При этом учитывали укореняемость микропобегов (%), а также индекс роста корней (I) и удельная 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.

2.4 Выращивание микрочеренков в условиях светокультуры

Исследования 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 (рис. 5)
2. R/FR = 1/2, PPFD = 142 (±10) мкмоль/м²с (рис. 6)
3. R/FR = 2, PPFD = 142 (±10) мкмоль/м²с (рис. 7)
4. Контроль: линейно-люминесцентные лампы, 4000К, PPFD 150 мкмоль/м²с (рис. 8)

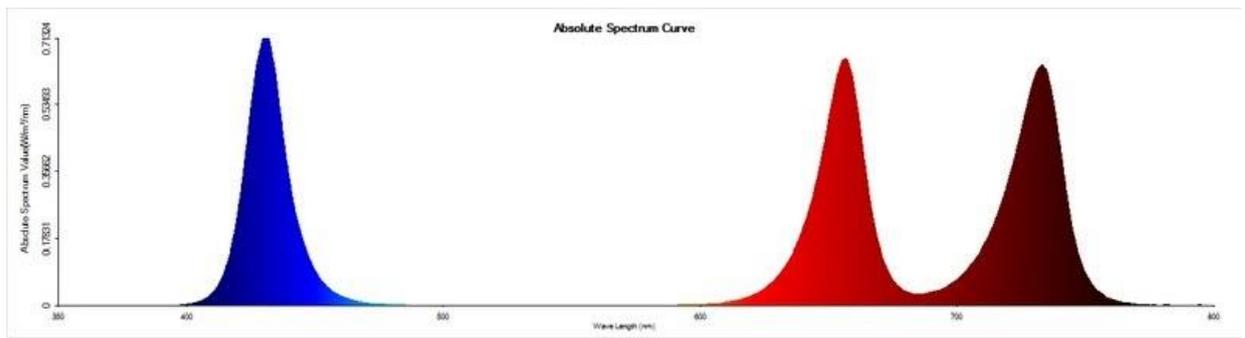


Рис. 5 $R=FR$

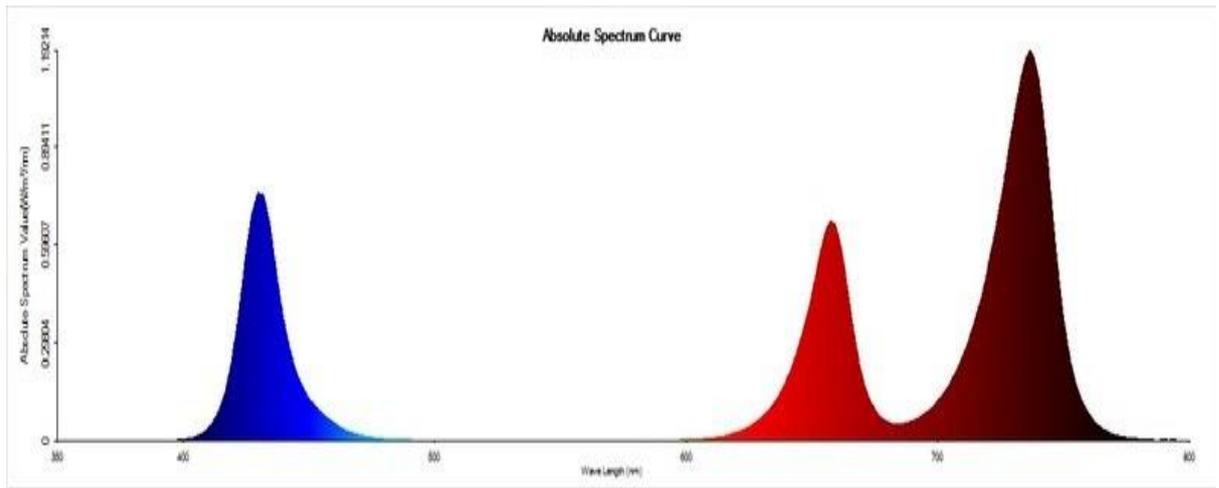


Рис. 6 $R < FR$

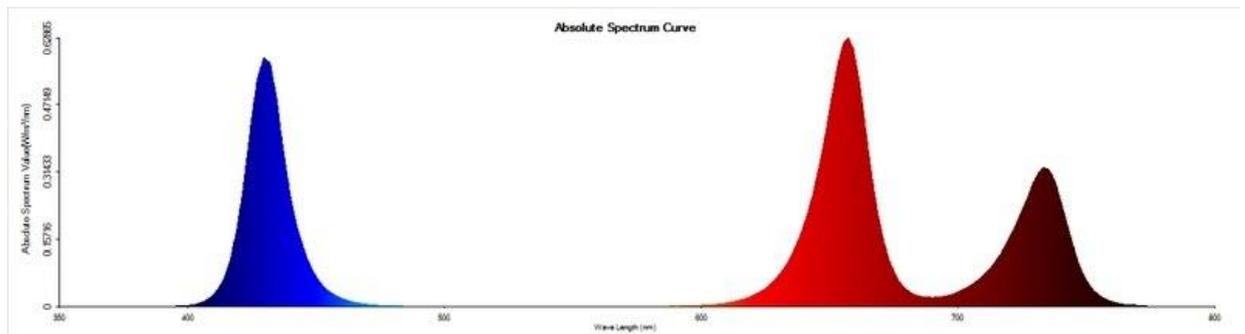


Рис. 7 $R > FR$

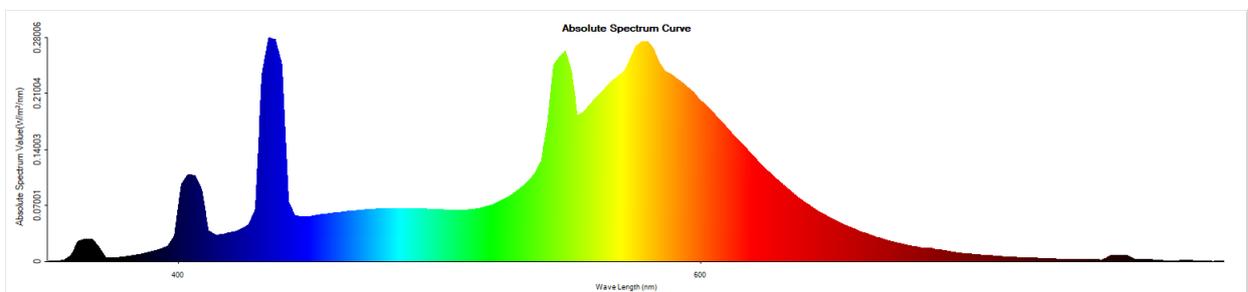


Рис. 8 Контроль (люминесцентные лампы)

Выращивание в светокультуре

Выращивание первичных эксплантов проводили в световой комнате, где были установлены разные режимы освещения:

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 (Рис. 9, Табл. 3).

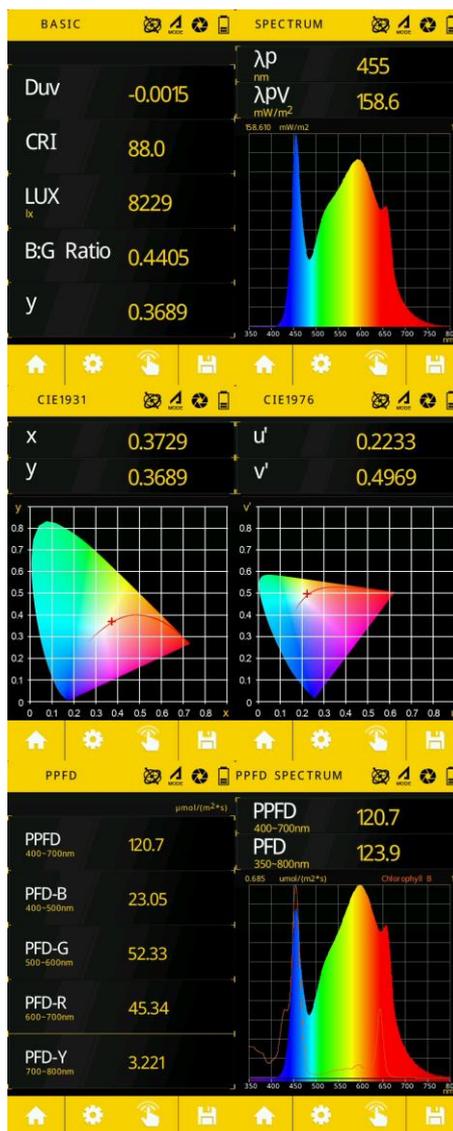


Рис. 9 Контрольное освещение (1 вариант)

Таблица 3 - Характеристика освещения (1 вариант)

%	Спектральный диапазон	ммоль/м.кв*с
0,007666865	PFD-UV (350~400nm)	0.009503
18,59726461	PFD-B (400~500nm)	23.051117
42,21765466	PFD-G (500~600nm)	52.328346
36,5790977	PFD-R (600~700nm)	45.339413
2,59831617	PFD-FR (700~800nm)	3.220586

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% (Рис. 10, Табл. 4).

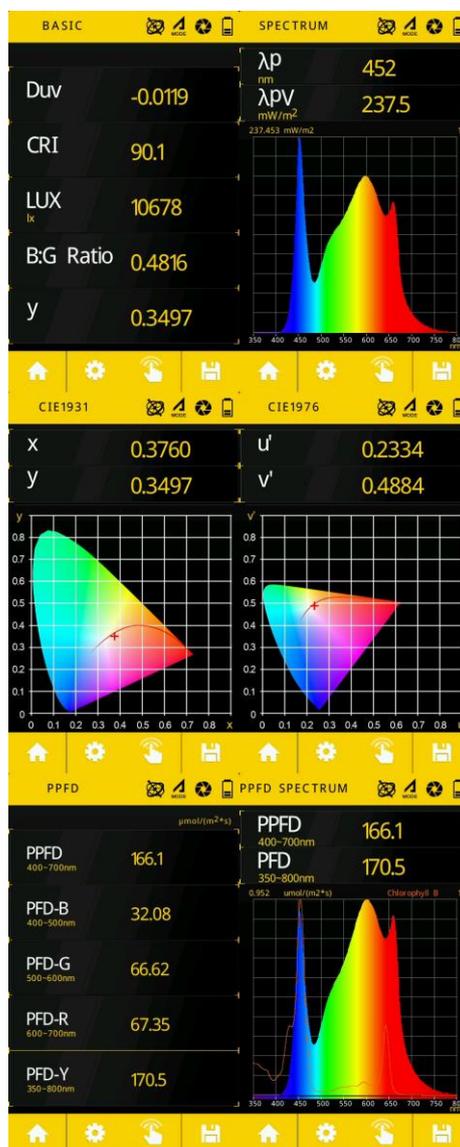


Рис. 10 К:70% / С:30% (2 вариант)

Таблица 4 - Характеристика освещения (2 вариант)

%	Спектральный диапазон	ммоль/м.кв*с
0,00938167	PFD-UV (350~400nm)	0.015993
18,82086275	PFD-B (400~500nm)	32.084061
39,08276473	PFD-G (500~600nm)	66.624672
39,50557751	PFD-R (600~700nm)	67.345444
2,581413334	PFD-FR (700~800nm)	4.400554

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% (Рис. 11, Табл. 5).

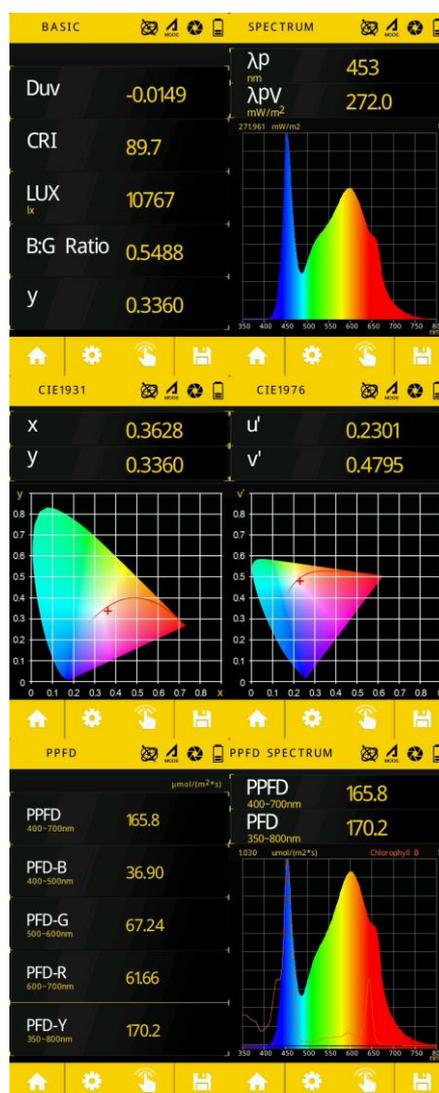


Рис. 11 К:30% / С:70% (3 вариант)

Таблица 5 - Характеристика освещения (3 вариант)

%	Спектральный диапазон	ммоль/м.кв*с
0,005696214	PFD-UV (350~400nm)	0.009696
21,6778624	PFD-B (400~500nm)	36.899696
39,50095199	PFD-G (500~600nm)	67.237862
36,22118776	PFD-R (600~700nm)	61.655102
2,594301637	PFD-FR (700~800nm)	4.415977

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

Для определения действия различных спектров на динамику роста микрочеренков и корневой системы определяли такие показатели как: индекс роста (I) и удельную скорость роста (μ) по формулам

Для определения индекса роста (I) применяют формулу

$$I = \frac{X_{\max} - X_0}{X_0},$$

где X_{\max} и X_0 — максимальное и начальное значения содержания клеток в 1 мл среды соответственно, кл/мл.

Для определения удельной скорости роста (μ) применяют формулу

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1},$$

где X_2 и X_1 — высота побега/длина корневой системы (см), в моменты времени t_2 и t_1 , сут, соответственно.

2.5 Селекция *in vitro* к гипотермическому стрессу

Клеточную селекцию на устойчивость к пониженным положительным температурам проводили на каллусной ткани, полученной из листовых сегментов асептических растений.

Каллусную ткань культивировали на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи МС, нафтилуксусную кислоту (НУК) в концентрации 1 мг/л в сочетании с 6-бензиламинопурином (БАП) 0,5 мг/л, а

также препарат Мивал или препарат Крезацин в концентрации 150 мг/л. Препараты добавляли в состав питательной среды с целью изучения их влияния на устойчивость каллусных клеток батата к действию низких положительных температур. Хорошо пролиферирующую каллусную ткань помещали в термостат и культивировали в течение 2, 5, 7 и 10 суток при температуре 14⁰С. При этом часть каллусной ткани на протяжении всего опыта находилась на питательной среде без добавления препаратов Мивал или препарата Крезацин. Такие каллусы служили контролем, отражающим характер изменения изучаемых показателей при действии только низких положительных температур (14⁰С).

2.6 Адаптация растений-регенерантов к условиям *ex vitro*

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

Адаптация на аэропонике.

Аэропоника основана на выращивании растений в воздушной или туманной среде без использования почвы или агрегатных сред. В качестве оборудования для адаптации микрорастений использовали GrowPlant X-Stream 120 (Нидерланды) — аэропонный клонер на 120 посадочных мест с системой орошения корневой зоны черенков или растений (Рис. 12). В комплектацию пропaгатор «X-Stream 120» входит клонaрий, рама для горшков, система распыления, и пробки из неопрена.

В аэропонной 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%. Кроме удобрения «Растворин» в систему добавляли 3 жидких комплексных минеральных удобрения марки General Hydroponics серии FloraSeries - FloraGrow, FloraBloom, FloraMicro.



Рис. 12 GrowPlant X-Stream 120: а – шайбы-держатели, б – растения-регенеранты в держателях, в – внешний вид пропегатора «X-Stream 120»

Оборудованием для адаптации микрорастений в почвенных условиях служила установка гидравлическая стеллажная УГС-4. Источником освещения служили натриевые лампы ДНаТ, мощностью 400 Вт, цоколь Е40, установленные в теплице.

В качестве субстрата при адаптации в почвенных условиях использовали готовый грунт «Универсальный» (Россия) торговой марки «Родная Земля» - высококачественный натуральный грунт многоцелевого назначения на основе торфа, полностью готовый к применению для выращивания ягодных, цветочных и декоративных культур. 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.

Адаптация в почве.

Пересадку микроклонов батата из условий *in vitro* в условия *ex vitro* проводили по следующей методике (Рис. 13): 1 - микроклоны извлекали из культуральных сосудов, тщательно промывали корневую систему в проточной водопроводной воде и затем обрабатывали 0,1%-ным раствором KMnO_4 в течение 10 минут; 2 – микроклоны затем высаживали в 5 литровые пластиковые сосуды с заранее плотно набитым грунтом и сверху накрывали полиэтиленовым пакетом; 3 - проводили опрыскивание растений и полив по мере необходимости.

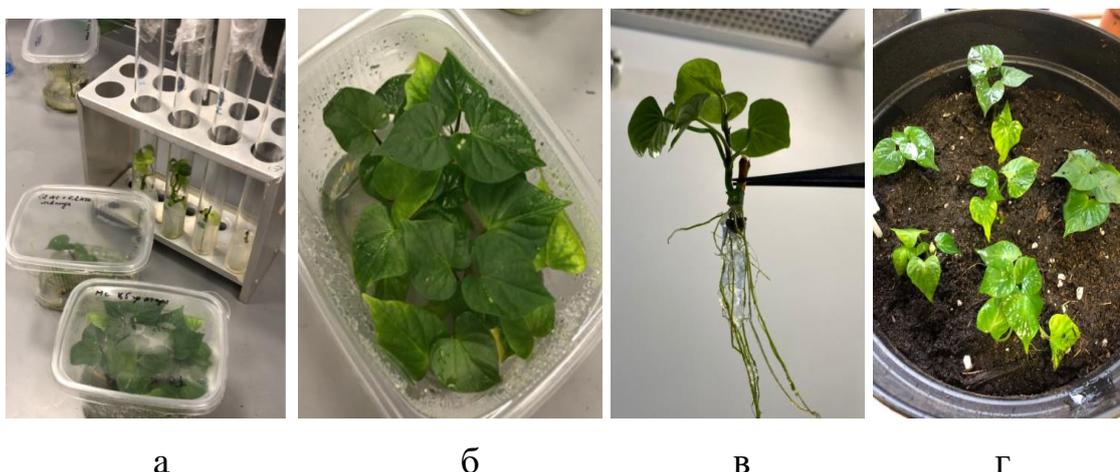


Рис. 13 Этапы адаптации растений-регенерантов батата *ex vitro*: а – материал для адаптации, б – микроклоны для адаптации, в – растения перед адаптацией, г – растения в почве

Через 1 месяц после пересадки в условия *ex vitro* оценивали выживаемость микроклонов и их биометрические показатели – высота побегов (см).

Доращивание растений в условиях теплицы

После одного месяца адаптации в аэропонных и почвенных условиях растения с хорошо сформированной вегетативной частью и корневой системой были высажены в почву и перенесены в условия теплицы. Для этого использовали цветочные горшки объемом 5 литров, керамзит и вермикулит марки «Morris Green», биоперегной универсальный фирмы «Поля русские». В качестве субстрата использовали смесь, состоящую из земли и вермикулита в соотношении 1:3. Полив и опрыскивание осуществляли один раз в неделю. Ежедневно проводили осмотр растений на наличие бактериальных и грибных болезней.

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). Оптимальная для нормального развития температура в пределах + 25-30⁰С. Почва опытного поля плодородная, по

составу достаточно легкая и дренированная. Кислотность почвы была в пределах 5,5-6,5 рН. Урожай собирали в конце сентября, в ручную. Собранные клубнеплоды освобождали от остатков земли, подсушивали и отправляли на хранение. Повторно их использовали в экспериментах *in vitro*.

2.7 Условия культивирования *in vitro* и *ex vitro*

На стадии размножения и укоренения растения культивировали в световой комнате, при температуре +21 – 23 °С, 16-часовом фотопериоде, при освещении белыми флуоресцентными лампами (марка «OSRAM AG», производство – Германия) с интенсивностью 3 – 3,5 тыс. люкс.

Адаптацию и дорастивание растений в условиях *ex vitro* проводили при температуре + 22 °С в помещениях с относительной влажностью воздуха 60-70%.

2.8 Биохимические исследования

Определение основных биохимических показателей проводили в корнеплодах всех изучаемых сортов 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 в листьях интактных растений, перед введением эксплантов в культуру *in vitro*, а также в каллусной ткани в процессе культивирования. Для извлечения фенольных соединений материал измельчали, а затем подвергали экстракции горячим 96%-ным этанолом. В экстрактах спектрофотометрическим методом

определяли содержание суммы растворимых фенольных соединений (с реактивом Фолина-Дениса), 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). В таблицах представлены средние арифметические значения из трех биологических параллельных и их стандартные отклонения.

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".

2.9 Статистическая обработка данных

Исследования проводили в 2 аналитических и 3 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.

ГЛАВА 3

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

3.1 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 (Калашникова, Киракосян, 2016; Калашникова, 2020). Для получения стерильной культуры батата, многие авторы применяют в качестве стерилизующего агента хлорид ртути ($HgCl_2$) в концентрации 0,1% и выдерживают в нем изолированные ткани в течение 15 минут (Shaibu, Abubakar, Lawan Z.M, et al., 2016; Abubakar, Yahaya, Shaibu, et al., 2018;). Однако, следует отметить, что такое воздействие стерилизующего вещества на молодые и активно растущие растительные ткани может стимулировать образование некротических участков и последующую гибель эксплантов. На основании ранее проведенных нами исследований с растениями разных таксономических групп установлено, что наилучшие результаты, по получению стерильных эксплантов, были отмечены при использовании раствора $HgCl_2$ в концентрации 0,1% в течение 5 минут. Поэтому эта методика была применена и на микрочеренках батата, при введении их в культуру *in vitro*.

Экспериментально установлено, что данный режим стерилизации 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 и формирование микропобегов (Рис. 14б). Кроме

того, следует отметить, что при использовании микрочеренков, помимо активации развития пазушных почек и формирования микропобегов, в базальной части эксплантов наблюдали образование корневой системы (Рис. 14б). В случае использования верхушки побегов, рост апикальных меристем не был отмечен (Рис. 14а). Причем эта особенность была нами отмечена в процессе всех циклов культивирования верхушек побегов *in vitro*.



Рис. 14 Морфогенетическая активность первичных эксплантов (сорт Jewel): а – верхушка побега, б – микрочеренок

Отсутствие роста апикальных почек, нами было объяснено после проведения исследований по гистохимическому окрашиванию тканей. В результате исследований установлено, что именно в апикальных почках, а также в листовых зачатках накапливаются в большом количестве фенольные соединения (Рис. 15). При изолировании таких эксплантов, вероятно, фенольные соединения окисляются различными фенолазами, а продукты окисления, как известно, ингибируют деление и рост клеток. Все это ведет к гибели первичного экспланта или к уменьшению способности культивируемых тканей к регенерации.



Рис.15 Накопление фенольных соединений в апикальных почках и листьях батата перед введением в культуру *in vitro*

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

Установленные режимы стерилизации были применены и на всех других изучаемых сортах батата. Показано, что данный протокол стерилизации первичных эксплантов приводил к получению в 100% случаев асептических культур, которые в дальнейшем были использованы в работе.

3.2 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. Культура батата характеризуется своей неприхотливостью к элементам питания (Onwubiko, Ihezue, Mozie, 2015; Adikini, Settumba, Mwanga, et al., 2015). 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.

В результате проведенных исследований было установлено, что минеральный состав питательной среды оказывает существенное влияние на рост пазушных побегов и укоренение микрочеренков. Нами были установлены некоторые закономерности роста и развития микропобегов из

вегетирующих почек. Так, уже на 7 сутки с начала культивирования *in vitro* наблюдали активацию роста существующих меристем, а спустя еще 7 суток – наблюдали образование и корневой системы. К концу первого пассажа формировались побеги высотой до 5-6 см с хорошо развитой корневой системой (Рис. 16).

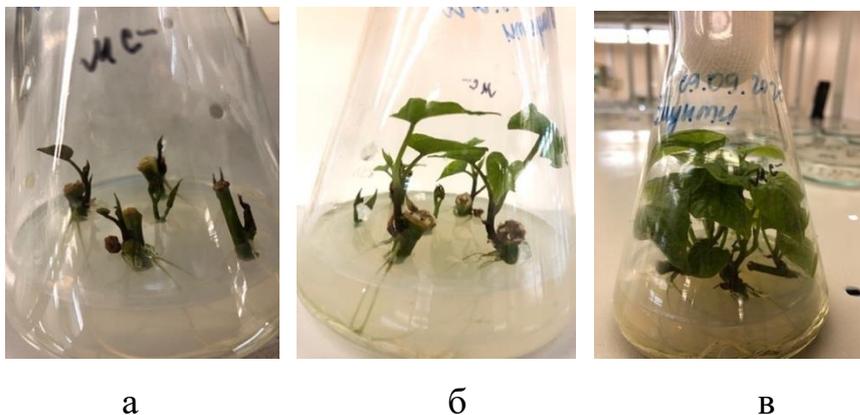


Рис. 16 Батат (сорт Jewel) *in vitro*: а – на 7 сутки, б – на 14 сутки, в – 30 сутки

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 (Рис. 17,18). 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 ($\frac{1}{2}$ нормы МС).

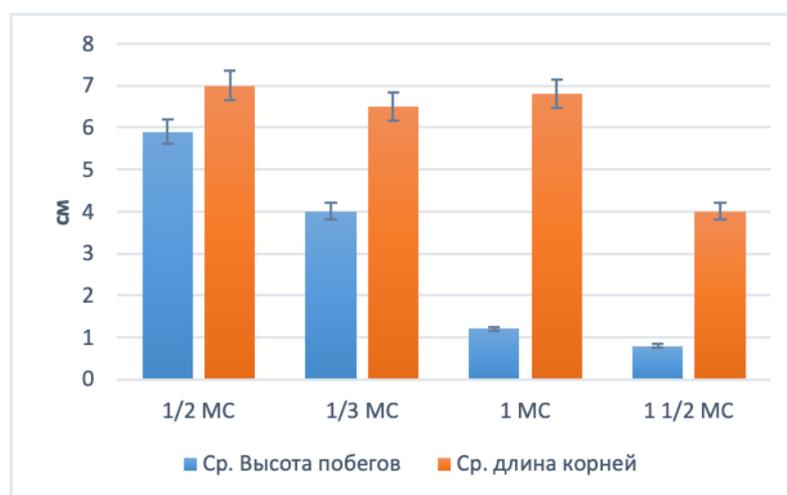


Рис. 17 Влияние минерального состава питательной среды на биометрические показатели адвентивных побегов (сорт Jewel)

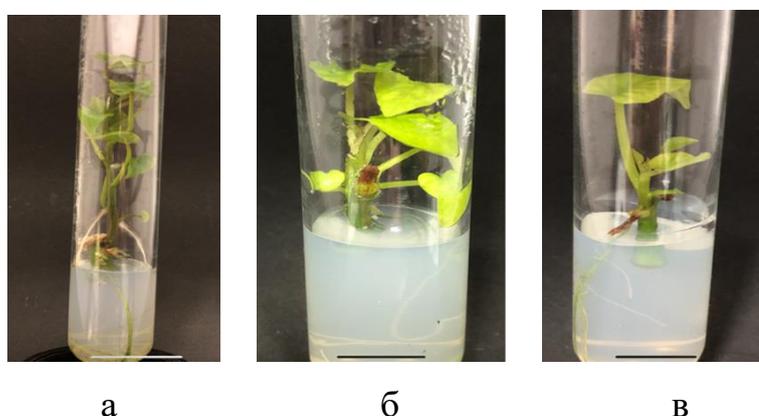


Рис. 18 Растения-регенеранты батата (сорт Jewel): а – $\frac{1}{2}$ MC, б – $\frac{1}{3}$ MC, в – 1 MC

Таким образом, применение $\frac{1}{2}$ нормы минеральных солей по MC приводило к получению быстро растущих пазушных и адвентивных побегов и формированию мощной корневой системы в базальной части микрочеренков. Аналогичные результаты по активации развитию пазушных и адвентивных почек, а также их активному росту были получены и для других исследуемых сортов батата.

Следует отметить, что 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. 19).

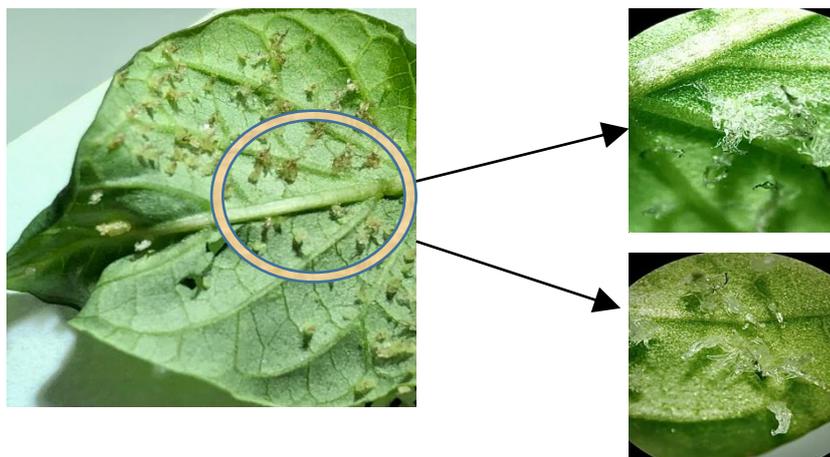


Рис. 19 Секреторные образования (колетеры) на нижней стороне листовой пластинки

Существуют различные разновидности секреторных образований, к которым и относятся колетеры. В них синтезируется клейкое вещество, состоящее, как правило, из слизи и смолы, но может состоять и из более сложного состава (Костина, Муравник, 2017). Колетеры могут образовываться в разных частях растений, например, в пазухе листа, прилистников, по краю листьев или в основании черешков (Gonzalez, Taggô, 2009). Разными авторами показано, что образовавшийся экссудат защищает данный орган (на котором образовались колетеры) от высыхания или защищают растения от перегрева, поэтому в них может накапливаться вода (Miguel et al., 2006; Paiva, 2009; Canaveze, Machado, 2015).

Наши исследования показали, что начало формирования колетер на листовой пластинке начинается в середине пассажа, примерно через 15 суток с начала культивирования. Колетеры образуются по всей нижней площади листа и этот процесс происходит асинхронно. Поэтому под бинокулярной лупой можно одновременно увидеть только что заложившиеся (они имеют светло-зеленую окраску), так и 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. Однако, при последующем культивировании интенсивность образования и число колетер на листьях уменьшалось. Уже на 3 пассаже образование колетер на листьях не было обнаружено ни у одного исследуемого сорта батата.

Подводя результаты исследований следует отметить, что наилучшие условия для клонирования батата является питательная среда, содержащая $\frac{1}{2}$ нормы минеральных солей по МС, которая и была использована в следующих сериях экспериментах.

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

Для размножения микрочеренков, в состав питательной среды $\frac{1}{2}$ МС добавляли цитокинины: 6-бензиламинопурин (БАП) (0,5 - 2 мг/л), кинетин (0,5 - 2 мг/л), препарат Дропп (0,1-1 мг/л). Во всех вариантах питательных сред применяли индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) в концентрации 0,5 мг/л.

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.6).

Таблица 6 - Влияние гормонального состава питательной среды на морфогенетический потенциал микрочеренков батата (сорт Jewel) *in vitro*

Цитокининовый компонент питательной среды мг/л	Учитываемые показатели		
	кол-во эксплантов, способных образовывать пазушные и адвентивные побеги, %	кол-во побегов с одного эксплан-та, шт	выживаемость исследуемых эксплантов <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 (Рис. 20).

Кроме того, были установлены различия по таким показателям, как высота побегов и количество листьев из расчета на один побег. Средние показатели учитываемых факторов в зависимости от применяемых регуляторов роста приведены на рисунках 21, 22.

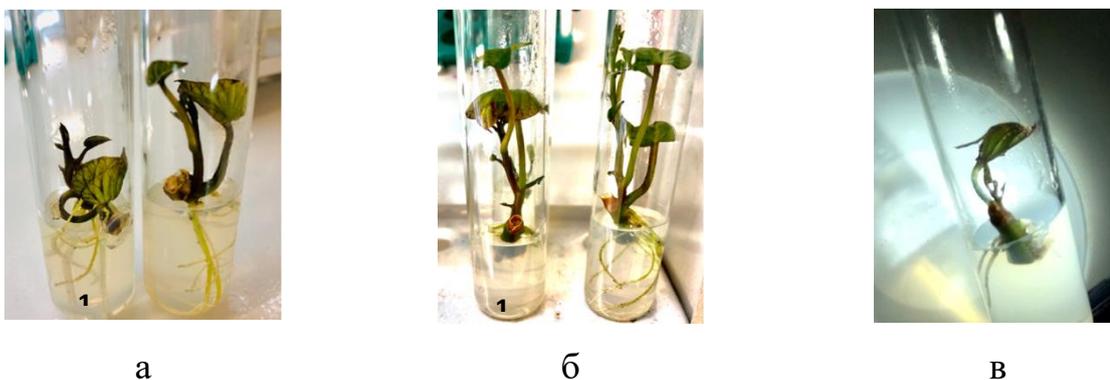


Рис. 20 Влияние цитокининов на морфогенетический потенциал батата (сорт Jewel) *in vitro*: а – питательная среда, содержащая БАП (1 – концентрация 1 мг/л, 2 – концентрация 0,5 мг/л), б – питательная среда, содержащая кинетин (1 – концентрация 1 мг/л, 2 – концентрация 0,5 мг/л), в - питательная среда, содержащая препарат Дропп (концентрация 1 мг/л)

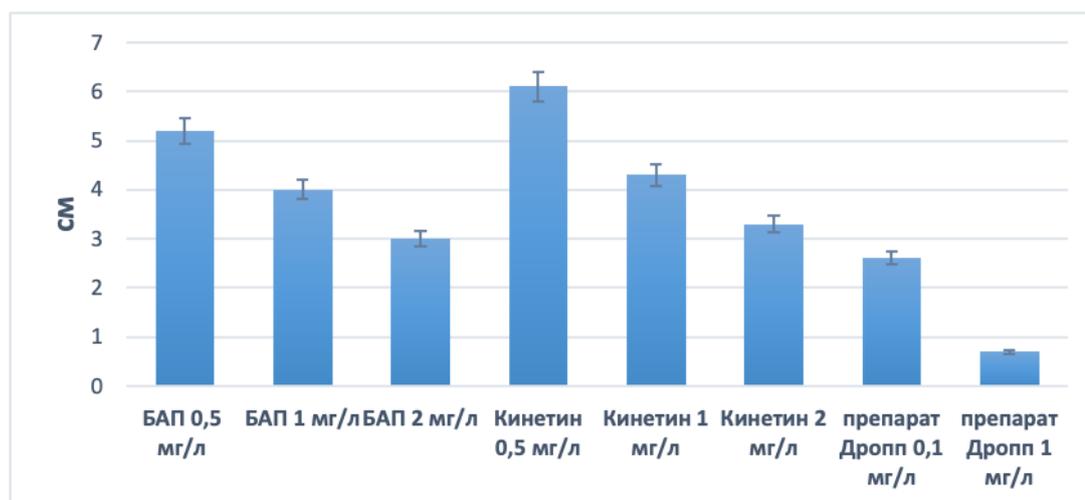


Рис. 21 Влияние гормонального состава питательной среды на высоту пазушных и адвентивных микропобегов (сорт Jewel)

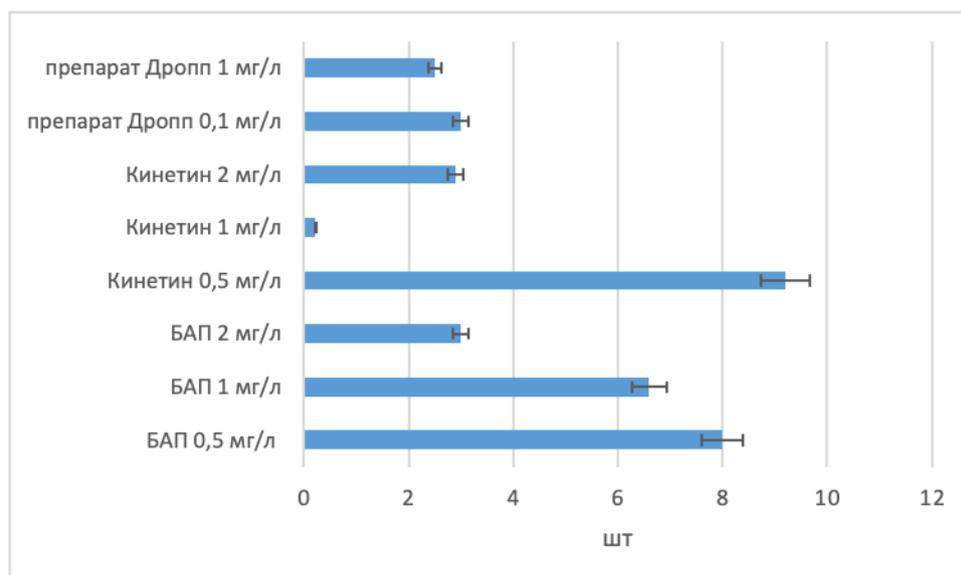


Рис. 22 Влияние гормонального состава питательной среды на среднее количество листьев на одном микропобеге (сорт Jewel)

Полученные результаты показали, что на среде $\frac{1}{2}$ МС, содержащей 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л ИУК, 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 и 0,5 мг/л ИУК: 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. Особенно это четко проявлялось в варианте с применением препарата Дропп в концентрации 1 мг/л. В этом варианте образование микропобегов было сильно замедленно и формировались микропобеги высотой 0,6 см.

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. Так, например, в работах зарубежных авторов сообщалось, что генотип, тип применяемых гормонов и их концентрация в питательной

среде оказывают существенное влияние на скорость размножения, а также на характер роста различных видов растений, включая сладкий картофель (Shaibu, Abubakar, Lawan Z.M, et al., 2016;). Это также подтверждается выводами и других авторов, например, Thorpe et al. (1994), Sihachakr et al. (1997), Gubba A. и Sivparsad (2002) и Gaba, V. P. (2005) сообщили, что именно правильно-подобранная комбинация гормонов также определяет успех клонального микроразмножения батата.

Исходя из выше изложенного, экспериментально установленный наилучший состав питательной среды, был применен и для культивирования микрочеренков других исследуемых сортов батата. Были проведены сравнения действия лучшей среды по гормональному составу (БАП 0,5 мг/л + ИУК 0,5 мг/л или кинетин 0,5 мг/л + ИУК 0,5 мг/л) и не эффективной (Дропп 1 мг/л + ИУК 0,5 мг/л) на биометрические показатели микропобегов. Полученные результаты приведены в таблице 7.

Таблица 7 - Влияние гормонального состава питательной среды ($\frac{1}{2}$ МС) на высоту микропобегов батата (см)

Сорт	$\frac{1}{2}$ МС БАП 0,5 мг/л + ИУК 0,5 мг/л	$\frac{1}{2}$ МС кинетин 0,5 мг/л + ИУК 0,5 мг/л	$\frac{1}{2}$ МС Дропп 1 мг/л + ИУК 0,5 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 наилучшие условия для роста микропобегов и формирования адвентивных побегов была среда МС содержащая $\frac{1}{2}$ концентрации минеральных солей в сочетании в кинетином 0,5 мг/л и ИУК 0,5 мг/л. Применение препарата Дропп оказалось

не эффективно для всех изучаемых генотипов батата. В этом варианте сформировавшиеся микропобеги не превышали 0,9 см. В варианте с БАП учитываемые показатели занимали промежуточное положение.

Сформировавшиеся микропобеги в дальнейшем использовали в исследованиях по изучению влияния светокультуры на рост микрочеренков батата и подбору оптимальных условий для их укоренения.

3.4 Выращивание микрочеренков в условиях светокультуры

Исследования в гроутентах

В гроутентах изучали влияние отношения красного света (R) к дальнему красному свету (FR) на морфометрические показатели микрочеренков батата.

Фитохромы - широко распространенная группа красных/дальне-красных чувствительных фоторецепторов, которые впервые были обнаружены у растений, где они составляют один из трех основных классов регуляторов фотоморфогенеза. Все фитохромы используют ковалентно присоединенные хромофоры билина, которые обеспечивают фотоконверсию между краснопоглощающими (Pr) и дальнепоглощающими (Pfr) формами. Таким образом, фитохромы являются фотопереключаемыми фотосенсорами; канонические фитохромы имеют консервативное N-концевое фотосенсорное ядро и C-концевую регуляторную область, которая обычно включает в себя гистидинкиназный домен. Открытие новых бактериальных и цианобактериальных членов семейства фитохромов в течение последнего десятилетия значительно способствовало биохимической и структурной характеристике этой группы, причем первая кристаллическая структура фотосенсорного ядра бактериофитохрома появилась в 2005 году. Эта структура и другие недавние биохимические исследования позволили по-новому взглянуть на структуру фитохрома, процесс фотоконверсии, который является центральным для восприятия света, и механизм передачи сигнала

этим важным семейством фоторецепторов (Rockwell, Su Yi-Shin, Lagarias, 2006).

Фитохром измеряет отношение красного света (R) к дальнему красному свету (FR), тем самым позволяя растению оценить количество фотосинтетически активного света и вызвать реакцию избегания тени (Sage 1992).

Излучение в области FR очень плохо поглощается, и, следовательно, свет, который проходит через растительные объекты или отражается от них, обеднен R и значительно обогащен длинами волн FR. Таким образом, полезным параметром, для описания естественного освещения, является отношение фотонной освещенности в R к таковой в FR (соотношение R:FR). Этот параметр часто напрямую определяется следующим соотношением (Bot, 2005):

$$R : FR \text{ ratio} = \frac{\text{photon irradiance between 655 and 665 nm}}{\text{photon irradiance between 725 and 735 nm}}$$

Микрочеренки батата выращивали на двух вариантах питательной среды: содержащие ½ минеральных солей по МС и не содержащие никаких 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. Контейнеры с эксплантами помещали в гроутенты, в которых соотношение красного (R) и дальнекрасного (FR) находились в разных соотношениях. В качестве контроля использовали световую комнату, где было освещение белыми люминесцентными лампами. Основные биометрические показатели микрорастений по вариантам приведены в таблице 8 и 9 и на рисунке 23.

Таблица 8 - 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 9 - 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

Люминесцентные лампы (контроль)



вода



МС

$R < FR$



вода



МС

$R = FR$



вода



МС

$R > FR$



вода



МС

Рис. 23 Микрорастения батата по вариантам освещения

Из полученных результатов следует, что изученные режимы выращивания и состав питательной среды оказывают не однозначное влияние на морфометрические показатели микрорастений батата. Так, в условиях ограниченного питания 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 питательной

среды с $\frac{1}{2}$ минеральными солями по МС. Однако следует отметить, что режимы освещения (соотношение R и FR) оказали существенное стимулирующее влияние как на рост корней, так и на рост побегов, независимо от состава среды. Причем яркие отличия были получены по показателям, связанных с корнями. Во всех вариантах освещения и питательных сред средняя длина корневой системы и среднее количество корней превышало контрольный вариант в среднем на 155-200% и 250% соответственно. Что касается длины побегов, то в варианте культивирования микропобегов на среде МС длина стебля превышала контроль в 2,5-3 раза, 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 гроутентов, привело к увеличению площади листа по сравнению с контрольным вариантом примерно в 2 раза, то время как в варианте использования 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. Например, фиолетовые и синие спектры

увеличивают процесс фотосинтеза, что приводит к быстрому образованию более мощных растений (Тихомиров, Лисовский, Сидько, 1991). От интенсивности красного и синего спектра света, а также их соотношения зависит фотоморфогенез растений. Экспериментально установлено, что спектр красного света довольно широк и разные его участки отвечают за регуляцию разных физиологических процессов, что в свою очередь не может не сказаться на продукционном процессе в целом (Тараканов, Яковлева, 2012). Кроме того, от красного света зависит синтез ауксинов, которые отвечают в интактном растении за дифференциацию корней. В то же время, синий спектр отвечает за дифференциацию почек и образование надземной биомассы, а зеленый спектр - приводит к повышению эффективности действия различных спектров на морфофизиологические процессы исследуемых объектов (Kim, Hahn, Neo, Paek, 2004; Kim, Goi, Wheeler, Sager, 2004). В связи с тем, что в растениях батата данные исследования ранее не проводились, то работы в этом направлении представляют интерес, а полученные результаты имеют как практическое, так и теоретическое значение.

Исходя из вышеизложенного необходимо было изучить влияние спектрального состава света (красного и синего спектра) на морфогенетический потенциал культивируемых *in vitro* микрочеренков батата разных сортов. Основные результаты исследований приведены в таблице 10.

Таблица 10 - 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

Исследования показали, что добавление в нормальное освещение дополнительно красного и синего спектра в разных соотношениях не приводило к повышению морфогенетического потенциала культивируемых эксплантов. Как правило, удельная скорость роста (μ) основного побега из пазушных почек была примерно в 2 раза меньше, чем в контрольном варианте, что наглядно видно на рисунке 24.



а б

Рис. 24 Растения батата (сорт Порто Рико): а - в условиях светокультуры (К 70%:С 30%); б – контрольный вариант

Следует отметить, что для сорта Пурпл во всех вариантах освещения, как на внешней, так и на внутренней стороне листовой пластинки наблюдали массовое образование колетер (Рис. 25а), 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 антоциановых корней (Рис. 25б). В контрольном варианте формировалась мощная корневая системы без антоциановой окраски (Рис. 25в).

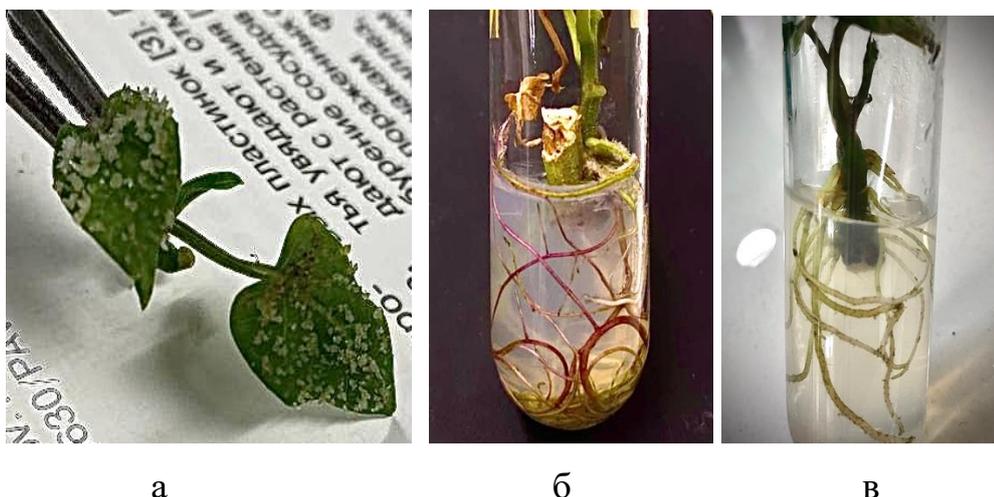


Рис. 25 Образование *in vitro* колетер на листьях (а) и антоциановых корней в вариантах освещения К 70%:С 30% (б) (сорт Пурпл) и в контрольном варианте (в)

3.5 Влияние ауксинов на укоренение микрочеренков батата *in vitro*

Исследования показали, что на этапе микроразмножения можно было наблюдать спонтанное образование корней в базальной части микропобегов. Вероятно, дифференциация корней происходила за счет присутствия в составе питательной среды помимо цитокинина БАП или кинетина, еще и ауксин ИУК. Однако, сформировавшиеся корни характеризовались медленным ростом и, как правило, образование корней второго и третьего порядка не происходило. Поэтому на третьем этапе клонального микроразмножения необходимо было установить оптимальные условия, обеспечивающие высокую эффективность укоренения микропобегов батата исследуемых сортов.

Для укоренения микропобегов в состав питательной среды, содержащей $\frac{1}{2}$ нормы минеральных солей по прописи МС добавляли ауксины: индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) и индолил-маслянную кислоту (ИМК) в концентрациях 0,5 и 1 мг/л.

Исследования показали, что не зависимо от применяемого ауксина (0,5 мг/л) в базальной части микропобегов сначала формировалась каллусная ткань, светло-желтого цвета, плотной консистенции (Рис. 26а) и только в

12%-ых случаев наблюдали образование корневой системы непосредственно из базальной части микропобегов. Следует отметить, что 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. 26б). Причем 100% укоренение микропобегов было отмечено во всех вариантах и для всех изучаемых сортов батата.

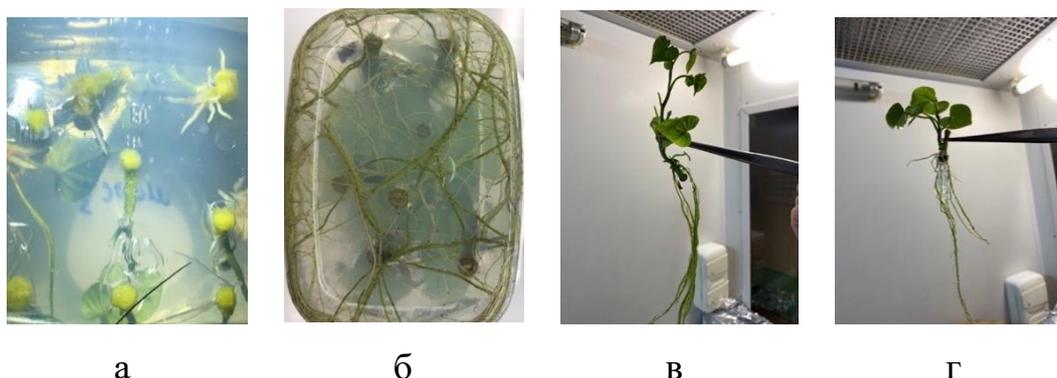


Рис. 26 Формирование каллусной ткани в базальной части микропобегов батата (а), образование корневой системы (б), на питательной среде, содержащей ИМК (в), ИУК (г)

Отличия были отмечены по таким показателям, как индекс роста корней (I) и удельная скорость роста корней (μ). Установлено, что I и μ зависили от применяемого ауксина (Табл. 11).

Таблица 11 - 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 баттераба	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 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 корней. На среде с ИМК μ был 0,1-0,3, а на среде с ИУК - 0,1-0,2. Причем, учитываемые показатели зависели не только от исследуемого ауксина, но и от сортовых особенностей батата.

Так, к концу пассажа (45 суток) самые длинные корни (18-20 см) формировались на среде с ИМК у микропобегов батата сортов Джewel, Винницкий розовый, Пурпл и Тайнунг, а самые маленькие (8,3 см) - у микропобегов батата сорта Американский бежевый. На среде с применением ИУК, самые длинные корни (14-15 см) так же формировались у микропобегов батата сортов Джewel, Винницкий розовый, Пурпл и Тайнунг, а самые маленькие (6,8 см) - у микропобегов батата сортов Американский бежевый, Порто Рико и Рубин кародины.

Таким образом, для успешного укоренения микропобегов и получения высококачественного посадочного материала целесообразно на третьем этапе клонального микроразмножения использовать питательную среду, содержащую $\frac{1}{2}$ минеральных солей по прописи МС в сочетании с ИМК 0,5 мг/л.

Укорененные растения-регенеранты, в дальнейшем были перенесены в нестерильные условия выращивания для установления оптимальных режимов их адаптации *ex vitro*.

3.6 Адаптация микроклонов батата к условиям *ex vitro*

Успех клонального микроразмножения зависит, прежде всего, от правильного подбора условий адаптации полученных микроклонов. На этом этапе необходимо создавать условия, обеспечивающие быстрый рост как корней, так и надземной части растений, а также восстановлению функции

устычного аппарата – регулирование транспирации (Бутенко, 1999; Namanda, Gibson, Kirimi, 2011; Ogero, Gitonga, Mwangi, Ombori, Ngugi, 2011). Решение задачи взаимодействия клонального микроразмножения в условиях *in vitro* и условий адаптации микрорастений в условиях *ex vitro* позволит достигнуть синергетического эффекта, выраженного в получении посадочного материала высокого качества с наименьшими экономическими и временными затратами.

В работе было апробировано два способа адаптации микроклонов – на аэропонной установке и непосредственно в почве.

Наши 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 (Рис. 27). 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.



Рис. 27 Корневая система микроклонов батата на аэропонной установке

Что касается адаптации в почвенных условиях, то число адаптированных растений не превышало 85%. Причем, рост надземной части был замедлен и формирование побегов высотой 5-7 см было отмечено только на 14 сутки с начала адаптации (Рис. 28).



а

б

Рис. 28 Микроклоны батата в почвенной культуре: а – в момент посадки, б – через 14 суток с начала адаптации

Таким образом, применение аэропонной установки на последнем этапе клонального микроразмножения позволяет снизить процент гибели растений, активизировать рост и развитие зеленой биомассы, а также корневой системы, что является необходимым условием для последующего хорошего роста растений в условиях открытого грунта.

В дальнейшем адаптированные микроклоны были перенесены на поля института фитопатологии РАН (Московская область, Голицино). При посадке корневая система микроклонов не заглублялась. Посадку осуществляли в грядки, которые в течение первых 3 недель укрывали пленкой. 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 (Рис. 29).



Рис. 29 Микроклоны батата в условиях открытого грунта

Осенью, за 2 недели до сбора урожая полив прекращали. Сбор батата происходил вручную. Клубни поддевали, встряхивали от грунта. Одновременно срезались плети. Очищенные клубнеплоды помещали в лотки и отправляли на хранение.

Форма клубнеплодов в зависимости от сорта была округлой, конусообразной, ветеренообразной. Кожица тонкая, поверхность гладкая, без ярко выраженных глазков. Цвет кожицы светло розовый или розовый, в зависимости от сорта (Рис. 30).



Рис. 30 Клубнеплоды батата: а – сорт Винницкий розовый ; б – сорт сорт Тайнунг

Таким образом, впервые для батата (*Ipomoea batatas* (L.)), проведены многоплановые исследования *in vitro* и предложена технология быстрого размножения и получения высококачественного посадочного материала. Использование микрочеренков, изолированных с проросших клубнеплодов, является эффективным первичным эксплантом при клонировании *Ipomoea batatas* (L.) *in vitro*. Целесообразно на первом этапе клонального микроразмножения изолированные экспланты культивировать на питательной среде МС, содержащей $\frac{1}{2}$ нормы минеральных солей. Добавление в состав среды БАП или кинетин в концентрации 0,5 мг/л способствует образованию дополнительных микропобегов, для которых характерен высокий коэффициент размножения – до 9. Установлено, что существенный стимулирующий эффект роста корней был получен при дополнении питательной среды ИМК в концентрации 0,5 мг/л. Кроме того, культивирование микрочеренков при использовании красного и дальнего красного спектра света в разных соотношениях, приводит к повышению морфогенетического потенциала экплантов. В этих условиях освещения усиливается рост корней и надземной части микроклонов. Показано, что применение аэропонной установки на последнем этапе клонального микроразмножения, позволяет проводить быструю адаптацию растений в условиях *ex vitro*, а также способствует активному росту как надземной, так и корневой системы клонированных растений. Проведенные исследования являются начальным этапом в работах по клеточной селекции *Ipomoea batatas* (L.) на устойчивость к низким положительным температурам.

ГЛАВА 4

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ И ПРОВЕДЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ *IPOMOEA 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 температура 14°C, при которой приостанавливаются все ростовые процессы, прежде всего, рост надземной части растений, а при температуре 10°C полностью останавливается обмен веществ, что делает не целесообразным его дальнейшее выращивание в почве, так как надземная биомасса погибает (<https://www.batatchudo.com/services>).

Поэтому стоит задача получения толерантных к низким положительным температурам новых форм, гибридов и сортов батата. Ускорить процесс выведения толерантных генотипов можно посредством применения биотехнологических методов, в частности, тканевой и клеточной селекции *in vitro* (Бутенко, 1999; Калашникова, 2020). Суть метода состоит в отборе на селективных средах тканей, резистентных к факторам абиотической или биотической природы, с последующей регенерацией из них растений-регенерантов и тестирование их на наличие признака толерантности. Получение устойчивых к неблагоприятным факторам окружающей среды сортов методом клеточной или тканевой селекции возможно в том случае, когда резистентность определяется на клеточном уровне (Носов, 2005). Таким путём проводят отбор на соле-, жаро-, засухо- и холодоустойчивость, а также к солям тяжёлых металлов, пестицидам, антибиотикам и т.д. (Шамина, 1988; Кирьян, 1991; Долгих, 1994; Долгих, Ларина, Шамина. и др, 1994; Джос, Калашникова, 1997; Захарчук, Зайченко, Олейник и др, 1997; Behnke, 1979; Frame, Kung-fu, Christie, Pauls, 1991;

Соловых, 2015; Соловых 2016; Соловых, 2020). 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.

4.1 Получение каллусной ткани

4.1.1 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).

Экспланты культивировали на питательных средах, содержащих минеральный состав по прописи МС, БАП 1 мг/л, а также различные ауксины ИУК, НУК, 2,4-Д в концентрации 0,5 мг/л. Концентрации были выбраны на основании литературных данных.

В результате проведенных исследований нами 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 (Рис. 31); 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. Исключение составил сорт Пурпл, для которого было характерно появление слабо выраженной антоциановой окраски каллуса.

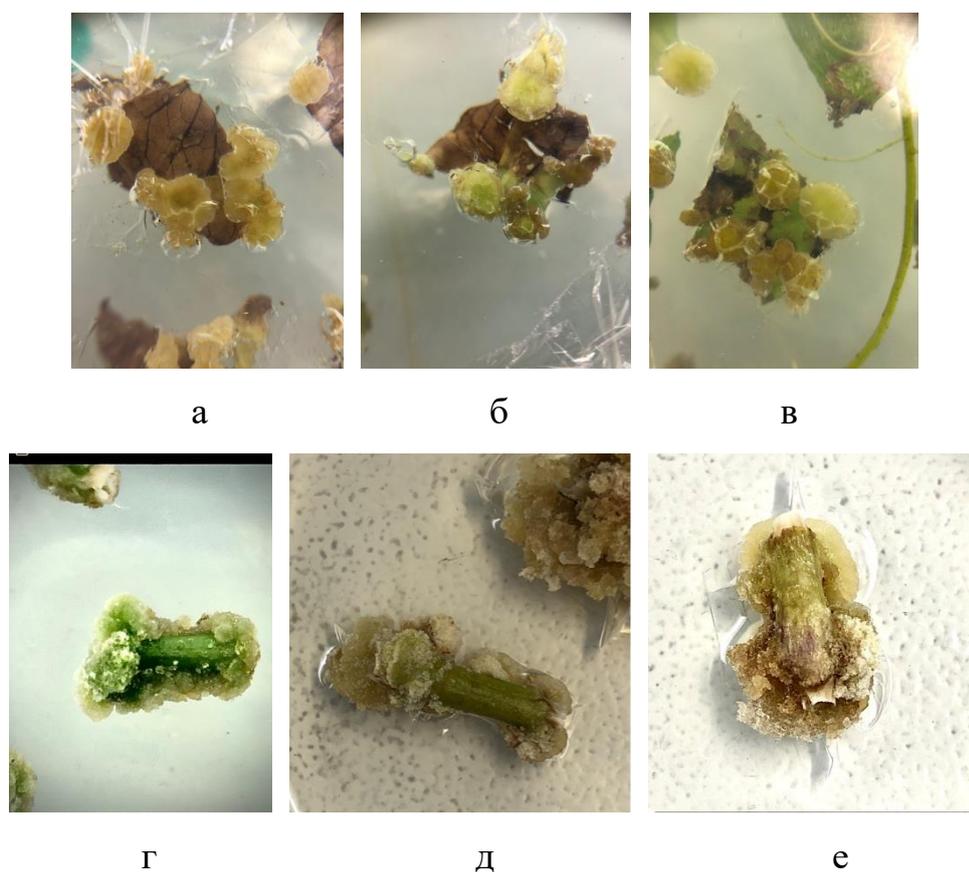


Рис. 31 Образование первичной каллусной ткани в местах поранения:
а, б, в – лист, г, д, е – стебель
(а, д – сорт Jewel, в, г – сорт Порто Рико; б, е – сорт Пурпл)

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. Как правило, они преимущественно располагаются в покровных и проводящих тканях, а также наблюдается незначительное их присутствие в паренхимных клетках (Рис. 32). Кроме того, локализация полифенолов наблюдалась в клеточных стенках, межклетниках и в специализированных фенол запасующих эпибластах, в виде аморфного вещества или гранулированных включений различной степени агрегации.



а

б

Рис. 32 Локализация фенольных соединений в меристематических тканях (а) и проводящих тканях листовой пластинки (б)

Реакция с ванилиновым реактивом на флаваны в исследуемых эксплантах носит тождественный характер с реакцией клеток на реактив Fast Blue на суммарное содержание растворимых фенольных соединений. Это может свидетельствовать о том, что в фенольном комплексе экспланта доминируют соединения флавоноидного ряда. Несмотря на то, что образование полифенолов присуще всем органам и тканям растений, но они могут иметь различный состав, концентрацию и локализацию, обусловленную физиологическими функциями и морфологическими особенностями первичных эксплантов.

Таким образом, сопоставление полученных данных привело к заключению, 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 (Рис. 33а). Причем начало каллусогенеза было отмечено уже на 12 сутки с начала культивирования. При использовании ИУК каллусная ткань имела рыхлую консистенцию и была светло-желтого цвета (Рис. 33б). В этом варианте начало каллусогенеза отмечено на 15-17 сутки. Изучение каллусной ткани на временных препаратах позволило установить, что ткань состоит из одинаковых паренхимных клеток округлой формы, в которых не было заметно никаких включений (Рис. 34а).

Иная картина наблюдалась при культивировании эксплантов на среде, содержащей 2,4-Д. Несмотря на то, что процесс образования каллусной ткани отмечен уже на 12 сутки, каллусная ткань имела рыхлую консистенцию, была светло-коричневого цвета с белыми новообразованиями каллусной ткани (Рис. 33в). Изучение каллусной ткани на временных препаратах позволило установить, что ткань, полученная на питательной среде с 2,4-Д, состоит из гетерогенных по форме паренхимных клеток (Рис. 34б). Отмечено формирование клеток округлой и вытянутой формы, в которых обнаружено появление включений. Однако в процессе культивирования такая каллусная ткань постепенно погибала. Поэтому добавление в состав питательной среды 2,4-Д оказалось не целесообразным и в дальнейших экспериментах данный гормон не использовали.

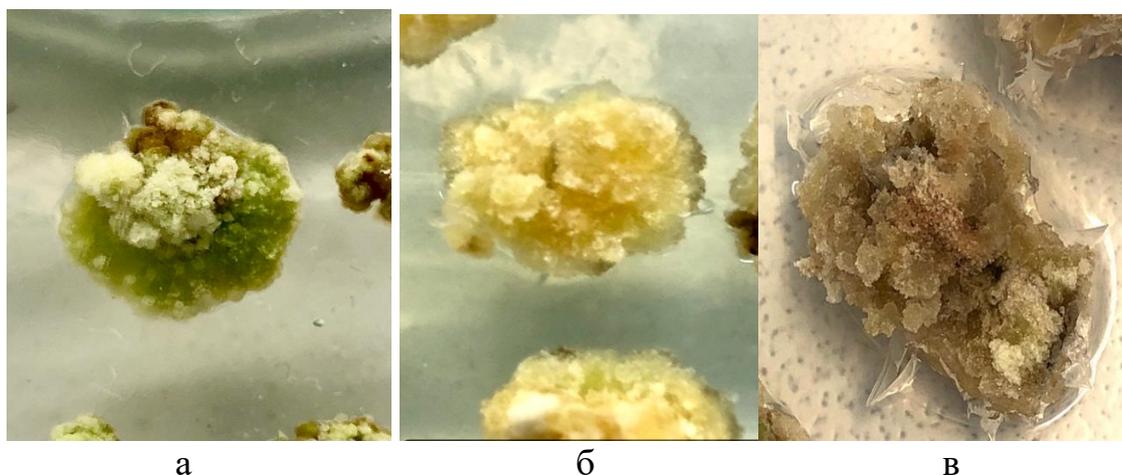


Рис. 33 Формирование каллусной ткани на питательных средах с разным содержанием ауксинов: а – ИУК, б – ИУК, в – 2,4-Д

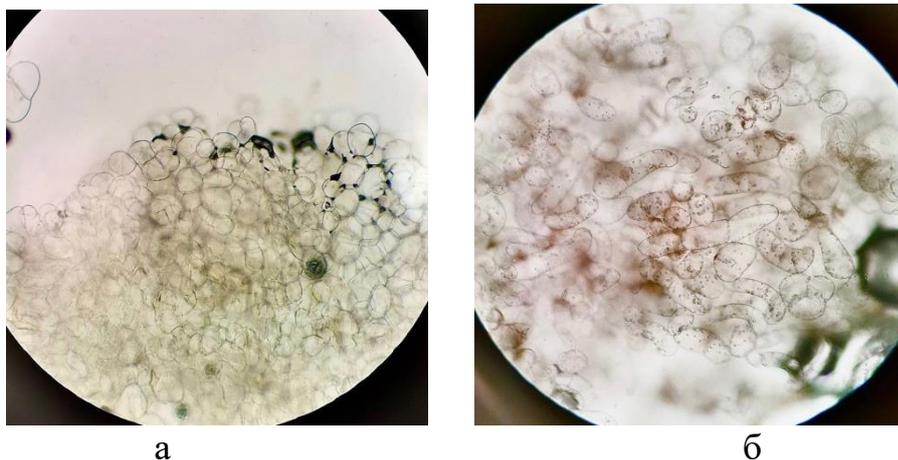


Рис. 34 Клетки каллусной ткани, полученной на питательной среде с НУК (а) и 2,4-Д (б)

Следует отметить, для всех трех изучаемых сортов батата было характерно формирование клеток округлой формы под действием НУК и вытянутых клеток – 2,4-Д. Кроме того, 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 приобретала плотную консистенцию, зеленела на свету и можно было наблюдать массовое образование корней (ризогенез) (Рис. 35). Получение такой ризогенной каллусной ткани не позволяет нам использовать ее в дальнейших экспериментах по клеточной селекции.



Рис. 35 Образование корней из каллусной ткани, культивируемой на среде МС с БАП 1 мг/л и ИУК 0,5 мг/л

Для характеристики каллусной ткани, полученной на питательной среде МС, содержащей НУК использовали такие показатели, как прирост каллусной ткани по диаметру (см), индекс роста (I) и удельная скорость роста (μ). Результаты приведены в таблице 13.

Таблица 13 – Характеристика каллусной ткани, полученной на питательной среде МС, содержащей НУК

Показатели	Листовой каллус		Стеблевой каллус	
	Порто Рико	Пурпл	Порто Рико	Пурпл
Прирост по диаметру (см)	1,25	1,0	1,85	1,15
Индекс роста (I)	2,13	1,50	3,88	1,63
Удельная скорость роста (μ)	0,037	0,030	0,055	0,031

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что каллусогенез зависит не только от применяемого ауксина, но и от типа первичного экспланта, а также от исследуемого сорта. На примере двух сортов – Порто Рико (белый) и Пурпл (фиолетовый) экспериментально установлено, что сорт с повышенным содержанием антоцианов в клубнеплоде и других частях растения обладает меньшей способностью к каллусогенезу независимо от исследуемого первичного экспланта. Так, для сорта Пурпл (фиолетовый) прирост листового каллуса был на 20%, а стеблевого каллуса – на 38% меньше по сравнению с сортом Порто Рико (белый). Аналогичная закономерность была получена и при расчете индекса роста и удельной скорости роста каллусной ткани. Индекс роста листового и стеблевого каллуса для сорта Пурпл был ниже данных показателей сорта Порто Рико на 30% и 60%, соответственно, а удельная скорость роста – на 19% и 44%, соответственно.

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что только НУК способна индуцировать образование каллусной ткани,

сохраняющей высокую пролиферативную активность на протяжении длительного культивирования. Применение ИУК и 2,4-Д в исследованиях по каллусогенезу для батата не целесообразно.

4.1.2 Локализация фенольных соединений в каллусной ткани

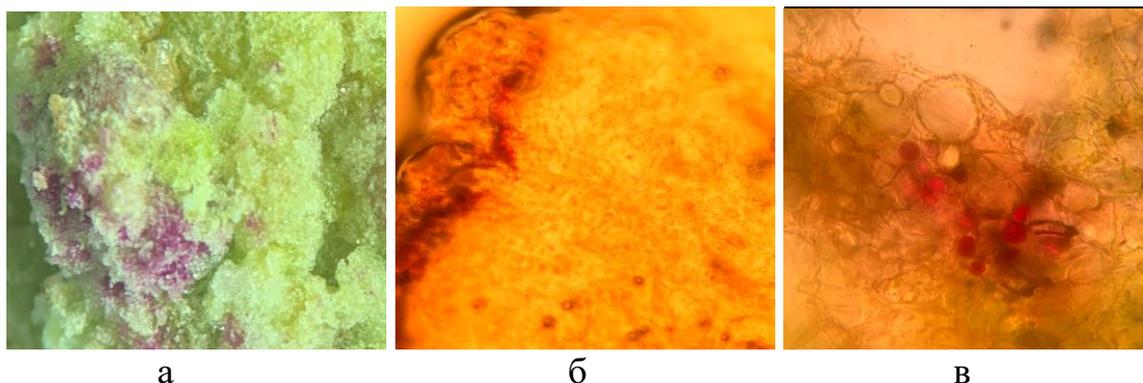
В дальнейших исследованиях представлялся интерес изучения особенностей образования и локализации полифенолов - активных метаболитов, которые являются неотъемлемой частью изучения физиолого-биохимического статуса растений, в каллусных культурах, полученных под действием разных ауксинов. Биосинтез и накопление вторичных соединений, в том числе и фенольной природы, отличается пластичностью и зависит от видовой принадлежности растений, исследуемого органа, стадии онтогенеза и условий произрастания (Запрометов, 1996).

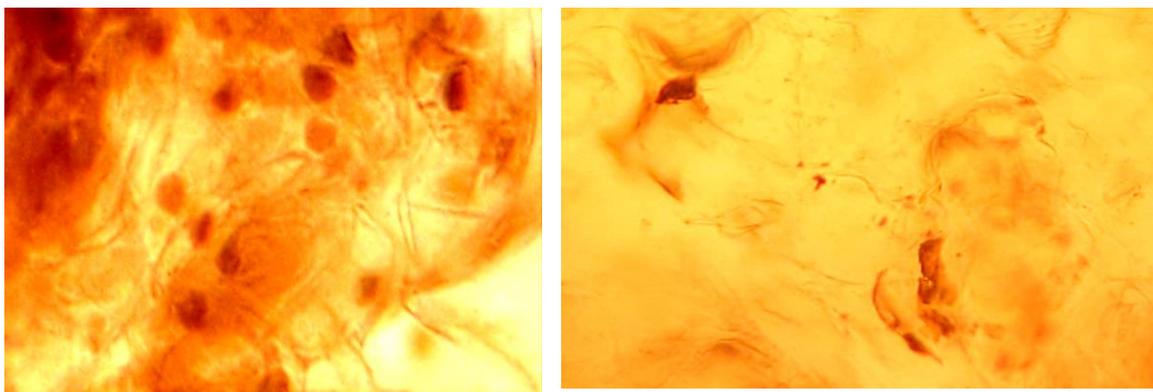
Каллусные культуры инициированные из одного и того же вида растений могут обладать различной способностью к накоплению полифенолов, что отражается и на их внутритканевой локализации. Наши исследования показали, что уже на начальных этапах культивирования каллусные ткани *I. batatas* отличались между собой по биосинтетической активности, что подтвердилось гистохимическими исследованиями. Так, на границе инициации каллусной ткани на первичном экспланте формировался «отделяющий» защитный слой клеток с фенольными соединениями (Рис 7б,д). Уже на первых пассажах отмечалось массовое образование специализированных фенол-запасающих клеток (эпибластов), в которых накапливались фенольные соединения в виде мелко- и крупногранулированных включений. Большие скопления эпибластов наблюдали, как в центральной, так и в периферической части каллусной ткани.

В следующей серии экспериментов необходимо было изучить зависимость образования и локализации фенольных соединений в каллусной ткани от применяемых ауксинов.

В научной литературе неоднократно сообщалось, что происхождение экспланта и гормональный состав питательной среды оказывает значимое влияние на биосинтетическую способность каллусных культур синтезировать полифенолы (Тулупова, Остроженкова, Слепян и др, 2002; Калашникова, Зайцева, Доан Тху Тхуи, Киракосян, 2020). В виду того, что ткани первичного экспланта содержат сильно дифференцированные зоны по степени накопления фенольных соединений, было целесообразно не только оценить успешность процесса каллусогенеза в зависимости от степени накопления ФС в первичном экспланте, но и локализацию фенольных соединений в иницируемой каллусной ткани в зависимости от применяемых ауксинов.

У неморфогенной каллусной ткани, полученной на среде с НУК 0,5 мг/л в сочетании с БАП 1 мг/л (сорт Пурпл) на начальных этапах каллусогенеза отмечалось образование фенолнакапливающих зон, отделяющих эксплант от дедифференцированных клеток. Среди каллусной массы изредка встречались значительно уступающие по размерам клетки с флаванами (реакция с ванилиновым реактивом), которые имели тенденцию к конгломерации. Полифенолы, в том числе и флавановой природы полностью заполняли содержимое указанных клеток, которые представляли собой мини-эпибласты (Рис 36в). По мере пассирования каллусной ткани полифенолы локализовались в вакуолях некоторых клеток в виде аморфного вещества и мелкогранулированных включений (Рис. 36г).





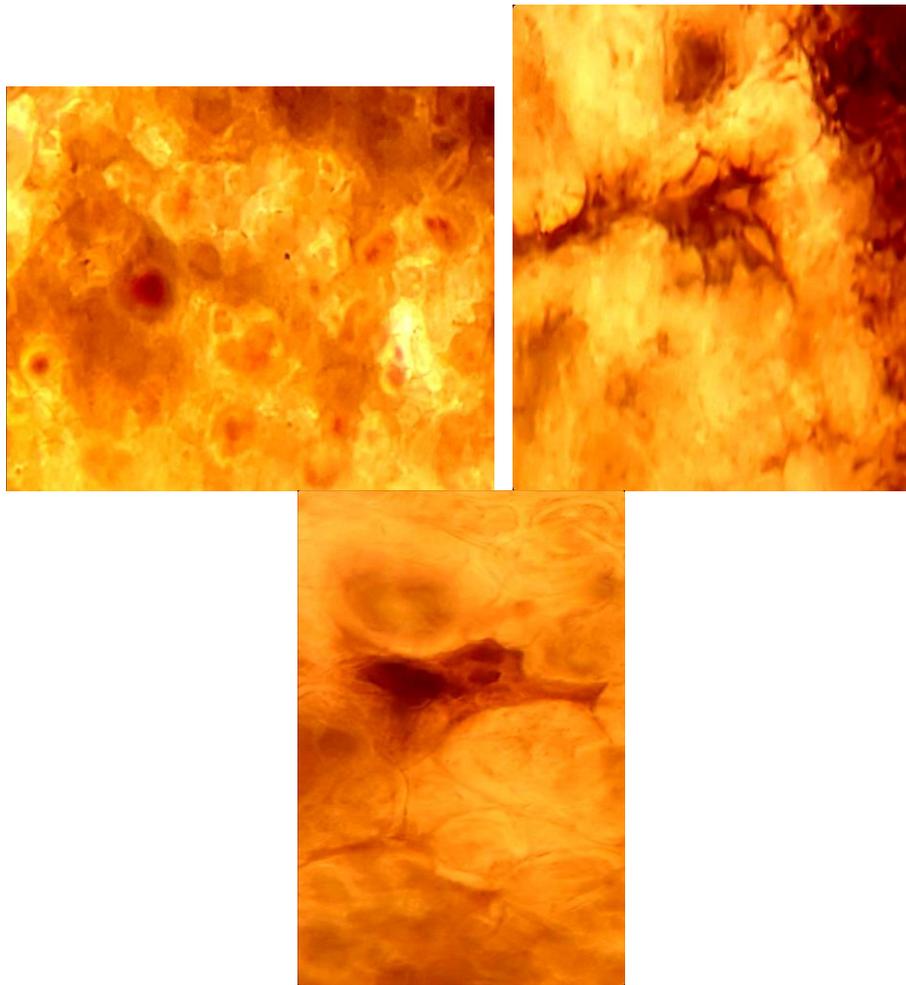
Г

Д

Рис. 36 Каллусная ткань, полученная на среде с НУК (а) (с орт Пурпл), б – локализация полифенолов при инициации первичного каллуса на экспланте, в – локализация флаванов в каллусной ткани, г, д - реакция на суммарное содержание фенольных соединений с реактивом Fast blue

В результате гистохимических исследований установлено, что в каллусных культурах, инициированных из листовых пластинок и выращиваемых на питательной среде с НУК, содержание клеток с фенольными соединениями было меньше, чем у каллуса полученного так же из листовых пластинок, но на среде с 2,4-Д. Это, вероятно, и привело к быстрой гибели ткани, инициируемой на среде с 2,4-Д. Эта закономерность была характерна для трех изучаемых сортов батата.

При выращивании каллусных культур на питательной среде содержащей 2,4-Д было характерно наличие большого числа фенолнакапливающих клеток (эпибластов), которые локализовались среди дедифференцированных клеток не только единично, но и в виде групп, иногда значительно превышая их по своим размерам (Рис. 37а,б). В эпибластах полифенолы находились в виде мелко и крупногранулированных включений. Яркая реакция на флаваны отмечалась в цитоплазме дедифференцированных клеток и межклетниках.



а

б

в

Рис. 37 Локализация фенольных соединений в каллусной ткани культивируемой на среде, содержащей 2,4-Д в эпибластах (а, б) и межклетниках (б, в)

Как было отмечено выше, в процессе культивирования каллусной ткани, полученной на среде с 2,4-Д, отмечалось появление некротических участков, которые привели к полной гибели ткани. Для не жизнеспособной каллусной ткани, находящейся на терминальной фазе субкультивирования, характерно повсеместное присутствие полифенолов. Они присутствовали в клеточных стенках, межклетниках и эпибластах, как в виде аморфного вещества, так и в виде включений различной степени агрегации. В толще каллусной ткани хаотично встречались зоны с многочисленным скоплением мелких эпибластов, полость которых была заполнена фенольными соединениями (Рис. 38б,в). Реакция на суммарное содержание растворимых фенольных соединений была тождественна реакции с ванилиновым

реактивом на флаваны, что указывает на преобладание низкомолекулярных веществ флаванового ряда у данной линии каллусной культуры. Таким образом, это еще раз свидетельствует о том, что гипераккумуляция полифенолов в каллусной ткани может являться косвенной причиной апатоза каллусной культуры (Дубравина, Зайцева., Загоскина, 2005).

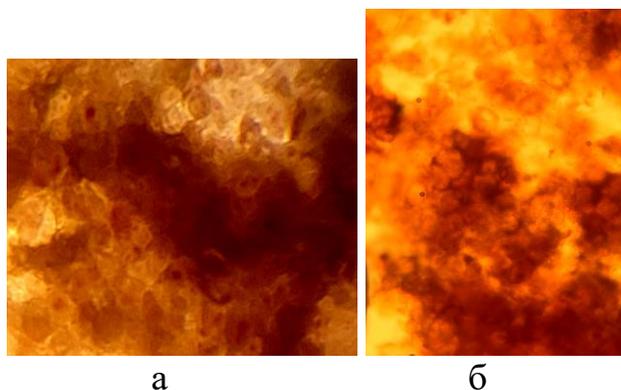


Рис. 38 Локализация фенольных соединений в нежизнеспособной каллусной ткани (а,б), полученной на среде, содержащей 2,4-Д

Следует отметить, что у ризогенной каллусной ткани реакция на фенольные соединения в меристематических очагах не была единична и коррелировала с реакцией клеток на ванилиновый реактив, свидетельствующая о присутствии флаванов. Клетки с фенольными соединениями в виде небольших очагов встречались в центральной и периферийной зонах каллусной ткани (Рис. 39б). При этом реакция на суммарное содержание фенольных соединений наблюдалась в клеточных стенках, цитоплазме и в вакуолях клеток-вместилищ, где они находились в виде мелкогранулированного материала, а реакция с ванилиновым реактивом (на флаваны) – преимущественно в клеточных стенках (Рис. 39г) и крайне редко в цитоплазме некоторых клеток.

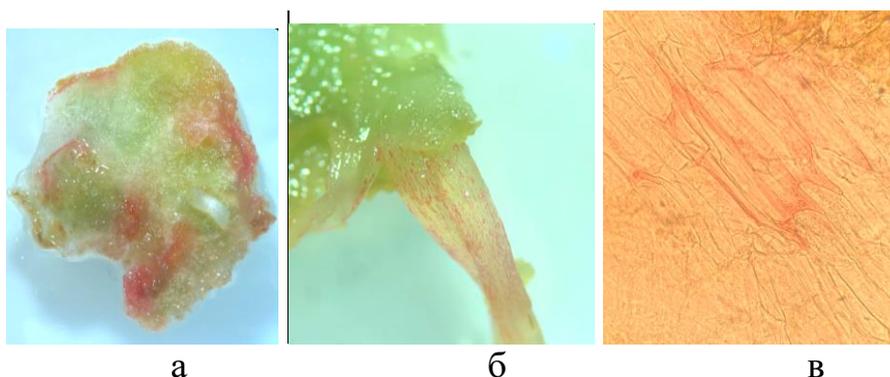


Рис. 39 Каллусная ткань, полученная на среде с ИУК, реакция с ванилиновым реактивом на наличие флаванов в каллусной ткани (а), локализация флаванов в зоне ризогенеза каллусной ткани (б), локализация флаванов в клеточных стенках микро корней (в)

Полученные результаты еще раз свидетельствует о том, что исследуемые растения, активно синтезируют соединения фенольной природы, которые принимают участие в процессах фотосинтеза, дыхания, трансдукции энергии, аллелопатии, а также защиты клеток от патогенов и разных стрессовых факторов (Запрометов, 1996).

В условиях *in vitro* не только сохраняется способность клеток к синтезу фенольных соединений, но и значительно изменяется под влиянием гормонального состава питательной среды, что подтверждается данными гистохимических исследований. Поскольку в условиях *in vitro* сохраняется присущая интактным растениям *I. batatas* (L.) биосинтетическая способность к образованию различных классов полифенолов, но в менее выраженной степени, можно судить об определенной конститутивной составляющей фенольного метаболизма исследуемых растений. Возможно, это связано с тем, что синтез многих вторичных соединений приурочен к специализированным дифференцированным тканям, в то время как каллусные культуры – это неорганизованные, дедифференцированные клетки. Такое изменение внутренней организации тканей в условиях *in vitro* и влияет на образование вторичных соединений, проявляя при этом сорто- и органоспецифические особенности в локализации полифенолов. Сохранение высокой биосинтетической способности каллусными тканями исследуемых сортов *I. batatas* (L.) в условиях *in vitro*, позволяет судить о том, что они могут служить источником специфических биологически активных веществ.

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что растения батата обладают способностью к синтезу полифенолов, в том числе и флаванового ряда, которая сохраняется в условиях *in vitro*. Значительное накопление фенольных соединений тканями интактных

растений не только препятствует процессу каллусообразования, но и может стать косвенной причиной апоптоза каллусных культур. Гормональный состав питательных сред оказывает непосредственное влияние на ростовые характеристики каллусной ткани *in vitro*, а также на ее биосинтетический потенциал.

4.2 Регенерация растений из каллусной ткани

Важным этапом исследований в работе по разработке технологии клеточной селекции *in vitro* является подбор оптимальных условий культивирования, обеспечивающих регенерацию растений из полученных устойчивых клеточных культур. Несмотря на большое количество исследований по регенерации побегов из соматических дедифференцированных клеток, в настоящее время не существует единого протокола, обобщающего такие экспериментальные данные. Трудность регенерации растений заключается в том, что в технологии клеточной селекции *in vitro* предусматривается получение растений-регенерантов из каллусной ткани длительно культивируемой в стрессовых условиях. Известно, что от пассажа к пассажу способность дедифференцированных клеток к образованию адвентивных почек в процессе выращивания уменьшается (Бутенко, 1999; Калашникова, Киракосян, 2016; Калашникова, 2020). Поэтому для каждого вида и сорта необходимо разрабатывать индивидуальные протоколы получения растений-регенерантов не только из первичной, но и длительно культивируемой каллусной ткани.

В работе изучали каллусную ткань, полученную после 3 циклов выращивания на питательной среде МС с НУК 0,5 мг/л в сочетании с БАП 1 мг/л. Данная каллусная ткань, как правило, характеризовалась средней плотностью, имела светло-зеленый оттенок с вкраплениями желтого цвета, без признаков морфогенеза. Однако для сорта Пурпл в каллусной ткани можно было заметить появление антоциановых участков (Рис. 40). Вероятно, это

связано с биологическими особенностями самого растения, для которого характерно образование антоцианов в различных частях растений. Особенно их много в клубнеплоде, что проявляется в ярко фиолетовой его окраске.



а

б

Рис. 40 Внешний вид не морфогенной каллусной ткани, полученной на среде с ИУК 0,5 мг/л в сочетании с БАП 1 мг/л: а – сорт Порто Рико, б – сорт Пурпл

В работе изучали влияние БАП, кинетина (5 мг/л) и препарата Дропп (1 мг/л) в сочетании с фиксированной концентрацией ИУК (0,5 мг/л). Данные препараты и их сочетания были выбраны на основании уже подтвержденных данных разными авторами, что соотношение цитокинина и ауксина 10:1 является наиболее оптимальным для регенерации растений из каллусной ткани (Бутенко, 1999; Носов 2005, Калашникова, 2020). Кроме того, БАП и кинетин являются наиболее часто применяемыми цитокининами в культуре *in vitro* для усиления процессов морфогенеза. Что касается препарата Дропп, то данный препарат на культуре батата *in vitro* ранее не изучался. Поэтому исследование данного препарата по действию на морфогенетический потенциал каллусных клеток представляет интерес.

Установлено, что изучаемые цитокинины оказывают не одинаковое действие на регенерацию растений из каллусной ткани. По своей активности гормоны располагаются в следующей последовательности: БАП, препарат Дропп и кинетин. 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. Что касается кинетина, то в этом варианте формировались растения правильной морфологии, но частота регенерации была самой маленькой и составила всего 13,6 - 15,6%. Самые высокие показатели по частоте образования адвентивных почек и их количеству на один каллус были получены в варианте с БАП (31,8 – 40,2%). Основные результаты приведены на рисунках 41, 42 и 43.

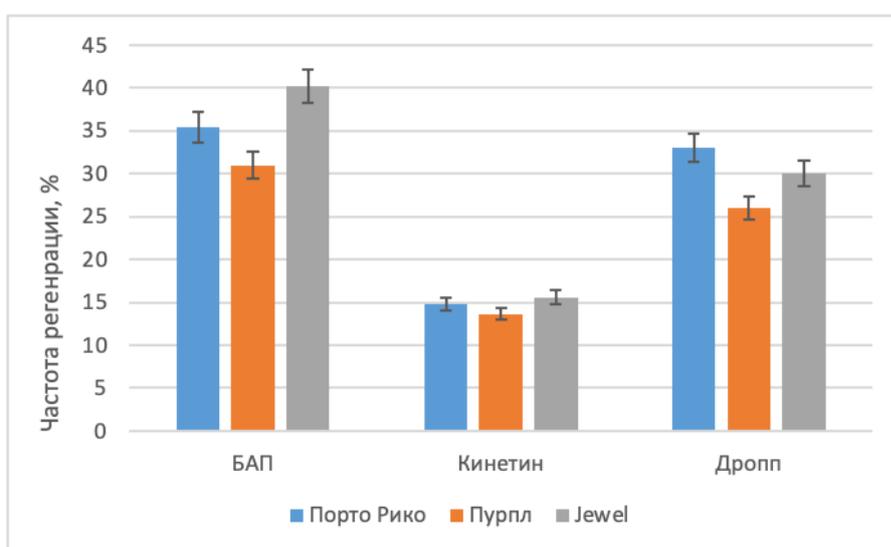


Рис. 41 Частота регенерации растений из каллусной ткани при фиксированной концентрации ИУК (0,5 мг/л)

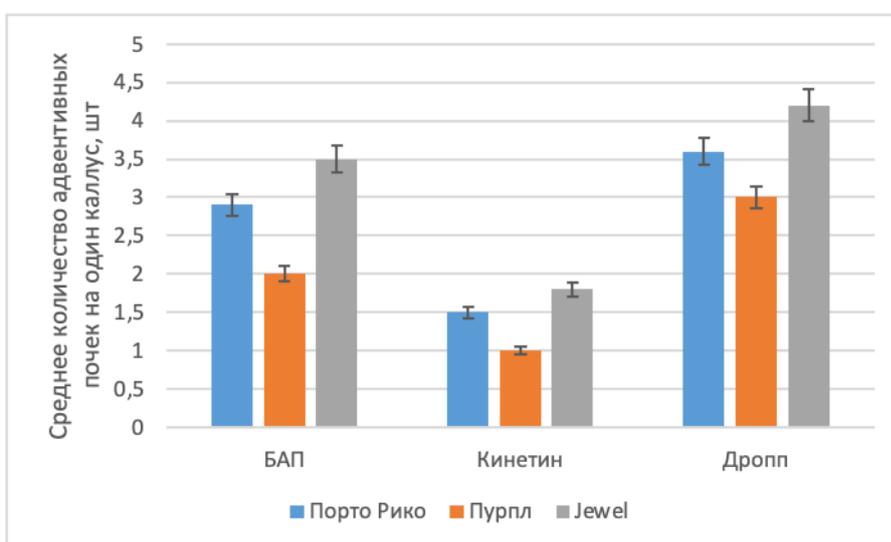


Рис. 42 Среднее число адвентивных побегов на один каллус при фиксированной концентрации ИУК (0,5 мг/л)



а б в

Рис. 43 Растения-регенеранты батата из каллусной ткани: а – сорт Порто Рико, б – сорт Пурпл; в - сорт Jewel

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.

4.3 Влияние регуляторов роста на устойчивость каллусной ткани к гипотермическому стрессу

Для отбора *in vitro* клеток или тканей на устойчивость к таким абиотическим стрессорам как избыточное засоление, закисление, загрязнение солями тяжёлых металлов, пестицидами, гербицидами и другими факторами, используют метод клеточной селекции. Дифференцированные или дедифференцированные клетки культивируют на селективных средах, в состав которых входят интересующие исследователя факторы абиотической природы. Оптимальные концентрации, при которых селекция *in vitro* будет эффективной, необходимо подбирать индивидуально для каждого вида и

сорта. Такие концентрации не должны вызывать стопроцентной гибели, но должны подавлять рост большинства клеток, тканей или органов растений. Установленные экспериментальным путем оптимальные концентрации селективного фактора для растений, не всегда совпадают с таковыми для каллусных тканей или суспензионных культур. Поэтому первоначально необходимо установить режимы выращивания микроклонов в стрессовых условиях.

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. (Игнатенко, Таланова, Репкина и др, 2021; Lei, Feng, Sun, et al., 2010; Chen, Liu, Cui, et al., 2011; Wang, Wen, Huang, Guan, et al., 2018).

Экспериментально установлено, что регуляторы роста выполняют не только важную роль в регуляции формообразовательных процессов в растениях, но и активно участвуют в их защите от воздействия факторов абиотической и биотической природы (Титов, Таланова, 2009). Известны препараты, которые оказывают стимулирующее действие на рост, продуктивность, урожайность растений, а также способны предавать растениям неспецифическую устойчивость к стрессовым факторам (Игнатенко, Таланова, Репкина и др, 2021). К таким препаратам относятся Мивал и Крезацин.

Препарат Мивал – биоорганический препарат на основе кремния (действующее вещество: 760 г/кг ортокрезоксиуксусной кислоты триэтаноламмониевая соль + 190 г/кг хлорметилсилатрана). Данный препарат ранее был апробирован на различных сельскохозяйственных культурах, выращиваемых в стрессовых условиях. Экспериментально доказано, что препарат улучшает транспорт питательных веществ, воздействует на синтез АТФ, способствует активизации энергетических процессов, что оказывает

непосредственное воздействие на ускорение обмена веществ, поддержание естественного иммунитета и тонуса клетки. Препарат по своему специфическому механизму действия аналогов не имеет (<https://agrosil.ru/>).

Препарат Крезацин – регулятор роста, адаптоген широкого спектра действия (действующее вещество: 475 г/л ортокрезоксисукусной кислоты триэтаноламмониевой соли). Препарат повышает устойчивость растений к длительному воздействию неблагоприятных факторов: пониженной и повышенной температуре, пониженному содержанию кислорода, засухе, недостатку кормов, витаминов, и др. Препарат интенсифицирует биосинтез белков и нуклеиновых кислот, повышает активность ферментов (<https://fialka.tomsk.ru/forum/viewtopic.>).

В работе препарат Мивал и препарат Крезацин изучали в концентрации 150 мг/л. Используемые в опытах концентрации препаратов Мивал или Крезацин были выбраны на основании исследований, проведенных разными авторами с сельскохозяйственными растениями, например, огурец, томаты и др. (Воронков, 2007). Контролем служила питательная среде 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. Выбор низкой температуры (14⁰С) основан на биологических особенностях растения батата. Известно, что при температуре 14⁰С приостанавливается рост надземной биомассы растения, а при температуре 10⁰С полностью останавливается обмен веществ у растения и его пребывание в почве становится бессмысленным (<https://www.batatchudo.com/services>).

Клеточная селекция *in vitro* предполагает отбор живых клеток. Для этого мы визуальнo оценивали каллусную ткань по наличию некротических участков, которые отделяли от основного каллуса при пересадке. Затем каллусную ткань, состоящую из живых клеток, переносили на питательную

среду МС для регенерации растений. В качестве индуктора образования адвентивных почек служил цитокинин БАП (1 мг/л) в сочетании с ауксином – ИУК (0,5 мг/л).

Для характеристики каллусной ткани 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 массы каллусной ткани, мг, X_2 и X_1 — масса каллусной ткани (мг) в момент времени t_2 и t_1 , сут., соответственно.

Одним из основных компонентов препаратов Мивал и Крезацин является кремний, который выступает в роли активатора физиологических процессов в клетке, облегчает выброс шлаков и ускоряет процессы метаболизма, обеспечивает функциональную активацию клеточных органелл. В клетке кремний способствует образованию соединений, которые связывают свободную воду и превращают ее, в своего рода, гель, и тем самым повышают водоудерживающую способность клетки и растения в целом. Таким образом, кремний препятствует образованию кристаллов льда при заморозках или испарению воды при высоких температурах в засуху. Основные результаты приведены в таблице 14.

Таблица 14 - Морфометрические характеристики каллусной ткани батата (генотип 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

Экспериментально 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 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. 44).

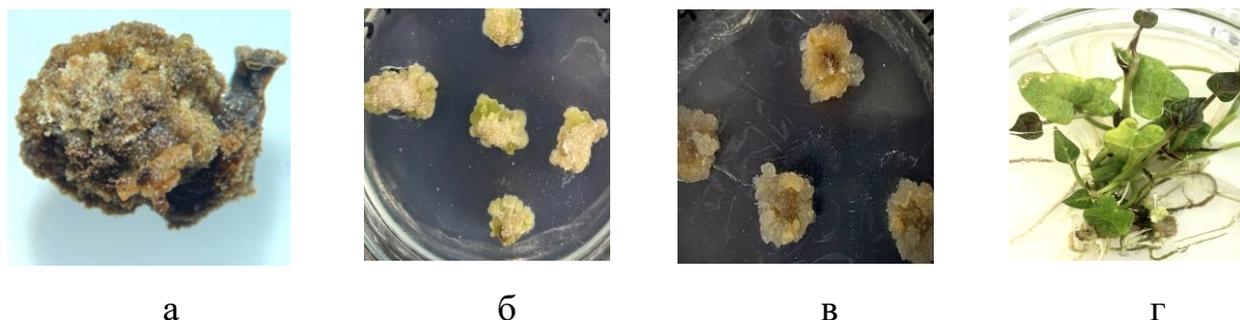


Рис. 44 Каллусная ткань в условиях гипотермического стресса: а -контроль, б – на питательной среде с препаратом Мивал, в – на питательной среде с препаратом Крезацин, г – растения-регенеранты после клеточной селекции

Что касается культивирования каллусной ткани не в стрессовых условиях, а при 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 – Джевел 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.

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 для генотипа Порто Рико получено 43 растения, у которых формировались мелкие листья, отмечен слабый рост побегов, но образовывалась мощная корневая система (Рис. 44г). Для генотипов Пурпл и Джемел получено по 4 растения.

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 15.

Таблица 15 – 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.

В заключении следует отметить, что в результате проведенных исследований были определены условия для проведения клеточной селекции, обеспечивающие получение с высокой эффективностью растения батата устойчивые к гипотермическому стрессу. Это позволит расширить ареал возделывания данной культуры и, в частности, выращивать в условиях Московской, Владимирской, Ярославской и других областях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате многоплановых исследований были получены результаты, которые имеют как теоретическое, так и практическое значение. 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев В.П. Батат. - Ленинград : Сельхозгиз, - 1933. – 120 с.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе : Учеб. пособие / МГУ им. М. В. Ломоносова. - Москва : ФБК-ПРЕСС. - 1999. – 158 .
3. Воронков М.Г. Трекрезан — родоначальник нового класса адаптогенов и иммуномодуляторов (обзор) / М.Г. Воронков, М.М. Расулов // Химико-фармацевтический журнал. – 2007, – 41(1): 3-7.
4. Джос Л., Калашникова Е.А. Влияние генотипа и условий культивирования зародышей яровой пшеницы на процессы каллусогенеза и морфогенеза // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 1998. -№3. – с. 94-99.
5. Долгих Ю.И. Генетическая изменчивость по признаку температурочувствительности в культуре клеток женьшеня. / Автореф. дисс. . канд. биол. наук, М., ЙОГ. - 1986. – 19 с.
6. Долгих Ю.И., Ларина С.Н., Шамина З.Б., Жданова Н.Е., Пустовойтова Т.Н. Засухоустойчивость растений кукурузы, полученных из устойчивых к осмотическому действию полиэтиленгликоля клеточных линий // Физиология растений. – 1994. - Т. 41. - С. 853.
7. Дубравина Г.А., Зайцева С.М., Загоскина Н.В. Изменения в образовании и локализации фенольных соединений при дедифференциации тканей тисса ягодного и тисса канадского в условиях *in vitro*. // Физиология растений. - 2005, - Т. 52, - С. 755-762.
8. Жапар К.К., Дауров Д.Л., Жамбакин К.Ж., Шамекова М.Х. Устойчивость сладкого картофеля к различным стрессовым факторам // Новости Науки Казахстана, - 2017. - №2 (132). – с. 90-112.
9. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения./ LVI Тимирязевские чтения. М.: Наука. - 1996. - 45 с.

10. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования. Биохимические методы в физиологии. - Москва: Наука, - 1971. - 185-197.
11. Игнатенко А.А., Репкина Н.С., Титов А.Ф., Таланова В.В. Реакция растений огурца на низкотемпературные воздействия разной интенсивности // Труды Карельского научного центра РАН. - 2016. - №11. - С. 57–67.
12. Калашникова Е.А. Клеточная инженерия растений: Учебник и практикум. М. : Юрайт, - 2020. Сер. 76 Высшее образование. (2-е изд.). - 378 с.
13. Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н. Современные аспекты биотехнологии. М. : РГАУ-МСХА. - 2016. - 145 с.
14. Калашникова Е.А., Чередниченко М.Ю., Киракосян Р.Н., Зайцева С.М. Лабораторный практикум по культуре клеток и тканей растений. М.: РГАУ-МСХА. - 2017. - 163 с.
15. Калашникова, Е.А., Зайцева С.М., Доан Тху Тхуи, Киракосян Р.Н. Влияние регуляторов роста на морфогенетическую активность эксплантов *Dioscorea piperonis* Makino и образование полифенолов // Международный научно-исследовательский журнал. - 2020, - №6-2 (96), - С. 6-11.
16. Костина О.В., Муравник Л.Е. Колетеры прилистников *Pentas lanceolata* (Rubiaceae) ультраструктурные и функциональные особенности // Ботанический журнал. - 2017. - 102(6):733-746.
17. Лакин Г.Ф. Биометрия : учеб. пособие для биол. спец. вузов. / М. : Высшая школа, - 1990. - 352 с.
18. Носов А.М. Вторичный метаболизм. // Физиология растений. Москва: Академия, -2005. -588.
19. Подлесный В.Б. Культура батата – перспективное направление российского овощеводства. // Овощи России. – 2014. - (2):46-49.

20. Подлесный В.Б. Оценка урожайности современных сортов батата в условиях Центральной России // *Аграрная Россия*. - 2013. - №6. – С.11-13.
21. Санеблидзе Р.С. Агротехника культуры батата / М-во сельского хозяйства Груз. ССР. Упр. овощей и картофеля. - [Тбилиси] : Госиздат Груз. ССР, - 951. - 36 с.
22. Соловых Н.В. Тканевая селекция красной малины на солеустойчивость // *Плодоводство и ягодоводство России*. - 2015. - Т. 41. - С. 339-342.
23. Соловых Н.В. Тканевая селекция растений рода *rubus* на устойчивость к тяжёлым металлам // *Плодоводство и ягодоводство России*. - 2016. - Т. 45. - С. 169-172.
24. Соловых Н.В. Сохранение толерантности к пестицидам при размножении *in vitro* растений красной малины, полученных методом тканевой селекции // В сборнике: Современное состояние садоводства Российской Федерации, проблемы отрасли и пути их решения. Материалы научно-практической конференции, в рамках 15-ой Всероссийской выставки «День садовода-2020». - Тамбов, - 2020. - С. 104-108.
25. Тараканов И.Г., Яковлева О.С. Влияние качества света на физиологические особенности и продукционный процесс базилика эвгенольного (*Ocimum gratissimum* L.) // *Естественные науки*. - 2012. - № 3. - С. 95– 97.
26. Титов А. Ф., Таланова В.В. Устойчивость растений и фитогормоны / Институт биологии КарНЦ РАН. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, - 2009. - 206 с.
27. Тихомиров А.А., Лисовский Г.А., Сидько Ф.Н., Спектральный состав света и продуктивность растений. – Новосибирск: Наука. Сиб.отделение. – 1991. – 168 с.
28. Тулупова Е.С., Остроженкова Е.Г., Слепян., Саканян Е.И. Влияние различных цитокининов на рост селективных штаммов *Panax ginseng*

- С.А.Меу и *Ranax quinquefolius* L. с герматраном Lx 5 и содержание в них гликозидов. // Биотехнология. – 2002. - №3. - С. 30-36.
- 29.Тютин М. Г. Культура батата / Под ред. проф. Н. Н. Балашева. - Москва : Сельхозгиз, - 1955. - 46 с.
- 30.Федоров А. В., Зорин Д. А. Продуктивность растений *Ipomoea batatas* Lam. в южном агроклиматическом районе Удмуртской Республики // Международный научно-исследовательский журнал. – 2018. – № 12 (78). – Ч. 2. – С. 18-21.
- 31.Шамина З.Б. Генетическая, изменчивость в популяциях соматических клеток растений в культуре. / Автореф. дисс. . докт. биол. наук, Л., ЛГУ, - 1988. - 34с.
- 32.Abubakar A.S., Yahaya S.U., Shaibu A.S., *et al.* *In vitro* propagation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivars. // Agric. Sci. Digest. - 2018. - 38 (1) : 17-21.
- 33.Abubakar A.S., Yahaya S.U., Shaibu A.S., Ibrahim H., Ibrahim A.K., Lawan Z.M., Isa A.M. *In vitro* propagation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivars ASD // Agricultural Science Digest - A Research Journal. - 2018. - Vol. 38, - No 1. - P. 17-21.1.
- 34.Addae-Frimpomaah F., Amponsah J., Tengey T.K. Regeneration of three sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) accessions in Ghana via meristem and nodal culture // International Journal of Plant Breeding and Genetics. - 2014. - Vol. 8, - No 3. - P. 121-138.
- 35.Addae-Frimpomaah F., Amponsah J., Tengey T.K. Regeneration of three sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) accessions in Ghana via meristem and nodal culture. // International Journal of Plant Breeding and Genetics. - 2014. - 8(3):121. 138.
- 36.Adikini S., Settumba B.M., Mwanga R.O.M., Gibson R.W. Sweet potato cultivar degeneration rate under high and low potato virus disease pressure zones in Uganda. // Canadian Journal of Plant Pathology. - 2015. - 37(1): 136-147.

37. Agili S., Nyende B., Ngamau K., Masinde P., Selection, Yield Evaluation, Drought Tolerance Indices of Orange-Flesh Sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam) Hybrid Clone. // *Journal of Nutrition and Food Sciences*, - 2012. - 2, 2–9.
38. Amoanimaa-Dede, H., Su, C., Yeboah, A., Chen, C., Yang, S., Zhu, H., Chen, M. Flesh color diversity of sweet potato: an overview of the composition, functions, biosynthesis, and gene regulation of the major pigments / H. Amoanimaa-Dede, C. Su, A. Yeboah, C. Chen, S. Yang, H. Zhu, M. Chen // *Phyton (Buenos Aires)*. – 2020. – T. 89. – №. 4. – C. 805-833.
39. Behera, S., Chauhan, V.B.S., Pati, K., Bansode, V., Nedunchezhiyan, M., Verma, A.K., Monalisa, K., Naik, P.K., Naik, S.K. Biology and biotechnological aspect of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.): a commercially important tuber crop / S. Behera, V.B.S. Chauhan, K. Pati, V. Bansode, M. Nedunchezhiyan, A.K. Verma, K. Monalisa, P.K. Naik, S.K. Naik // *Planta*. – 2022. – T. 256. – №. 2. – C. 40.
40. Bot A. Phytochromes and Shade-avoidance Responses in Plants. // *Annals of Botany*, – 2005. – 96:2.169-175.
41. Bovell-Benjamin, A.C. Sweet potato: a review of its past, present, and future role in human nutrition / A.C. Bovell-Benjamin // *Advances in food and nutrition research*. – 2007. – T. 52. – C. 1-59.
42. Cha-um S., Kirdmanee C. Diseases free production of sugarcane varieties (*Saccharum officinarum* L.) using *in vitro* meristem culture. // *Biotechnology*. - 2006. - 5(4):443–448.
43. Chaikam V., Karlson, D. Functional characterization of two colds hock domain proteins from *Oryza sativa*. // *Plant Cell Environ.* – 2008. - 31:995–1006.
44. Chen L., Xu C., Du Z., Hamaguchi T. Establishment of Agrobacterium - Mediated Transformation System in Sweet Potato (*Ipomoea batatas*) by

- Culture of Leaf Segments for Functional Analysis of ASG -1 , an Apomixis-Specific Gene. // *British Biotechnology Journal*, - 2013, - 458–470.
- 45.Chen W., He S., Liu D., Patil G.B., Zhai H., Wang F., Stephenson T.J., Wang Y., Wang B., Valliyodan B., Nguyen H.T., Liu Q.A. Sweetpotato Geranylgeranyl Pyrophosphate Synthase Gene, IbGGPS, Increases Carotenoid Content and Enhances Osmotic Stress Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. // *PLoS One*. – 2015. - 10(9):e0137623.
- 46.Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J.K. Cold stress regulation of gene expression in plants. // *Trends Plant Sci*. - 2007. - 12, - 444–451.
- 47.Dodd A.N., Jakobsen M.K., Baker A.J., Telzerow A., Hou S.W., Laplaze L., Barrot L., Poethig R.S., Haseloff J., Webb A.A.R. Time of day modulates low-temperature Ca²⁺ signals in *Arabidopsis*. // *Plant J*. – 2006. - 48:962–973.
- 48.Doliński R., Olek O. Micropropagation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) from node explants. // *Acta Sci Pol., Hortorum Cultus*. - 2013. - 12(4):117-127.
- 49.Dugassa G., Feyissa T. *In vitro* production of virus-free sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] by meristem culture and thermotherapy. // *Ethiop. J. Sci.*, - 2011. - 34(1):17–28.
- 50.El-Afifi S.T, Zaghloul M.M., El Saady W.A., Mosaad F.S. Using tissue culture technique in micropropagation of sweet potato (*Ipomoea batatas*) // *Journal of Plant Production, Mansoura Univ*. - 2012. - Vol. 3, - No 7. - P. 2201-2209.
- 51.Fan W.J., Deng G.F., Wang H.X., Zhang H.X., Zhang P. Elevated compartmentalization of Na⁺ into vacuoles improves salt and cold stress tolerance in sweetpotato (*Ipomoea batatas*). // *Physiol. Plant*. – 2015. - 154: 560–571.
- 52.Fan W.J., Zhang M., Zhang H.X., Zhang, P. Improved tolerance to various abiotic stresses in transgenic sweetpotato (*Ipomoea batatas*) expressing spinach betaine aldehyde dehydrogenase. // *PLoS ONE*. – 2012. - 7: e37344.

53. FAO FAO Statistical Databases. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2008 <http://faostat.fao.org>
54. FAO FAO Statistical Databases. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2011 <http://faostat.fao.org>
55. Far M. El, Mangoury K. El, Elazab H. E. M. Novel Plant Regeneration for Egyptian Sweet potato (*Ipomoea Batatas* Lam) Abees Cultivar via Indirect Organogenesis Stimulated by Initiation Medium and Cytokinin Effects. // Australian Journal of Basic and Applied Sciences, - 2009. - 3, - 543–551.
56. Gaba V.P. Plant growth regulators in plant tissue culture and development. // Plant development and biotechnology, CRC Press. Boca Ratom. – 2005. - 87-99.
57. Gao S., Yuan L., Zhai H., Liu C.L., He S.Z., Liu, Q.C. Overexpression of SOS genes enhanced salt tolerance in sweetpotato. // J. Integr. Agric. – 2012. - 11: 378–386.
58. Gao S., Yuan L., Zhai H., Liu C.L., He S.Z., Liu, Q.C. Transgenic sweetpotato plants expressing an LOS5 gene are tolerant to salt stress. // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2011. - 107: 205–213.
59. Gemenet, D.C., da Silva Pereira, G., De Boeck, B., Wood, J.C., Mollinari, M., Olukolu, B.A., Buell, C.R. Quantitative trait loci and differential gene expression analyses reveal the genetic basis for negatively associated β -carotene and starch content in hexaploid sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] /D.C. Gemenet, G. da Silva Pereira, B. De Boeck, J.C. Wood, M. Mollinari, B.A. Olukolu, C.R. Buell // Theoretical and Applied Genetics. – 2020. – T. 133. – C. 23-36.
60. Gilmour S.J., Sebolt A.M., Salazar M.P., Everard J.D., Thomashow M.F. Overexpression of the CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. // Plant Physiol., - 2000. - 124, - 1854–1865.
61. González R. G., Sánchez D. S., Guerra Z. Z. Efficient regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of recalcitrant sweet

- potato (*Ipomoea batatas* Lam) cultivars . // *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, - 2008. - 16, - 25–33.
- 62.Goswami L., Sengupta S., Mukherjee S., Ray S., Mukherjee R., Majumder, A.L. Targeted expression of L-myo-inositol 1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka confers multiple stress tolerance in transgenic crop plants. // *J. Plant Biochem. Biotechnol.* – 2014. - 23: 316–330.
- 63.Gubba A., Sivparsad B.J. Development of an efficient plant regeneration protocol for sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cv. Blesbok. // *African Journal of Biotechnology*. - 2002. - 11(84):14982-14987.
- 64.Hara M., Terashima S., Kuboi T. Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. // *J. Plant Physiol.* – 2001. - 158 (10): 1333–1339.
- 65.He J.X., Gendron J.M., Yang Y., Li, J., Wang Z.Y. (). The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in . // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. - 99:10185–10190.
- 66.Hettiarachchi A. Tissue culture and meristem culture in sweet potato (*Ipomea batatas* (L.) Lam.). // *A report by ARC*, - 1988. - p.1–7.
- 67.Huamán, Z. *Botánica Sistemática y Morfología De La Planta De Batata o Camote*. International Potato Center. 1992. Available online: <https://docplayer.es/24188174-Botanica-sistemica-y-morfologia-de-la-planta-de-batata-o-camote.html> (accessed on 5 March 2022).
- 68.Ikegami K., Okamoto M., Seo M., Koshiha T. Activation of abscisic acid biosynthesis in the leaves of *Arabidopsis thaliana* in response to water deficit. // *J Plant Res.* - 2009 Mar; - 122(2):235-43.
- 69.Islam, S. Nutritional and Medicinal Qualities of Sweet potato Tops and Leaves. // *Plant Science.* - 2014. – p. 256.

70. Ismail A.M., Hall A.E., Close T.J. Allelic variation of a dehydrin gene cosegregates with chilling tolerance during seedling emergence. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1999. - 96: 13566–13570.
71. Jan N., Andrabi K.I., Cold resistance in plants: a mystery unresolved, Electron. // J. Biotechnol., - 2009. - 12:14–15.
72. Jiang S.J., Liu Q.C., Zhai H., Wu L.S., Wang Y.P. Regeneration of sweet potato transgenic plants with oryzacystatin-I (OC I) gene. // J. Agr. Biotechnol. – 2004. - 12: 34–37.
73. Jiang T., Zhai H., Wang F.B., Zhou H.N., Si Z.Z., He S.Z., Liu Q.C. Cloning and characterization of a salt tolerance-associated gene encoding trehalose-6-phosphate synthase in sweetpotato. // J. Integr. Agric. – 2014. - 13: 1651–1661.
74. Jiang Y., Deyholos M. Functional characterization of NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. // Plant Mol. Biol., -2009. - 69:91–105.
75. Jung, J.-K., Lee, S.-U., Kozukue, N., Levin, C.E., Friedman, M. Distribution of phenolic compounds and antioxidative activities in parts of sweet potato (*Ipomoea batata* L.) plants and in home processed roots / J.-K. Jung, S.-U. Lee, N. Kozukue, C.E. Levin, M. Friedman //Journal of food composition and analysis. – 2011. – T. 24. – №. 1. – C. 29-37.
76. Karlson D., Nakaminami K., Toyomasu T., Imai R. A cold-regulated nucleic acid-binding protein of winter wheats has a domain with bacterial cold shock proteins. // J. Biol.Chem., - 2002. - 277:35248–35256.
77. Kaur H, Verma P, Petla BP, Rao V, Saxena SC, Majee M Ectopic expression of the ABA-inducible dehydration-responsive chickpea L-myoinositol 1-phosphate synthase 2 (CaMIPS2) in *Arabidopsis* enhances tolerance to salinity and dehydration stress. // *Planta*. - 2013 Jan; - 237(1):321-35.
78. Khoury, C.K., Heider, B., Castañeda-Álvarez, N.P., Achicanoy, H.A., Sosa, C.C., Miller, R.E., Scotland, R.W., Wood, J.R.I., Rossel, G., Eserman, L.A.

- Distributions, ex situ conservation priorities, and genetic resource potential of crop wild relatives of sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam., I. series Batatas] / C.K. Khoury, B. Heider, N.P. Castañeda-Álvarez, H.A. Achicanoy, C.C. Sosa, R.E. Miller, R.W. Scotland, J.R.I. Wood, G. Rossel, L.A. Eserman // *Frontiers in plant science*. – 2015. – T. 6. – C. 251.
79. Kikuchi A., Huynh H.D., Endo T., Watanabe K. Review of recent transgenic studies on abiotic stress tolerance and future molecular breeding in potato // *Breed Sci.* - 2015 Mar; - 65(1):85-10.
80. Kim K.Y., Kwon S.Y., Lee H.S., Hur Y., Bang J.W., Kwak S.S. A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweetpotato: molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells. // *Plant Mol Biol.* - 2003 Apr; - 51(6):831-8.
81. Kim M.H., Sasaki K., Imai R. Cold shock domain protein 3 regulates freezing tolerance in thaliana. // *J. Biol. Chem.* – 2009. -284:23454–23460.
82. Kim S.H., Jeong J.C., Ahn Y.O., Lee H.S., Kwak S.S. Differential responses of three sweetpotato metallothionein genes to abiotic stress and heavy metals. // *Mol Biol Rep.* - 2014 Oct. - 41(10):6957-66.
83. Kim S.H., Kim Y.H., Ahn Y.O., Ahn M.J., Jeong J.C., Lee H.S., Kwak S.S. Downregulation of the lycopene ϵ -cyclase gene increases carotenoid synthesis via the β -branch-specific pathway and enhances salt-stress tolerance in sweetpotato transgenic calli. // *Physiol Plant.* - 2013 Apr; - 147(4):432-42.
84. Kim T.W., Wang Z.Y. Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. // *Annu. Rev. Plant Biol.*, - 2010. - 61:681–704.
85. Kim, H.S., Wang, W., Kang, L., Kim, S.-E., Lee, C.-J., Park, S.-C., Park, W.S., Ahn, M.-J., Kwak, S.-S. Metabolic engineering of low-molecular-weight antioxidants in sweetpotato / H.S.Kim, W. Wang, L. Kang, S.-E. Kim, C.-J. Lee, S.-C. Park, W.S. Park, M.-J. Ahn, S.-S. Kwak // *Plant Biotechnology Reports*. – 2020. – T. 14. – C. 193-205.

86. Kim, Y.H., Kim, M.D., Park, S.C., Yang, K.S., Jeong, J.C., Lee, H.S. and Kwak, S.S. SCOF-1-expressing transgenic sweetpotato plants show enhanced tolerance to low-temperature stress. // *Plant Physiol. Biochem.* – 2011. - 49: 1436–1441.
87. Kolodyazhnaya Y.S., Kutsokon N.K., Levenko B.A., Syutikova O.S., Rakhmetov D.B., Kochetov A.V. Transgenic plants tolerant to abiotic stresses, - 2009. - No2:72-93.
88. Kwak S.S., Kim S.K., Lee M.S., Jung K.H., Park I.H., Liu J.R. Three acidic peroxidases from suspension-cultures of sweet potato. // *Phytochemistry.* - 1995. - 39: 981–984.
89. Lang V., Mantyla E., Welin B., Sundberg B., Palva E.T. Alterations in water status, endogenous abscisic acid content, and expression of *rab18* gene during the development of freezing tolerance in *thaliana*. // *Plant Mol. Biol.*, - 1994. - 104:1341– 1349.
90. Laurie, S.M., Calitz, F.J., Adebola, P.O., Lezar, A. Characterization and evaluation of South African sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) LAM) land races / S.M.Laurie, F.J. Calitz, P.O. Adebola, A. Lezar // *South African Journal of Botany.* – 2013. – T. 85. – C. 10-16.
91. Lee B.H., Henderson D.A., Zhu J.K. The cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. // *Plant Cell*, - 2005. - 17: 3155–3175
92. Li H., Ye K., Shi Y., Cheng J., Zhang X., and Yang S. BZR1 Positively Regulates Freezing Tolerance via CBF- Dependent and CBF-Independent Pathways in // *Molecular Plant*, - 2017. - 10:545–55
93. Li Y., Deng X.P., Kwak S.S., Tanaka K. Drought tolerance of transgenic sweetpotato expressing both Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase. // *J. Plant Physiol. Mol. Biol.* – 2006. - 32: 451–457.
94. Li, L., Aldini, G., Carini, M., Chen, C.-Y.O., Chun, H.-K., Cho, S.-M., Park, K.-M., Correa, C.R., Russell, R.M., Blumberg, J.B. Characterisation, extraction efficiency, stability and antioxidant activity of phytonutrients in *Angelica keiskei* / L. Li, G.Aldini, M. Carini, C.-Y.O. Chen, H.-K. Chun, S.-

- M. Cho, K.-M. Park, C.R. Correa, R.M. Russell, J.B. Blumberg //Food chemistry. – 2009. – T. 115. – №. 1. – C. 227-232.
- 95.Lim S., Kim Y.H., Kim S.H., Kwon S.Y., Lee H.S., Kim J.S., Cho K.Y., Paek K.Y., Kwak S.S. Enhanced tolerance of transgenic sweetpotato plants that express both CuZnSOD and APX in chloroplasts to methyl viologen-mediated oxidative stress and chilling. // Mol. Breed. 200719: 227–239.
- 96.Liu D.G., He S.Z., Song,X.J., Zhai H., Liu N., Zhang D.D., Ren Z.T., Liu Q.C. IbSIMT1, a novel salt-induced methyltransferase gene from Ipomoea batatas, is involved in salt tolerance. // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2015. - 120: 701–715.
- 97.Liu D.G., He S.Z., Zhai H., Wang L.J., Zhao Y., Wang B., Li R.J., Liu Q.C. Overexpression of IbP5CR enhances salt tolerance in transgenic sweetpotato. // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2014. - 117: 1–16.
- 98.Liu Q.C. Sweet potato omics and biotechnology in China. // Plant Omics J. – 2011. - 4: 295–301.
- 99.Liu Q.C., Zhai H., Wang Y., Zhang D.P. Efficient plant regeneration from embryonic suspension cultures of sweet potato. // In Vitro Cell Developmental Biology-Plant. - 2001. - 37:564–567.
100. Liu Y., Song Q., Li D., Yang X., Li D. (2017). Multifunctional roles of plant dehydrins in response to environmental stresses. Front. Plant Sci. 8, 1018.
101. Loebenstein, G. Origin, distribution and economic importance / G. Loebenstein //The sweetpotato. – 2009. – C. 9-12.
102. Maleki M., Ghorbanpour M., Kariman K. Physiological and antioxidative responses of medicinal plants exposed to heavy metals stress. // Plant Gene – 2017. - 11:247–254.
103. Maruyama K., Sakuma Y., Kasuga M., Ito, Y., Seki M., Goda, H., Shimada Y., Yoshida S., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Identification of cold-inducible downstream genes of the DREB1A/CBF3

- transcriptional factor using two microarray systems. // *Plant J.*, - 2004. - 38:982–993.
104. Medina J., Catalá R., Salinas J. The CBFs: Three transcription factors to cold acclimate. // *Plant Sci.*, - 2011. - 180:3–11.
105. Meira, M., Da Silva, E.P., David, J.M., David, J.P. Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities / M. Meira, E.P. Da Silva, J.M. David, J.P. David//*Revista Brasileira de Farmacognosia.* – 2012. – T. 22. – C. 682-713.
106. Melissa S. S., Blay E.T., Amissah N. Responses of Four Sweet Potato (*Ipomoea Batatas* L.) Accessions to *In Vitro* Regeneration and Slow Growth Preservation. // *Agri Res & Tech: Open Access J.* - 2019. - 22(5): 556210.
107. Mizoi J., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. // *Biochim. Biophys. Acta*, - 2012. - 1819: 86–96.
108. Mohanraj, R., Sivasankar, S. Sweet Potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam)-A valuable medicinal food: A review / R. Mohanraj, S. Sivasankar //*Journal of medicinal food.* – 2014. – T. 17. – №. 7. – C. 733-741.
109. Motsa N. M., Modi A. T., Mabhaudhi T. Sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam) as a drought tolerant and food security crop. // *South African Journal of Science*, - 2015. - 111, - 1–8.
110. Muñoz-Rodríguez, P., Carruthers, T., Wood, J.R., Williams, B.R., Weitemier, K., Kronmiller, B., Goodwin, Z., Sumadijaya, A., Anglin, N., Filer, D. A taxonomic monograph of *Ipomoea* integrated across phylogenetic scales /P. Muñoz-Rodríguez, T.Carruthers, J.R. Wood, B.R. Williams, K. Weitemier, B. Kronmiller, Z. Goodwin, A. Sumadijaya, N. Anglin, D. Filer //*Nature Plants.* – 2019. – T. 5. – №. 11. – C. 1136-1144.
111. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. // *Physiol. Plant.* - 1962. - 15: 473-497.

112. Mwanga, R.O., Andrade, M.I., Carey, E.E., Low, J.W., Yencho, G.C., Grüneberg, W.J. Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) / R.O.Mwanga, M.I.Andrade, E.E.Carey, J.W. Low, G.C. Yencho, W.J. Grüneberg //Genetic improvement of tropical crops. – 2017. – C. 181-218.
113. Nakaminami K., Karlson D.T., Imai R. Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants. // Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. – 2006. - 103:10122–10127.
114. Namanda S., Gibson R.W., Kirimi, S. Sweet potato seed systems in Uganda, Tanzania and Rwanda // Journal of Sustainable Agriculture. - 2011. - 35: 870-884.
115. Nguyen, H.C., Chen, C.-C., Lin, K.-H., Chao, P.-Y., Lin, H.-H., Huang, M.-Y. Bioactive compounds, antioxidants, and health benefits of sweet potato leaves / H.C. Nguyen, C.-C. Chen, K.-H. Lin, P.-Y. Chao, H.-H. Lin, M.-Y. Huang//Molecules. – 2021. – T. 26. – №. 7. – C. 1820.
116. Novillo F., Medina J., Salinas J. CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, - 2007. - 104:21002–21007.
117. Ogero K. O., Mburugu G. N., Mwangi M., Ngugi M. M., Ombori, O. Low Cost Tissue Culture Technology in the Regeneration of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* Lam). // Research Journal of Biology, - 2012. - 2, - 51–58.
118. Ogero K.O., Gitonga N.M., Mwangi M., Ombori O., Ngugi M. A low-cost medium for sweet potato micro propagation. // African Crop Science Conference Proceedings. - 2011. - 10: 57-63.
119. Onwubiko N.C., Ihezue C.I., Mozie M.U. *In vitro* Regeneration of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) from Node Explants. // American Journal of Experimental Agriculture. - 2015.- 8(2): 87-92.
120. Otani M., Mii M., Handa, T., Kamada H., Shimada, T. Transformation of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants by *Agrobacterium rhizogenes*. // Plant Sci. – 1993. - 94: 151–159.

121. Otani M., Wakita Y., Shimada, T. Production of herbicide-resistant sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. // *Breed. Sci.* – 2003. - 53: 145–148.
122. Park S.C., Kim Y.H., Jeong J.C., Kim C.Y., Lee H.S., Bang J.W., Kwak S.S. Sweetpotato late embryogenesis abundant 14 (IbLEA14) gene influences lignification and increases osmotic- and salt stress-tolerance of transgenic calli. // *Planta.* - 2011 Mar; - 233(3):621-34.
123. Park S.C., Kim Y.H., Kim S.H., Jeong, Y.J., Kim C.Y., Lee J.S., Bae J.Y., Ahn M.J., Jeong J.C., Lee H.S. et al. Overexpression of the IbMYB1 gene in an orange-fleshed sweetpotato cultivar produces a dual-pigmented transgenic sweetpotato with improved antioxidant activity. // *Physiol. Plant.* – 2015. - 153: 525–537.
124. Parveen, A., Choi, S., Kang, J.-H., Oh, S.H., Kim, S.Y. Trifostigmanoside I, an active compound from sweet potato, restores the activity of MUC2 and protects the tight junctions through PKC α/β to maintain intestinal barrier function / A. Parveen, S. Choi, J.-H. Kang, S.H. Oh, S.Y. Kim // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2020. – T. 22. – №. 1. – C. 291.
125. Pino M.T., Skinner J.S., Park E.J., Jekni Z., Hayes P.M., Thomashow M.F., Chen T.H. Use of a stress inducible promoter to drive ectopic AtCBF expression improves potato freezing tolerance while minimizing negative effects on tuber yield. // *Plant Biotechnology Journal*, - 2007. - P.591–604
126. Rockwell N.C., Su Yi-Shin, Lagarias J.C. Phytochrome structure and signaling mechanisms. // *Annual Review of Plant Biology*, –2006. – 57:837-858.
127. Roullier, C., Benoit, L., McKey, D.B., Lebot, V. Historical collections reveal patterns of diffusion of sweet potato in Oceania obscured by modern plant movements and recombination / C. Roullier, L. Benoit, D.B. McKey, V. Lebot // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2013. – T. 110. – №. 6. – C. 2205-2210.

128. Ruan L., Chen L.J., Chen Y.H., He J.L., Zhang W., Gao Z.L, Zhang Y.H. Expression of Arabidopsis HOMEODOMAIN GLABROUS 11 enhances tolerance to drought stress in transgenic sweetpotato plants. // *J. Plant Biol.* – 2012. - 55: 151–158.
129. Rushton J., Somssich E., Ringler P., Qingxi J.S. WRKY transcription factors. // *Trends in Plant Science*, - 2010. - 15:247-258.
130. Sage L.C. Pigment of the Imagination: A History of Phytochrome Research. // San Diego: Academic Press, Inc. –1992. –562 pp.
131. Samiyarsih, S., Azizah, E., Herawati, W. Anatomical profile and genetic variability of sweet potato (*Ipomoea batatas*) cultivars in Banyumas, Central Java, based on RAPD markers / S. Samiyarsih, E. Azizah, W. Herawati // *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. – 2020. – T. 21. – №. 4.
132. Sanghera G.S., Wani S.H., Hussain W., Singh N.B. Engineering cold stress tolerance in crop plants // *Current Genomics*, - 2011. - 12:30-43.
133. Sefasi A., Ssemakula G., Ghislain M., Prentice K., Kiggundu A., Mwangi R. Transient Expression of β -Glucuronidase In Recalcitrant Ugandan Sweet potato and Putative Transformation With Two Cry Genes. // *African Crop Science Journal*, - 2014. - 22, - 215–227.
134. Shabala S. *Plant Stress Physiology*, // CABI, Boston, MA, - 2017. - P.376.
135. Shaibu A.S., Abubakar A.S., Lawan Z.M., Ibrahim A.K., Rabi H.M., Muhammad A.I., et al. Media Optimization and Effect of Surface Sterilization Timing on In Vitro Propagation of Sweet Potato. // *Proceedings of the 2nd International Conference on Drylands*. 2016.
136. Shandilya, U.K., Sharma, A. Functional foods and their benefits: an overview / U. K. Shandilya, A. Sharma // *J. Nutr. Health Food Eng.* – 2017. – T. 7. – №. 4. – C. 353-356.
137. Shih, P.-H., Yeh, C.-T., Yen, G.-C. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element

- pathway against oxidative stress-induced apoptosis / P. H. Shih, C. T. Yeh, G. C. Yen // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2007. – T. 55. – №. 23. – C. 9427-9435.
138. Sihachakr D., Haïcour R., Cavalcante Aves J.M., Umboh I., Nzoghé D., Servaes A., Ducreux G. Plant regeneration in sweet potato (*Ipomoea batatas* L., Convolvulaceae). // *Euphytica*. - 1997. - 96(1):143-152.
139. Song, G.Q., Honda, H., Yamaguchi, K.I. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) from stem explants using a two-step kanamycin-hygromycin selection method. // *In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant* – 2004. - 40: 359–365.
140. Tan J., Wang C., Xiang B., Han R., Guo Z. Hydrogen peroxide and nitric oxide mediated cold- and dehydration-induced myo-inositol phosphate synthase that confers multiple resistances to abiotic stresses. // *Plant Cell Environ.* - 2013 Feb; - 36(2):288-99.
141. Tanaka, M., Ishiguro, K., Oki, T., Okuno, S. Functional components in sweetpotato and their genetic improvement / M. Tanaka, K. Ishiguro, T. Oki, S. Okuno // *Breeding science*. – 2017. – T. 67. – №. 1. – C. 52-61.
142. Tang, Y., Cai, W., Xu, B. Profiles of phenolics, carotenoids and antioxidative capacities of thermal processed white, yellow, orange and purple sweet potatoes grown in Guilin, China / Y.Tang, W.Cai, B.Xu // *Food Science and Human Wellness*. – 2015. – T. 4. – №. 3. – C. 123-132.
143. Teow, C.C., Truong, V.-D., McFeeters, R.F., Thompson, R.L., Pecota, K.V., Yencho, G.C. Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours / C.C. Teow, V.-D. Truong, R.F. McFeeters, R.L. Thompson, K.V. Pecota, G.C. Yencho // *Food chemistry*. – 2007. – T. 103. – №. 3. – C. 829-838.
144. Tewodros T. Survey and serological detection of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) Lam. infecting viruses in Ethiopia. // MSc thesis, Addis Ababa University, Ethiopia. - 2010.
145. Thorpe T.A., Vasil, I.K. Morphogenesis and regeneration. // *Plant Cell*

- and Tissue Culture, Kluwer Academic Publishers. Netherlands, Dordrecht - 1994. - 7-36.
146. Tumwegamire S., Kapinga R., Rubaihayo P. R., et al. Evaluation of dry matter, protein, starch, sucrose, β -carotene, iron, zinc, calcium, and magnesium in East African sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) germplasm. // HortSci. - 2011. - 46(3): 348–357.
 147. Uemura M., Steponkus P.L. Effect of cold acclimation on the lipid composition of the inner and outer membrane of the chloroplast envelope isolated from rye leaves, // Plant Physiol, - 1997. - 114:1493–1500.
 148. Vogel J.T., Zarka D.G., van Buskirk H.A., Fowler S.G., Thomashow M.F. Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of. // Plant J., - 2005. - 41:195–211.
 149. Wang B., Zhai H., He S.Z., Zhang H., Ren Z.T., Zhang D.D., Liu Q.C. A vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene, IbNHX2, enhances salt and drought tolerance in transgenic sweetpotato. // Sci. Hortic. – 2016. - 201: 153–166.
 150. Wang H.X., Fan W.J., Li H., Yang J., Huang J.R., Zhang P. Functional characterization of dihydroflavonol-4-reductase in anthocyanin biosynthesis of purple sweetpotato underlies the direct evidence of anthocyanins function against abiotic stresses. // PLoS ONE. - 2013. - 8: e78484.
 151. Wang, H., Cao, G., Prior, R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins / H.Wang, G.Cao, R. L. Prior //Journal of agricultural and Food Chemistry. – 1997. – T. 45. – №. 2. – C. 304-309.
 152. Wu X., Shiroto Y., Ito Y., Toriyama K. Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter. // Plant Cell Rep., - 2009. - 28:21–30.
 153. Xie Z., Ruas P., Shen Q.J. Regulatory networks of the phytohormone abscisic acid, // Vitam. Horm., - 2005. - 72:235–269.
 154. Xiong L, Ishitani M, Lee H, Zhu JK The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress-

- and osmotic stress-responsive gene expression. // *Plant Cell*. - 2001 Sep; - 13(9):2063-83.
155. Yang Q., Chen Z.Z., Zhou X.F., Yin H.B., Li X., Xin X.F., Hong X.H., Zhu J.K., Gong Z. Overexpression of SOS (Salt Overly Sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. // *Mol Plant*. - 2009 Jan; - 2(1):22-31
156. Yang, J., Moeinzadeh, M.-H., Kuhl, H., Helmuth, J., Xiao, P., Haas, S., Liu, G., Zheng, J., Sun, Z., Fan, W. Haplotype-resolved sweet potato genome traces back its hexaploidization history / J. Yang, M.-H. Moeinzadeh, H. Kuhl, J. Helmuth, P. Xiao, S. Haas, G. Liu, J. Zheng, Z. Sun, W. Fan // *Nature plants*. – 2017. – T. 3. – №. 9. – C. 696-703.
157. Yin Y., Vafeados D., Tao Y., Yoshida S., Asami T., Chory J.. A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in // *Cell*, - 2005. - 120:249–259.
158. Yu B., Zhai H., Wang Y.P., Zang N., He S.Z., Liu Q.C. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using embryogenic suspension cultures in sweetpotato, *Ipomoea batatas*(L.) Lam. // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2007. - 90: 265–273.
159. Yu H., Chen X., Hong Y.Y., Wang Y., Xu P., Ke S.D., Liu H.Y., Zhu J.K., Oliver D.J., Xiang C.B. Activated expression of an *Arabidopsis* HD-START protein confers drought tolerance with improved root system and reduced stomatal density. // *Plant Cell*. - 2008 Apr. - 20(4):1134-51.
160. Yuanyuan M., Yali Z., Jiang L., Hongbo S. (). Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress, // *Afr. J. Biotechnol.* – 2009. - 8(10): 2004–2010.
161. Zang N., Zhai H., Gao S., Chen W., H, S.Z., Liu Q.C. Efficient production of transgenic plants using the bar gene for herbicide resistance in sweetpotato. // *Sci. Hortic.* – 2009. - 122: 649–653.
162. Zhai H, Wang F, Si Z, Huo J, Xing L, An Y, He S, Liu Q A myo-inositol-1-phosphate synthase gene, *IbMIPS1*, enhances salt and drought

- tolerance and stem nematode resistance in transgenic sweet potato. // Plant Biotechnol J. - 2016 Feb; - 14(2):592-602.
163. Zhai H., Liu, Q.C. Expression analysis of sweetpotato myo-inositol-1-phosphate synthase gene. // Mol. Plant Breed. – 2009. - 7: 537–544.
164. Zhang N., Si H., Wen,G., Du H., Liu B., Wang, D. Enhanced drought and salinity tolerance in transgenic potato plants with a BADH gene from spinach. // Plant Biotechnol. Rep. – 2011. - 5: 71–77.
165. Zou X., Seemann J.R., Neuman D., Shen Q.J. A WRKY gene from creosote bush encodes an activator of the abscisic acid signaling pathway. // J. Biol. Chem., - 2004. - 279:55770–55779.
166. <https://www.batatchudo.com/services>
167. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
168. <https://www.theplantlist.org>
169. <https://www.fialka.tomsk.ru/forum/viewtopic>.
170. www.gbif.org
171. <https://nasotkah.com/ovoshhi/batat/obzor-sortov.html>

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2783183

**Способ получения безвирусного, генетически
однородного посадочного материала батата (*Ipomoea
Batatas L.*) in vitro**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева" (ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева) (RU)*

Авторы: *Калашникова Елена Анатольевна (RU), Киракосян Рима Нориковна (RU), Абубакаров Хани Геланиевич (RU), Десятерик Анастасия Андреевна (RU), Ганаева Дарья Рассовна (RU)*

Заявка № 2021131437

Приоритет изобретения **27 октября 2021 г.**

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **09 ноября 2022 г.**

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **27 октября 2041 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 68b80077e14c4010a94e8bd24145d5c7
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 24.05.2022 по 26.05.2023

Ю.С. Зубов



ПРИЛОЖЕНИЕ 2

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2787700

Способ получения холодоустойчивого посадочного материала батата

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева" (ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева) (RU)*

Авторы: *Калашникова Елена Анатольевна (RU), Киракосян Рима Нориковна (RU), Абубакаров Халид Геланиевич (RU), Карсункина Наталья Петровна (RU), Чередниченко Михаил Юрьевич (RU), Поливанова Оксана Борисовна (RU), Темирбекова Сулухан Кудайбердиевна (RU)*

Заявка № **2022100715**

Приоритет изобретения **14 января 2022 г.**

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **11 января 2023 г.**

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **14 января 2042 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 68b80077e14c40f0a94e0bd24145d5c7
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 20.01.2022 по 26.05.2023

Ю.С. Зубов

