

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-64

**ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ТИПА ЭКСПЛАНТА  
ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ИНДУКЦИИ НЕПРЯМОГО ОРГАНОГЕНЕЗА ПОБЕГОВ  
У КЛЕЩЕВИНЫ СОРТА ЗАНЗИБАР ГРИН В УСЛОВИЯХ *IN VITRO***

**OPTIMIZATION OF CULTURE CONDITIONS AND EXPLANT TYPE ON THE INDUCTION  
OF EFFECTIVE *IN VITRO* CASTOR BEAN SHOOT ORGANOGENESIS (CV. ZANZIBAR GREEN)**

Д. В. Демиденко<sup>1</sup>, Н. В. Варламова<sup>1</sup>, М. Р. Халилуев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва

<sup>2</sup>Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К. А. Тимирязева, Москва

D. V. Demidenko<sup>1</sup>, N. V. Varlamova<sup>1</sup>, M. R. Khaliluev<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow

<sup>2</sup>Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy

✉ Frankenvini1998@mail.ru

#### Аннотация

В работе продемонстрирован эффективный и быстрый протокол индукции соматического органогенеза побегов клещевины сорта Занзибар Грин в условиях *in vitro* для ювенильных фрагментов гипокотилей. 7-суточные фрагменты гипокотилей показали высокий регенерационный потенциал на всех типах питательных сред в сравнении с другими типами эксплантов.

#### Abstract

In this work, an effective and rapid protocol for inducing *in vitro* somatic organogenesis of castor bean shoots of the Zanzibar Green variety for juvenile hypocotyl fragments was demonstrated. 7-day fragments of hypocotyls showed a high regeneration potential on all types of culture medium in comparison with other types of explants.

Клещевина обыкновенная (*Ricinus communis* L.) является широко распространенной тропической сельскохозяйственной культурой, в основном выращиваемой для получения касторового масла, используемого во многих отраслях: фармакологии, косметологии, аэрокосмической, текстильной и легкой промышленности и др. [1]. Кроме того, клещевина как техническая высокомасличная культура считается перспективной сырьевой альтернативой при производстве биодизеля [2, 3]. В то же время пищевое использование жмыха семян клещевины в качестве кормовой добавки для сельскохозяйственных животных ограничено высокой токсичностью из-за наличия в его составе белка рицина, который способен ингибировать биосинтез белка [4]. Детоксикация рицина методами термической и химической обработки семян значительно снижает их питательные свойства [5], в связи с чем получение растений клещевины с пониженным или редуцированным содержанием рицина с использованием методов генетической инженерии является довольно перспективной задачей. В свою очередь, разработка эффективного протокола соматического органогенеза побегов является неотъемлемым этапом в получении трансгенных и (или) генно-редактированных растений.

Таким образом, цель настоящего исследования — подбор типа и возраста экспланта, а также условий культивирования для разработки эффективного протокола соматического органогенеза побегов клещевины сорта Занзибар Грин в условиях *in vitro*.

Культивирование эксплантов, отличных по возрасту (7-суточные и 21-суточные гипокотили), предварительной подготовке (крупно- и мелконарезанные фрагменты стебля), а также по морфологии (гипокотили, стебли и черешки листьев), производили на питательной среде по прописи Мурасиге и Скуга с добавлением регуляторов роста следующего состава:

- 1) MS + 5 мг/л 6-БАП + 0,1 мг/л ИУК + 5 мг/л AgNO<sub>3</sub>;
- 2) MS + 0,25 мг/л тидиазулона (ТДЗ) + 0,1 мг/л ИУК + 5 мг/л AgNO<sub>3</sub>;
- 3) MS + 1 мг/л зеатина + 0,1 мг/л ИУК + 5 мг/л AgNO<sub>3</sub>;

Все типы эксплантов были получены из асептических семян клещевины сорта Занзибар Грин, предварительно введенных в культуру *in vitro* согласно стандартному протоколу стерилизации с использованием хлорсодержащих агентов.

Для получения 7-суточных гипокотилей использовали отдельный протокол, включающий этапы извлечения гипокотилей из проросшего семени, отсечения зародышевого корня и зародышевого побега, прекультивации в течение 7 сут. на ранее описанных средах для индукции органогенеза и повторное отсечение краев экспланта для исключения попадания меристематических клеток корня и стебля. Продолжительность культивирования составила 42 сут. Экспланты пассировали на новую питательную среду через каждые 14 сут.

Несмотря на высокую способность к калусообразованию у всех типов эксплантов (63–100 %) независимо от состава питательной среды, регенерационная способность для каждого типа экспланта была индивидуальна и варьировала в том числе в зависимости от возраста экспланта и его размера. Наиболее высокий морфогенетический потенциал на всех типах питательных сред был выявлен для 7-суточных фрагментов гипокотилей и составил порядка 50 %. На среде с тидиазуроном этот показатель достиг 67,5 %, что является наибольшим показателем частоты регенерации среди всех эксплантов. При этом среднее количество регенерантов на одном экспланте было равно 6,7. В то время как у 21-суточных фрагментов гипокотилей калусная ткань оказалась неморфогенной, о чем свидетельствовало полное отсутствие регенерантов на всех типах сред. Также было выявлено различие в регенерационной способности у крупных и мелких фрагментов стеблей, частота органогенеза которых на среде с зеатином составила 27,6 и 0,4 % соответственно. Для черешков листьев этот показатель не превышал 1 %. При этом на каждом регенерировавшем экспланте наблюдалось не более одного регенеранта.

Таким образом, в среднем по всем вариантам питательных сред изученные экспланты расположились в следующей последовательности по частоте соматического органогенеза побегов: 7-суточные фрагменты гипокотилей (52,5 %) > крупные фрагменты стебля (11,6 %) > мелкие фрагменты стебля (0,4 %), черешки листьев (0,2 %), 21-суточные фрагменты гипокотилей (0 %).

В результате проведения данного эксперимента был разработан эффективный протокол соматического органогенеза побегов *in vitro* для клещевины сорта Занзибар Грин при культивировании 7-суточных фрагментов гипокотилей на среде с тидиазуроном, который в дальнейшем может быть использован для различных биотехнологических исследований, в том числе для генетической инженерии и геномного редактирования по получению растений клещевины с улучшенными сельскохозяйственными признаками.

### Литература

1. Nitbani F. O., Tjitda P. J. P., Wogo H. E., Detha A. I. R. Preparation of ricinoleic acid from castor oil: a review // J. Oleo Sci. 2022. Vol. 71. P. 781–793.
2. Osorio-González C. S., Gómez-Falcon N., Sandoval-Salas F. et al. Production of biodiesel from castor oil: a review // Energies. 2020. Vol. 13. P. 2467.
3. Keera S. T., El Sabagh S. M., Taman A. R. Castor oil biodiesel production and optimization // Egypt. J. Pet. 2018. Vol. 27. P. 979–984.
4. Audi J., Belson M., Patel M. et al. Ricin poisoning: a comprehensive review // Jama. 2005. Vol. 294. P. 2342–2351.
5. Anandan S., Kumar G. A., Ghosh J., Ramachandra K. S. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake // Japan. J. Forensic Sci. Tech. 2005. Vol. 120. P. 159–168.