

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Биотехнологии гаплоидов как инструмент создания селекционного материала сахарной свеклы

Е.О. Колесникова , Е.И. Донских, Р.В. Бердников

Селекционно-генетический центр ООО «СоюзСемСвекла», пос. ВНИИСС, Рамонский район, Воронежская область, Россия
 kolelkb@mail.ru

Аннотация. С момента открытия явления гаплоидии биотехнологии стали неотъемлемой частью в процессе успешного создания новых сортов и гибридов различных видов растений. Особенно активно данные технологии применяются в сельском хозяйстве, которое заинтересовано в увеличении объемов и повышении качества производимой продукции. Интеграция приемов получения гаплоидов вместе с другими имеющимися биотехнологическими инструментами, такими как маркерная селекция (MAS), индуцированный мутагенез и генно-инженерные технологии, может значительно ускорить селекцию сельскохозяйственных культур. В статье показаны основные этапы развития биотехнологий начиная с 1921 г. Теперь они успешно используются при создании удвоенных гаплоидов для ускорения селекционного процесса различных растений, и в частности сахарной свеклы – важнейшей сахароносной культуры в регионах с умеренным климатом. Существует несколько методов получения форм с одинарным набором хромосом. Для сахарной свеклы целесообразным оказалось применение гиногенеза, поскольку остальные приемы были малоэффективны при массовом получении гаплоидов. В публикации рассматриваются этапы получения H- и DH-линий *Beta vulgaris* L., а также основные этапы биотехнологического производства гомозиготного селекционного материала этой культуры. К ним относятся: отбор родительских форм – доноров эксплантов; стерилизация бутонов и введение неопыленных семяпочек *in vitro*; получение гаплоидов; удвоение их хромосомного набора; создание удвоенных гаплоидов; определение пloidности на разных этапах; перевод полученных растений в закрытый грунт и выращивание штеклингов. Описан ряд преимуществ, которые имеет технология создания удвоенных гаплоидов *in vitro* по сравнению с традиционными методами селекции. Показано, что применение данных подходов является актуальным при получении новых высокопродуктивных гибридов и сортов сельскохозяйственных растений, однако приемы производства гомозиготных форм у сахарной свеклы все еще требуют проведения дополнительных исследований, направленных на увеличение эффективности и воспроизводимости каждого этапа процесса. Ключевые слова: сахарная свекла; гаплоид; удвоенный гаплоид; гиногенез; биотехнологии; *in vitro*; DH-линии.

Для цитирования: Колесникова Е.О., Донских Е.И., Бердников Р.В. Биотехнологии гаплоидов как инструмент создания селекционного материала сахарной свеклы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(8): 812-821. DOI 10.18699/VJ21.094

Haploid biotechnology as a tool for creating a selection material for sugar beets

Е.О. Kolesnikova , Е.И. Donskikh, R.V. Berdnikov

Breeding and Genetic Center "UnionSeedsBeet", Ltd., VNISS, Ramonsky district, Voronezh region, Russia
 kolelkb@mail.ru

Abstract. Since the discovery of the phenomenon of haploidy, biotechnology has become an integral part in the successful creation of new varieties and hybrids of various plant species. In particular, these technologies are actively used in agriculture, which is concerned with increasing the volume and improving the quality of products. The integration of haploid production techniques together with other available biotechnological tools such as marker selection (MAS), induced mutagenesis and genetic engineering technologies can significantly accelerate crop breeding. This article shows the main stages in the development of biotechnology since 1921. Now they are successfully used to create doubled haploids to accelerate the selection process of various plants and, in particular, sugar beet, which is the most important sugar crop in regions with a temperate climate. There are several methods for obtaining forms with a single set of chromosomes. For sugar beets, the use of gynogenesis turned out to be expedient, since in this case the other methods turned out to be ineffective in the mass production of haploids. The article considers the stages of obtaining the H and DH lines of *Beta vulgaris* L., as well as the main stages of biotechnological production of homozygous breeding material of this culture. These stages include selecting parental forms – donor explants, sterilizing buds and introducing non-pollinated ovules *in vitro*, obtaining haploids, doubling their chromosome set, creating doubled haploids, determining ploidy at different stages, relocating the obtained plants to greenhouses and growing stecklings. A number of advantages that the technology of creating doubled haploids *in vitro* has in comparison with traditional methods of selection are described. It has been shown that the use of these approaches is relevant when obtaining

new highly productive hybrids and varieties of agricultural plants; however, the methods for the production of homozygous forms in sugar beet still require additional research aimed at increasing the efficiency and reproducibility of each stage of the process.

Key words: sugar beet; haploid; doubled haploid; gynogenesis; biotechnology; *in vitro*; DH lines.

For citation: Kolesnikova E.O., Donskikh E.I., Berdnikov R.V. Haploid biotechnology as a tool for creating a selection material for sugar beets. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(8): 812-821. DOI 10.18699/VJ21.094

Введение

В связи с увеличением объемов потребления сельскохозяйственной продукции возникла острая необходимость в развитии технологий, ускоряющих селекционные процессы возделываемых культур. Сахарная свекла – одна из основных технических культур – не является исключением, поскольку потребление сахара растет с каждым годом. От общего производства сахара в мире на долю *Beta vulgaris* L. приходится значительная часть, и около 80 % полученного свекловичного сахара выпадает на долю европейских стран. Россия при этом является лидером по объемам выращивания сахарной свеклы.

Основной задачей селекции этой культуры в условиях интенсификации сельскохозяйственного производства является создание на линейной основе высокопродуктивных отечественных гибридов. Процесс получения перспективных гибридов осуществляется эффективнее при внедрении в него биотехнологического производства нового селекционного материала. Большое экономическое значение *Beta vulgaris* определяет высокий интерес к оптимизации процессов микроразмножения *in vitro*, создания гаплоидных и получения на их основе гомозиготных форм для селекционных работ. Современное агропромышленное производство должно иметь специалистов, владеющих методами биотехнологии и применяющих их с целью интенсификации производства продукции сельского хозяйства, улучшения ее качества.

Гомозиготные линии – это уникальный генетический материал для ускорения процесса создания новых гибридов и снижения его трудоемкости, для картирования популяций, использования в функциональной геномике и молекулярной селекции. Все гены гаплоидных растений представлены единственным аллелем, в связи с чем неблагоприятные рецессивные признаки могут быть выявлены на ранних стадиях селекционного процесса. На основе гаплоидов можно получать гомозиготные линии в течение 2 лет. В свою очередь классические методы при селекции на гетерозис у перекрестноопыляющихся культур позволяют достичь гомозиготности только после 6–7 лет инбридинга. Поскольку *Beta vulgaris* имеет 2-летний цикл развития, то в этом случае процесс длится в среднем 12 лет. Кроме того, для данной культуры характерны самонесовместимость, возникновение инбредной депрессии (Urazaliyev et al., 2013). На сегодняшний день производство удвоенных гаплоидов стало инструментом в программах селекции мировых исследовательских лабораторий в качестве альтернативы классическому методу получения гомозиготных линий. С пониманием важности применения такого подхода в селекции интерес к исследованиям в данном направлении неизменно возрастает (Datta, 2005). Ежегодно в мире регистрируется значитель-

ное число новых сортов растений, полученных на основе гаплоидов. До настоящего времени страны ЕС, Канада, Австралия, США и Китай были лидерами в области гаплоидных технологий (Dunwell, 2010).

Гаплоидия

Явление гаплоидии стало объектом внимания ученых с начала XX в. и на данный момент широко известно у многих покрытосеменных растений. Разработки методов экспериментальной гаплоидии начались немного позднее, когда был раскрыт потенциал применения растений с одинарным набором хромосом в создании чистых линий для нужд селекции. Существует несколько путей образования гаплоидов:

1. Опыление пыльцой растений того же вида (индукторов гаплоидов), которые классифицируются как отцовские или материнские индукторы на основе генетической конституции образующихся гаплоидов. Отцовские и материнские гаплоиды несут геном от мужского и женского родителей соответственно. При этом хромосомы-индукторы элиминируются в гаплоидных эмбриональных клетках в течение первой недели после опыления (Chaikam et al., 2019).
2. Опыление пыльцой неродственного вида, например, скрещивание пшеницы с кукурузой, что эффективно для получения гаплоидов у большинства генотипов *Triticum* spp., в том числе у трудно отзывчивых форм в культуре пыльников *in vitro*. По данным ученых, выход гаплоидных эмбрионов в отдельных скрещиваниях достигал 53 % (Джачук и др., 2019).
3. Опыление пыльцой дикорастущего родственного вида используют в селекции ячменя для получения гаплоидов при скрещивании *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum* (так называемый *bulbosum*-метод). Элиминация хромосом *H. bulbosum* происходит во время митоза и в интерфазе, сопровождается формированием микроядер и гетерохроматинизацией. Полная элиминация хроматина луковичного ячменя происходит в течение 5–9 дней после опыления. Применение технологии спасения зародышей (*embryo rescue*) обеспечивает на следующем этапе повышение эффективности метода и возможность его использования в селекции (Sahijram, Rao, 2015).
4. Опыление облученной пыльцой является хорошо задокументированным методом индукции гаплоидов огурца, которые возможно получать из разнообразного материала, такого как селекционные линии, гибриды и сорта. Гаплоидные растения генетически стабильны, однако перед дальнейшим использованием в селекции необходимо удвоить количество хромосом, что считается очень важным этапом. Технология получения удвоенных гаплоидов огурца путем опыления облученной

пыльцой считается наиболее разработанной, удобной, обеспечивающей стабильный выход ДН-линий по сравнению с технологиями получения в культуре пыльников/микроспор и неопыленных семян *in vitro* (Gałazka et al., 2015).

5. В настоящее время известны некоторые протоколы СЕННЗ-опосредованной индукции гаплоидов. Однако для сельскохозяйственных культур эффективная гаплоидная технология на основе СЕННЗ пока недоступна, за исключением кукурузы, где уровень гаплоидов достигал 3.6 % (Kelliher et al., 2016). Интенсивные исследования сосредоточены на этой цели, ожидания по применению данного подхода к сельскохозяйственным культурам высоки, тогда как создание жизнеспособных методов гаплоидизации на основе СЕННЗ является сложной задачей и массового выхода в практику пока нет (Watts et al., 2016).
6. Получение гаплоидов путем андрогенеза (на искусственной питательной среде из изолированных пыльников и микроспор) и гиногенеза (на питательной среде из изолированных семян).

При андрогенезе мужской гаметофит под влиянием индуцирующих факторов *in vitro* переходит с гаметофитного пути развития на спорофитный с образованием эмбриоида или андрогенного каллуса, из которых возможна регенерация гаплоидов либо удвоенных гаплоидов. Культурой пыльников пользуются практически все биотехнологические лаборатории селекционно-генетических компаний Европы и США (Touraev et al., 2009; Basu et al., 2010).

При культивировании пыльников чаще происходит образование каллуса. В результате дальнейшего морфогенеза из каллусных клеток регенерируют растения. Редко встречаются случаи прямого эмбриогенеза, когда из незрелых пыльцевых зерен формируются проэмбриональные структуры, развивающиеся в эмбриониды, которые дают начало гаплоидным растениям.

Более перспективным способом получения удвоенных гаплоидов является культура изолированных микроспор, которые могут быть выделены в больших количествах, обеспечивая потенциально эмбриогенные одиночные гаплоидные клетки. Эта технология достаточно проста в исполнении, экономически эффективна и дает большой выход ДН-растений при оптимизации технологии под конкретный вид и генотип. Отсутствие соматических тканей в культуре микроспор *in vitro* позволяет не ставить под сомнение происхождение полученных растений (Домблдес и др., 2019).

Несмотря на успехи, достигнутые при разработке методов андрогенеза и создании на их основе группы сортов важнейших видов зерновых культур, их эффективное применение сдерживается рядом причин, главная из которых – воспроизводимость полученных результатов в различные сезоны для разных генотипов в сочетании со снижением затрат. Проблема также состоит в довольно большом выходе бесхлорофилльных проростков, что влияет на селекционные программы за счет снижения частоты регенерации зеленых проростков (Kasha et al., 2001).

Индукция *in vitro* материнских гаплоидов (гиногенез) используется в основном у растений, для которых андро-

генез и индукция опылением неэффективны. В отличие от индуцированного партеногенеза, при гиногенезе до опыления *in vitro* вводят завязи или выделенные семяпочки, а не неполноценные зародыши из семян. При культивировании на питательных средах гаплоидные клетки зародышевого мешка образуют эмбриониды (прямой эмбриогенез) или морфогенный каллус, из которого формируется растение (непрямой эмбриогенез). На процесс индукции гиногенеза тоже влияет большое число факторов: генотип, условия выращивания донорного растения, стадия развития гаметофита, состав питательной среды, стрессовые воздействия. У растений с мужской стерильностью культивирование неопыленных семян – единственная возможность получения гаплоидов. У некоторых растений, например у ячменя и риса, индукция зеленых растений намного выше при гиногенезе по сравнению с андрогенезом. Частота случайного появления растений с одинарным набором хромосом незначительна, до 0.01 %, т.е. является редким событием и имеет ограниченное практическое значение (Bohanec, 2009; Kielkowska et al., 2014).

История развития гаплоидных технологий растений

Первое растение, идентифицированное как гаплоид, по одной из версий, было обнаружено А.Д. Bergner в 1921 г. Использовать такие растения в селекции предложили А.Ф. Blakeslee и J. Belling. Ученые получили растения с одинарным набором хромосом при попытке вызвать мутации у дурмана (*Datura stramonium* L.), применяя холод в качестве стимула. Полученный гаплоид сразу стал инновацией среди цветковых растений как спорофит, имеющий набор хромосом, характерный для гаметофита (Blakeslee et al., 1922). Позднее гаплоидная форма была идентифицирована в потомстве F₁ при скрещивании видов *Nicotiana tabacum* и *N. sylvestris*. Растение имело некоторые морфологические отличия от родительских форм, например длинные узкие листья, меньший размер цветков, стерильную пыльцу и неспособность к формированию зрелых семян, что было подтверждено цитологическим исследованием (Clausen, Mann, 1924). По данным Е.Ф. Gains, в 1925 г. было обнаружено гаплоидное растение пшеницы с 21 хромосомой вместо 42, как у родительских особей. Гаплоидная форма практически не отличалась от диплоидной, однако имела большее кущение. Явные отличия стали заметны в момент цветения и при формировании незрелых семян (Gains, Aase, 1926). Позднее в ходе исследований индукция гаплоидов у пшеницы была достигнута путем опыления растений пыльцой, подвергавшейся рентгеновскому облучению. В результате мужские гаметы были инактивированы и потеряли способность сливаться с яйцеклеткой, но стимулировали ее деление и развитие зародыша (Katayama, 1934). Исследования с применением рентгеновского облучения не дали значительных количественных результатов и представляли опасность для человека.

На начальных этапах гаплоидные формы растений создавали традиционными методами селекции при помощи отдаленной гибридизации. Так, при скрещивании *Triticum aestivum* L. и *Secale cereale* L. были получены два гаплоид-

да (Sears, 1988). Позднее появились и другие методы с использованием различных химических веществ. С развитием биотехнологических приемов создание гаплоидов стало возможным для многих растительных культур.

Гаплоидная форма *Beta vulgaris* L. впервые была выявлена шведским ученым А. Levan в теплицах селекционной станции Hilleshog компании Swedish Sugar Co, где в 1942 г. он проводил обработку растений сахарной свеклы колхицином (Levan, 1945). Собранные семена прорастали и в 1943 г. исследовали количество хромосом у полученных растений. Помимо диплоидных, триплоидных и тетраплоидных растений, было одно гаплоидное растение с числом хромосом, равным 9, в отличие от родительских форм, имевших 18 хромосом. А. Levan предположил, что обработка колхицином вызвала повреждение гамет: одно пыльцевое зерно могло стимулировать развитие эмбриона, но было не способно к оплодотворению. В своей работе автор уделил особое внимание морфологии и цитологии гаплоидного растения. По его описанию, гаплоид обладал большим количеством узких листовых пластин, имевших меньший размер в сравнении с диплоидными, триплоидными и тетраплоидными растениями. По внешним признакам гаплоид был явно слабее и ниже, чем диплоидные растения, однако образовал нормально развитые соцветия и фертильную пыльцу, которая со временем подверглась деградации. На основании цитогенетических исследований А. Levan пришел к выводу, что у гаплоидов мейоз максимально приближен к таковому у диплоидов, однако из-за отсутствия гомологичных пар хромосом весь механизм заканчивался неудачей. Дальнейшие работы в данном направлении дали возможность экспериментально получать гаплоидные формы растений с частотой, превышающей естественный уровень.

В 1964 г. сотрудники отдела ботаники Университета г. Дели (Индия) S. Guha и S.C. Maheswari опубликовали данные биохимического анализа мейоза пыльников дурмана в культуре *in vitro* (Guha, Maheswari, 1964, 1966). При культивировании зрелых пыльников на питательных средах ученые обнаружили эмбриоиды, развивающиеся из незрелых микроспор. Некоторые из эмбриоидов, регенерировавших в ходе эксперимента, превратились в нормальные проростки. В дальнейшем было установлено, что некоторые из них имели гаплоидное число хромосом. Позднее был представлен метод, с помощью которого из пыльцевых зерен *in vitro* были сформированы сотни гаплоидных растений различных видов табака. При выращивании на питательной среде часть пыльцевых зерен разрасталась в зародышевые структуры, которые, поэтапно развиваясь, были способны к обильному цветению, но не формировали семена (Nitsch J., Nitsch C., 1969). Известно также об успешном получении *in vitro* гаплоидов риса (*Oryza sativa* L.) (Niizeki, Oono, 1968), гаплоидов пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в культуре пыльников (Ouyang et al., 1973).

Начиная с 1982 г. стала известна культура изолированных микроспор, которая была более эффективна при производстве гаплоидов (Lichter, 1982). Позднее гаплоиды *Triticum aestivum* L. были произведены в культуре изолированных микроспор (Datta, Wenzel, 1987; Tuveesson, Öhlund, 1993) с помощью отдаленной гибридизации с диким яч-

менем (*Hordeum bulbosum* L.) и кукурузой (*Zea mays* L.) (Barclay, 1975; Laurie, Bennett, 1986; Inagaki, Tahir, 1990).

Извлечение пыльников из бутонов, а также последующее их вскрытие для высвобождения микроспор являлось достаточно трудоемкой процедурой, которая была усовершенствована М. Zheng в ходе создания гаплоидов и удвоенных гаплоидов из микроспор пшеницы. Разработанная технология включала в себя этапы гомогенизации, фильтрации и центрифугирования полученного образца в градиенте плотности. В результате М. Zheng удалось собрать фракцию жизнеспособных эмбрионных микроспор для культивирования на питательных средах в условиях *in vitro*, что позволило оптимизировать метод извлечения микроспор пшеницы (Zheng, 2003). Затем были опубликованы работы L. Cistué и Z. Labbani с соавторами с протоколом ДН для твердой пшеницы (Cistué et al., 2006; Labbani et al., 2007). Их главными усовершенствованиями были предобработка маннитом и использование колхицина *in vitro*.

С получением все новых данных о возможности создания гаплоидных форм высших растений *in vitro* была раскрыта ценность их применения в селекции и важность развития биотехнологических методов. К настоящему времени для многих растительных культур, таких как пшеница, тритикале, ячмень, рис, кукуруза, капуста, морковь и др., разработаны эффективные приемы, позволяющие получать гаплоидные растения для создания чистых линий.

Развитие гаплоидных биотехнологий сахарной свеклы

В 1971 г. N. Bosermark сообщил о получении пяти гаплоидов путем опыления растений пыльцой дикой свеклы и облученной пыльцой сахарной свеклы. Кроме гаплоидных форм, ему удалось создать гомозиготные диплоидные и тетраплоидные линии после обработки предварительно пророщенных семян колхицином (Bosermark, 1971). В 1983 г. стало известно о получении гаплоидов методом отдаленной гибридизации. При опылении стерильных растений сахарной свеклы пыльцой красной столовой свеклы частота возникновения гаплоидов составила 0.013 % (Seman, 1983). Данные методы были направлены на стимулирование неоплодотворенной яйцеклетки к развитию, однако показали незначительные результаты по количеству полученных гаплоидов, чего было недостаточно для масштабных селекционных работ.

Путь андрогенеза для получения гаплоидов сахарной свеклы в целом оказался неэффективным. Чаще всего на используемых минеральных средах пыльники индуцировали каллус, проэмбрионные структуры и корни, но их количество зависело от комбинации используемых ростовых веществ. По итогам исследования J. Rogozinska и M. Goska лучшей средой для дифференциации была признана среда Линсмайера и Скуга с добавлением зеатина 6-(4-окси-3-метил-транс-2-бутиламино)пурин) или зеатина и НУК (1-нафталинукусной кислоты), а добавление PFP (*n*-фторфенилаланина) увеличивало долю дифференцировки пыльников (Rogozinska, Goska, 1982). Помимо каллуса и корней, на одном пыльнике из примерно 140000 проверенных формировались вегетативные

почки, из которых были получены многочисленные диплоидные растения. Цитологические анализы показали образование многоклеточных структур, которые впоследствии вырождались. В других подобных экспериментах развивались целые растения, но их ткань чаще оказывалась диплоидной, а гаметофитное происхождение регенерантов не подтверждалось (Gürel E. et al., 2008). В недавних исследованиях были разработаны условия для прямого индуцированного андрогенеза сахарной свеклы в культуре *in vitro*. Процесс получения гаплоидов включал холодовую предобработку эксплантов, которая являлась необходимым фактором инициации перехода микроспор с гаметофитного на спорофитный путь. Для культивирования пыльников и развившихся эмбриоидов был модифицирован состав среды, который включал 2,4-Д и 6-БАП. В результате эксперимента получено от 0.15 до 1.32 % микроклонов андрогенного происхождения (Гонтаренко, Герасименко, 2018), однако это оказалось недостаточно эффективным для массового получения гаплоидных форм. Множество исследований в данном направлении давали неудовлетворительные результаты. Морфогенетический ответ при культивировании *in vitro* элементов мужской генеративной системы *B. vulgaris*, по имеющимся на сегодня сведениям, считается очень низким.

Получение гаплоидов сахарной свеклы путем культивирования неопыленных семяпочек впервые удалось D. Hoesmans и D. Bossoutrot. В своем эксперименте ученые идентифицировали 0.17 % образовавшихся гаплоидов (Hoesmans, Bossoutrot, 1983; Bossoutrot, Hoesmans, 1985). Проведенное ими дальнейшее гистологическое исследование показало, что регенерировавшие эмбриоиды могли происходить из неоплодотворенной яйцеклетки или антипода. Однако полученные гиногенетические растения демонстрировали феномен эндополиплоидии на уровне корневой меристемы, в то время как меристема побегов оставалась гаплоидной. С момента, когда стало понятно, что такой подход может быть единственным эффективным методом получения гаплоидных растений сахарной свеклы, начались многочисленные исследования *in vitro* по оптимизации данного процесса.

Интерес к гиногенезу сахарной свеклы возрастал с каждым годом, и в 1987 г. J. Van Geyt с коллегами сообщили о получении гаплоидов из семяпочек с частотой до 6.1 % (Van Geyt et al., 1987). Результаты гистологического анализа в эксперименте подтвердили, что растения происходили из гаплоидных клеток зародышевого мешка, но на кончиках корней, так же как и в исследовании D. Hoesmans и D. Bossoutrot, наблюдалась спонтанная полиплоидизация (Hoesmans, Bossoutrot, 1983; Bossoutrot, Hoesmans, 1985). По данным J. Van Geyt, форма извлеченных семяпочек имела большое значение при введении в культуру тканей. Обнаружено, что потеря эксплантом формы запятой сопровождалась гибелью яйцеклетки. Также сообщалось, что регенерация растений тормозилась образованием каллуса из материнской ткани, но после его удаления и перенесения семяпочки на новую питательную среду, содержащую древесный уголь, можно подавить его повторное появление. Дальнейшее изучение гиногенеза позволило выявить зависимость данного процесса от различных условий.

В ходе исследований M. Doctrinal было установлено, что такие факторы, как природа и концентрация используемых гормонов, температура культивирования, сезонные эффекты и генотип, имели большое значение для процесса развития гаплоидных растений (Doctrinal et al., 1989). По итогам наблюдений для инициации эмбриогенеза у неопыленных семяпочек сахарной свеклы наиболее предпочтительной была температура 27 °С, при этом сезонный эффект оказывал значительное влияние. Самая активная регенерация наблюдалась в июле. Также установлено, что гормональный состав питательных сред влиял на пути морфогенеза женского гаметофита и образования морфологических структур. Наилучшие качественные и количественные показатели гиногенного ответа у исследуемых генотипов были отмечены на питательных средах, содержащих 2.85 мкМ 3-индолилуксусной кислоты и 0.88 мкМ 6-бензиламинопурина, и на среде, содержащей 2.3 мкМ кинетина. В зависимости от генотипа при использовании данных сред было получено от 6 до 10 % жизнеспособных растений, 81 % из которых оказались гаплоидами. Исследование M. Doctrinal подтвердило перспективность получения гаплоидов сахарной свеклы путем гиногенеза. Продолжилась разработка биотехнологических приемов с учетом множества факторов, влияющих на гиногенез *Beta vulgaris* L. *in vitro*, направленных на оптимизацию условий культивирования и повышение эффективности соответствующих методов.

В работах H. Lux с коллегами отмечалось, что выход регенерантов из семяпочек снижался от самой активной регенерации в сентябре до самой низкой в январе (Lux et al., 1990). Эти данные позволили предположить, что эффективность гиногенеза имела сезонную зависимость. По мнению авторов, несмотря на трудоемкость процесса, гиногенез оказался более подходящим методом для получения гаплоидов сахарной свеклы *in vitro* как вида, не поддающегося андрогенезу. В зависимости от генотипа было получено от 0 до 13 % гаплоидных растений, при этом у 10 % растений в процессе культивирования и размножения наблюдалось спонтанное удвоение хромосом, тогда как 90 % оставались гаплоидами.

Для успешного применения гиногенеза в практических задачах большое значение имеет количество образованных гаплоидных растений. S. Gürel с соавторами подтвердили, что предварительная холодовая обработка и действие активированного угля могут увеличить частоту образования эмбрионов (Gürel S. et al., 2000). В экспериментах эмбрионы, развившиеся из яйцеклетки, формировали побеги с гаплоидным числом хромосом. Однако при разработке оптимальных условий получения гаплоидов возникала проблема генотипической зависимости ответа на условия культивирования. Выход полученных эмбриоидов различался у линий сахарной свеклы, так же как и реакция развитых микроклонов на разные условия роста. Генотипические различия в реакции на условия культивирования являются серьезной проблемой не только в культуре семяпочек (Hansen et al., 1995), но и в работе с другими тканями сахарной свеклы (Mikami et al., 1989; Gürel E., 1997), поэтому состав питательной среды, а также условия культивирования рекомендовано подбирать для каждого генотипа индивидуально.

Исследования многих ученых свидетельствовали о важности предварительной холодовой обработки материала для увеличения скорости гиногенеза *B. vulgaris* (Lux et al., 1990; Gürel S. et al., 2000; Svirshchevskaya, Dolezel, 2000; Pazuki et al., 2018a). Н. Lux с коллегами показали, что обработка холодом (4 °С) в течение четырех-пяти дней была способна значительно повысить скорость гиногенеза сахарной свеклы. Увеличение срока холодового воздействия на соцветия свыше одной недели снижало гиногенный ответ семяпочек, в то время как предварительная холодовая обработка в течение семи дней и использование БАП в концентрации 1 мг/л оказывали стимулирующий эффект при переключении развития эксплантов с гаметофитного на спорофитный путь. Подчеркивалось, что влияние сезона и генотипа на скорость регенерации было значительным. Помимо холодовой предобработки, регенерация повышалась при смещении спектра светового облучения, используемого при культивировании семяпочек в условиях термального помещения, в сторону красного участка спектра (D'Halluin, Keimer, 1986).

Е. Weich и М. Levall (2003) предложили протокол для получения удвоенных гаплоидов сахарной свеклы, в котором были рассмотрены все стадии создания селекционного материала: выращивание донорских растений, сбор соцветий, поверхностная стерилизация материала, выделение семяпочек, культивирование гаплоидных эмбрионов, размножение гаплоидов, получение удвоенных гаплоидов, их укоренение, перенос в тепличные условия и акклиматизация. Описаны условия проведения каждого этапа, даны рекомендации по манипуляциям с растительным материалом, приведены составы оптимальных питательных сред. Протокол носил рекомендательный характер, в связи с разнообразием генотипического ответа на условия культивирования он должен быть модифицирован под различные генотипы сахарной свеклы.

Для эффективного получения гаплоидов М. Tomaszewska-Sowa описала двухэтапный процесс культивирования, в котором экспланты представляли собой неопыленные семяпочки, выделенные после стерилизации из бутонов генеративных побегов растений сахарной свеклы. Репродуктивные структуры выдерживали в жидкой питательной среде в течение 12 недель (Tomaszewska-Sowa et al., 2017). Регенерировавшие экспланты переносили на твердую питательную среду с модифицированным составом, после наблюдали образование побегов. Было установлено, что органогенез семяпочек при двухфазном методе был не прямым, а проходил через формирование каллусной ткани. Эффективность регенерации зависела от типа и происхождения экспланта. Процессы дифференцировки в соматических эмбриоидах усиливались наличием 6-БАП и 2,4-Д в среде, что в свою очередь увеличивало количество образовавшихся специализированных тканевых структур.

Соотношение гормонов в субстрате оказывает основное влияние на пути развития эмбриональной структуры. В настоящее время протоколы получения гаплоидов сахарной свеклы требуют дальнейших разработок и совершенствования, поэтому исследования по подбору оптимального состава сред и поиску других стимулирующих гиногенез факторов все еще продолжаются.

Этапы создания гомозиготного материала *in vitro*

Отбор родительских форм

Итак, первой стадией, с которой начинается работа по введению растительного материала *in vitro*, можно считать выбор донорских растений. Для снижения уровня инфицированности эксплантов сбор соцветий надо осуществлять в сухую погоду, при длительном отсутствии осадков. Процедуру лучше проводить в начале периода цветения. В зависимости от региона произрастания это может быть май–июль. Собранные соцветия каждого генотипа помещают в пластиковые пакеты, маркируют и хранят в холоде до этапа стерилизации растительного материала в условиях лаборатории.

Стерилизация материала

при введении семяпочек *in vitro*

Растения легко поражаются различными эпифитными и эндофитными микроорганизмами и вирусами. Именно поэтому стадией, определяющей успех процесса введения материала *in vitro*, является качественная стерилизация исходного материала. Ранее разработанные методики стерилизации эксплантов с применением ряда ртутьсодержащих препаратов (сулемы, диоксида, мертиолята) были признаны эффективными (Гранда, 2009), но очень токсичными как для человека, так и для растений. Со временем они были вытеснены приемами с использованием других веществ. Для поверхностной стерилизации растительные ткани могут быть обработаны хлорсодержащими веществами (гипохлорит кальция или натрия, хлорная известь, хлорамин), перекисью водорода, этиловым спиртом. О. Jones предлагал для стерилизации растворы, содержащие в качестве дезинфицирующего вещества гипохлорит натрия (Domestos) (Jones et al., 1979). Е. Weich и М. Levall в своей работе использовали для стерилизации коммерческое средство Klorin или 3 % гипохлорит натрия. После стерилизации материал тщательно промывали бидистиллированной водой и хранили в холодильнике при 8 ± 2 °С (Weich, Levall, 2003). При выборе способа стерилизации необходимо учитывать как ее эффективность против бактериальной и грибковой инфекции, так и предотвращение повреждения растительных тканей. Применение новых стерилизующих веществ повышает вероятность эффективного процесса стерилизации эксплантов.

Введение семяпочек в культуру *in vitro*

К настоящему времени, несмотря на появление высокотехнологичных аппаратов и устройств, облегчающих некоторые манипуляции в лабораториях, создание гаплоидного материала зависит от тонкой ручной работы оператора. Процесс извлечения семяпочек сахарной свеклы при введении в культуру *in vitro* подробно описан А. Pazuki с соавторами (Pazuki et al., 2018b). Ученые проводили данную процедуру в стерильных условиях под стереомикроскопом с помощью пинцетов и скальпеля. Первый закрытый и последующие бутоны вскрывали в направлении к верхушке соцветия, вносили в чашки Петри, содер-

жащие питательную среду. Культивирование проводили при температуре 27 ± 2 °C с 18-часовым фотопериодом. Регенерировавшие семяпочки переносили на MS среду пролиферации и размножения, содержащую 0.2 мг/л кинетин, 10 г/л сахарозы. В связи с различной реакцией генотипов состав питательных сред и условия культивирования могут быть различны для каждого генотипа на всех этапах создания селекционного материала. Регенерация семяпочек может начаться уже через две-три недели после введения. Развившиеся полноценные микроклоны в дальнейшем поддерживают в культуре *in vitro*.

Определение плоидности полученного регенеранта

Фенотипически гаплоидные растения отличаются от диплоидных высотой, размером и количеством органов, более узкими листовыми пластинами, однако визуальное определение плоидности не дает точных результатов. После формирования из неопыленных семяпочек нормально развитых регенерантов проводят проверку их плоидности, так как есть вероятность получения проростков, произошедших из соматических клеток, имеющих диплоидный или миксоплоидный хромосомный набор.

Одним из надежных способов определения плоидности является подсчет хромосом, находящихся в стадии митоза активно растущих тканей (зоны роста корня или молодых листьев). Метод трудоемкий и требует продолжительной подготовки. Процесс подсчета хромосом в клетках сахарной свеклы подробно описан в работе (Pazuki et al., 2018a). Молодые листья проростков *in vitro* обрабатывали 3 ч раствором 8-гидроксихинолина (0.002 М) с последующей фиксацией в свежеприготовленном растворе 96 % этанола и соляной кислоты (2:1). После этого их промывали и хранили в дистиллированной воде. Далее небольшой кусочек листовой ткани переносили в каплю 3 % орсеина в 45 % уксусной кислоте на предметное стекло и раздавливали его под покровным стеклом. Затем проводили подсчет хромосом под световым микроскопом.

Альтернативой трудоемкому подсчету хромосом под микроскопом стала проточная цитометрия клеточных ядер; это более удобный и быстрый способ определения плоидности. Данный аппаратный метод основан на измерении количества ДНК в ядрах клеток в режиме поштучного анализа в потоке жидкости по сигналам светорассеяния и флуоресценции, обладает высокой точностью и производительностью (Galbraith, 2010). Метод проточной цитометрии позволяет в короткие сроки определить плоидность микроклонов без нанесения значительных повреждений исследуемым растениям, что имеет важное значение при работе с ограниченным объемом регенерировавшего материала.

Удвоение числа хромосом

Основной целью индукции гиногенеза является получение гаплоидов для создания чистых линий. Для этого на следующем этапе у нормально развитых гаплоидов число хромосом должно быть удвоено *in vitro* или *in vivo* методами. А. Hansen с коллегами изучили эффективность антимиотических агентов непосредственно в культуре семяпочек сахарной свеклы (Hansen et al., 1998). По

результатам эксперимента амипрофосметил показал относительно низкую токсичность в отношении зародыша и способствовал получению в среднем 4.7 диплоидного растения на 100 введенных эксплантов. По мнению S. Gürel, самым эффективным методом создания удвоенных гаплоидов является обработка растений антимиотическими агентами, такими как колхицин, оризалин, трифлуралин, или непродолжительное культивирование побегов на питательных средах, содержащих перечисленные вещества. Колхицин – наиболее часто применяемый алкалоид, который способен ингибировать образование веретена деления на стадии профазы и останавливать расхождение хромосом к полюсам дочерних клеток. Нарушение данного процесса приводит к удвоению числа хромосом в материнской клетке. В исследованиях было показано, что обработка гаплоидов колхицином и трифлуралином дает схожие результаты, причем оба агента были более эффективны при применении в форме жидких растворов, чем при добавлении их в агаризованную среду (Gürel S. et al., 2000). Для успешной диплоидизации ученые погружали подросшие гаплоиды в жидкую MS среду, содержащую 150 мг/л антимиотического агента (колхицина), 1 мг/л БАП и 3 % сахарозы, на 48 ч при температуре 27 °C. После обработки побеги промывали стерильной дистиллированной водой и переносили на твердую питательную среду MS с добавлением 1 мг/л БАП. Число растений с удвоенным хромосомным набором достигало 29.1 %.

E. Weich и M. Levall (2003) для получения ДН-растений выдерживали гаплоидные растения с корнями, у которых удалили кончики, в течение 5 ч в растворе 0.2 % колхицина и 0.25 % ДМСО. Подобный прием использовали с 0.3 % раствором колхицина, в который регенеранты погружали корневой системой на 24 ч, а затем высаживали в почвенную смесь. При этом 19 % обработанных гаплоидных растений удвоили набор хромосом (Svirshchevskaya, Dolezel, 2000). Также сообщалось, что нанесение 0.1 % раствора колхицина с 2 % ДМСО на меристему гаплоидов сахарной свеклы один раз в день в течение трех дней приводило к удвоению набора хромосом (D'Halluin, Keimer, 1986). M. Ragot и P. Steen (1992) помещали ватный тампон, смоченный раствором 0.2 % колхицина, на три дня на верхушечные почки гаплоидных растений в горшках, получая в итоге до 50 % удвоенных гаплоидов.

Следует заметить, что после обработки гаплоидов антимиотическими агентами через некоторое время требуется повторный анализ плоидности микроклонов и тщательный отбор полученных удвоенных гаплоидов из всего объема экспериментального материала.

В современных селекционных программах для определения ценных сельскохозяйственных свойств полученных форм дополнительно используют молекулярно-генетические методы, направленные на выявление генов устойчивости к стрессам, идентификацию целевых аллелей, отвечающих за кодирование конкретного признака. Это позволяет значительно сократить селекционный процесс и аккумулировать желаемые аллели в одном генотипе. Главным методом молекулярной селекции стал маркеропосредованный отбор (marker assisted selection, MAS), который широко применяется в селекции множества сель-

скохозяйственных культур (Muranty et al., 2014). Генетические маркеры могут быть использованы на различных стадиях биотехнологического процесса и селекционных программ в целях отбора перспективных генотипов.

Укоренение удвоенных гаплоидов и получение штеклингов

Следующим этапом является укоренение удвоенных гаплоидов *in vitro* с целью повышения их выживаемости при адаптации к условиям закрытого грунта. В период подготовки растений к высадке в условия закрытого грунта можно также столкнуться с низкой частотой образования корней. Ризогенез *in vitro* могут задерживать яркое освещение, необходимое зеленой части микроклонов, высокая концентрация солей и углеводов, наличие гормонов и низкая концентрация кислорода в питательной среде. В связи с различным генотипическим ответом поиск оптимального состава питательного субстрата и условий культивирования микроклонов продолжается.

Нормально развитые ДН-микроклоны с корневой системой высаживают в условия закрытого грунта. В связи с пересадкой из условий *in vitro* этап адаптации высаженных растений длится до четырех недель, в это время в тепличном помещении постепенно снижают влажность воздуха. В последующем, через два-три месяца доращивания, формируются штеклинги и растения будут готовы к уборке. Биотехнологический цикл создания нового гомозиготного материала завершается этапом искусственной яровизации штеклингов в условиях пониженных температур. После этого гомозиготный материал направляют на дальнейшие этапы селекционного процесса – высаживают в опытные полевые условия с целью выращивания цветочных растений и проведения скрещиваний.

Заключение

Благодаря внедрению биотехнологий, процесс создания новых гибридов сахарной свеклы может быть значительно ускорен. Получение удвоенных гаплоидов позволяет существенно сократить время и ресурсы, затрачиваемые на создание чистых линий. Наиболее успешным методом получения гаплоидов *Beta vulgaris* L. признан метод индуцированного гиногенеза – культивирование неопыленных семян *in vitro* с последующим формированием растений с гаплоидным набором хромосом. Для создания ДН-линий применяют удвоение числа хромосом гаплоидов с использованием антимиотических агентов, контроль пloidности созданного материала, выращивание микроклонов в тепличных условиях. Биотехнологический этап завершается получением штеклингов растений удвоенных гаплоидов.

Процессы в культуре тканей сахарной свеклы, в частности индукция Н- и ДН-форм, все еще требуют проведения дополнительных научных исследований. Анализ научной литературы показывает, что для максимального увеличения эффективности и воспроизводимости надо более детально изучать производство удвоенных гаплоидов *Beta vulgaris* L. и улучшать его с применением новых подходов. Биотехнологическим лабораториям необходимо иметь возможность получать гаплоиды в большом количестве. Поэтому требуют повышения эффективности

приемы культивирования эксплантов, диплоидизации, укоренения, адаптации регенерантов при пересадке из стерильных условий *in vitro* в грунт. Совершенствование каждой стадии процесса до сих пор остается актуальной задачей, конечной целью при этом станет повышение качества и объемов выхода готового гомозиготного материала.

Список литературы / References

- Гонтаренко С.Н., Герасименко А.Н. Прямой индуцированный андрогенез в культуре *in vitro* сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). *Plant Varieties Studying and Protection*. 2018;14(4):375-381. DOI 10.21498/2518-1017.14.4.2018.151900.
[Hontarenko S.M., Herasymenko H.M. Direct induced androgenesis in culture *in vitro* in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant Varieties Studying and Protection*. 2018;14(4):375-381. DOI 10.21498/2518-1017.14.4.2018.151900. (in Ukrainian)]
- Гранда Х.Р.К. Микроклональное размножение хризантем. *Изв. Тумирязев. с.-х. академии*. 2009;1:145-148.
[Granda H.R.K. Micropropagation of chrysanthemums. *Izvestiya Timiryazevskoy Selskokhozyaystvennoy Akademii = Bulletin of the Timiryazev Agricultural Academy*. 2009;1:145-148. (in Russian)]
- Джачук Т.И., Акинина В.Н., Хомякова О.В., Калашникова Е.В. Отдаленная гибридизация как метод получения гаплоидных растений у злаков. *Биотехнология и селекция растений*. 2019; 2(2):44-52. DOI 10.30901/2658-6266-2019-2-44-52.
[Djatchouk T.I., Akinina V.N., Khomyakova O.V., Kalashnikova E.V. Distant hybridization as a method of haploid production in cereals. *Biotechnologiya i Seletsiya Rastenii = Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(2):44-52. DOI 10.30901/2658-6266-2019-2-44-52. (in Russian)]
- Домблидес Е.А., Белов С.Н., Солдатенко А.В., Пивоваров В.Ф. Получение удвоенных гаплоидов огурца (*Cucumis sativus* L.). *Овощи России*. 2019;5:3-14. DOI 10.18619/2072-9146-2019-5-3-14.
[Domblides E.A., Belov S.N., Soldatenko A.V., Pivovarov V.F. Production of doubled haploids in cucumber. *Ovoshchi Rossii = Vegetable Crops of Russia*. 2019;5:3-14. DOI 10.18619/2072-9146-2019-5-3-14. (in Russian)]
- Barclay I.R. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. *Nature*. 1975;256: 410-411.
- Basu S.K., Eudes F., Kovalchuk I. Role of recA/RAD51 gene family in homologous recombination repair and genetic engineering of transgenic plants. In: Kumar A., Sopory S. (Eds.) *Applications of Plant Biotechnology: In vitro propagation, plant transformation and secondary metabolite production*. Ch. 12. India, New Delhi: I K Int. Publ. House Pvt. Ltd., 2010;231-255.
- Blakeslee A.F., Belling J., Farnham M.E., Bergner A.D. A haploid mutant in the Jimson Weed, "*Datura stramonium*". *Science*. 1922; 55(1433):646-647. DOI 10.1126/science.55.1433.646.
- Bohanec B. Doubled haploids *via* gynogenesis. In: Touraev A., Foster B.P., Jain E.M. (Eds.) *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Dordrecht: Springer Science + Business Media BV, 2009; 35-46. DOI 10.1007/978-1-4020-8854-4.
- Bosemark N.O. Haploids and homozygous diploids, triploids and tetraploids in sugar beet. *Hereditas*. 1971;69(2):193-204. DOI 10.1111/j.1601-5223.1971.tb02433.x.
- Bossoutrot D., Hosemans D. Gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: from *in vitro* culture of unpollinated ovules to the production of doubled haploid plants in soil. *Plant Cell Rep*. 1985;4:300-303. DOI 10.1007/BF00269883.
- Chaikam V., Molenaar W., Melchinger A.E., Boddupalli P.M. Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects. *Theor. Appl. Genet*. 2019;132:3227-3243. DOI 10.1007/s00122-019-03433-x.

- Cistué L., Soriano M., Castillo A.M., Vallés M.P., Sanz J.M., Echarri B. Production of doubled haploid in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep.* 2006;25(4):257-264. DOI 10.1007/s00299-005-0047-8.
- Clausen R.E., Mann M.C. Inheritance in *Nicotiana tabacum*: V. The occurrence of haploid plants in interspecific progenies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1924;10(4):121-124. DOI 10.1073/pnas.10.4.121.
- Datta S.K. Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement. *Curr. Sci.* 2005;89(11):1870-1878. DOI 10.1007/978-94-017-1203-319.
- Datta S.K., Wenzel G. Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis in *Triticum aestivum* L. *Plant Sci.* 1987;48:49-54.
- D'Halluin K., Keimer B. Production of haploid sugarbeets (*Beta vulgaris* L.) by ovule culture. In: Horn W., Jensen C.J., Odenbach W., Schieder O. (Eds.) Genetic Manipulation in Plant Breeding. Berlin: Walter de Gruyter & Co., 1986;307-309.
- Doctrinal M., Sangwan R.S., Sangwan-Norree B.S. *In vitro* gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1989;17:1-12. DOI 10.1007/BF00042276.
- Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploration. *Plant Biotechnol. J.* 2010;8(4):377-424. DOI 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x.
- Gains E.F., Aase H.C. A haploid wheat plant. *Am. J. Bot.* 1926;13(6):373-385.
- Gałazka J., Słomnicka R., Góral-Radziszewska K., Niemirowicz-Szczytt K. From pollination to DH lines – verification and optimization of protocol for production of doubled haploids in cucumber. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus.* 2015;14(3):81-92.
- Galbraith D.W. Flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting in plants: the past, present, and future. *Biomédica.* 2010;30(Suppl.):65-70. DOI 10.7705/biomedica.v30i0.824.
- Guha S., Maheshwari S. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature.* 1964;204:497. DOI 10.1038/204497a0.
- Guha S., Maheshwari S. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* *in vitro*. *Nature.* 1966;212:97-98. DOI 10.1038/212097a0.
- Gürel E. Callus and root development from leaf explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): variability at variety, plant and organ level. *Turk. J. Botany.* 1997;21:131-136.
- Gürel E., Gürel S., Lemaux P.G. Biotechnology applications for sugar beet. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2008;27(2):108-140. DOI 10.1080/07352680802202000.
- Gürel S., Gürel E., Kaya Z. Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Rep.* 2000;19(12):1155-1159. DOI 10.1007/s002990000248.
- Hansen A.L., Gertz A., Joersbo M., Andersen S.B. Short-duration colchicine treatment for *in vitro* chromosome doubling during ovule culture of *Beta vulgaris* L. *Plant Breed.* 1995;114(6):515-519. DOI 10.1111/j.1439-0523.1995.tb00847.x.
- Hansen A.L., Gertz A., Joersbo M., Andersen S.B. Antimicrotubule herbicides for *in vitro* chromosome doubling in *Beta vulgaris* L. ovule culture. *Euphytica.* 1998;101(2):231-237. DOI 10.1023/a:1018380103304.
- Hosemans D., Bossoutrot D. Induction of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated beet (*Beta vulgaris* L.). *Z. Pflanzenzücht.* 1983;91(1):74-77.
- Inagaki M.N., Tahir M. Comparison of haploid production frequencies in wheat varieties crossed with *Hordeum bulbosum* L. and maize. *Jpn. J. Breed.* 1990;40(2):209-216. DOI 10.1270/jsbbs1951.40.209.
- Jones O.P., Pontikis C.A., Hopgood M.E. Propagation *in vitro* of five apple scion cultivars. *J. Hortic. Sci.* 1979;54(2):155-158. DOI 10.1080/00221589.1979.11514863.
- Kasha K.J., Simion E., Oro R., Yao Q.A., Hu T.C., Carlson A.R. An improved *in vitro* technique for isolated microspore culture of barley. *Euphytica.* 2001;120:379-385. DOI 10.1023/A:1017564100823.
- Katayama Y. Haploid formation by X-rays in *Triticum monococcum*. *Cytologia.* 1934;5(2):235-237.
- Kelliher T., Starr D., Wang W., McCuiston J., Zhong H., Nuccio M.L., Martin B. Maternal haploids are preferentially induced by CENH3-tailswap transgenic complementation in maize. *Front. Plant Sci.* 2016;7:414. DOI 10.3389/fpls.2016.00414.
- Kielkowska A., Adamus A., Baranski R. An improved protocol for carrot haploid and doubled haploid plant production using induced parthenogenesis and ovule excision *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2014;50(3):376-383. DOI 10.1007/s11627-014-9597-1.
- Labbani Z., Buysier J.D., Picard E. Effect of mannitol pretreatment to improve green regeneration on isolated microspore culture in *Triticum turgidum* ssp. *durum* cv. 'Jannah Khetifa'. *Plant Breed.* 2007;126(6):565-568. DOI 10.1111/j.1439-0523.2007.01399.x.
- Laurie D.A., Bennett M.D. Wheat × maize hybridization. *Can. J. Genet. Cytol.* 1986;28(2):313-316. DOI 10.1139/g86-046.
- Levan A. A haploid sugar beet after colchicine treatment. *Hereditas.* 1945;31:399-410. DOI 10.1111/j.1601-5223.1945.tb02760.x.
- Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenphysiol.* 1982;105(5):427-434. DOI 10.1016/S0044-328X(82)80040-8.
- Lux H., Herrmann L., Wetzel C. Production of haploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by culturing unpollinated ovules. *Plant Breed.* 1990;104:177-183. DOI 10.1111/j.1439-0523.1990.tb00420.x.
- Mikami T., Sudoh R., Nagao E., Kinoshita T. Genotypic variation in the *in vitro* morphogenesis from leaf explants of *Beta vulgaris* L. and *Beta maritima* L. *Euphytica.* 1989;40:271-273. DOI 10.1007/BF00024523.
- Muranty H., Jorje V., Bastien C., Lepoittevin C., Bouffier L., Sanchez L. Potential for marker-assisted selection for forest tree breeding: lessons from 20 years of MAS in crops. *Tree Genet. Genomes.* 2014;10:1491-1510. DOI 10.1007/s11295-014-0790-5.
- Niizeki H., Oono K. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc. Jpn. Acad.* 1968;44(6):554-557. DOI 10.2183/pjab1945.44.554.
- Nitsch J.P., Nitsch C. Haploid plants from pollen grains. *Science.* 1969;163(3862):85-87. DOI 10.1126/science.163.3862.85.
- Ouyang Y.W., Hu C.C., Chuang C.C., Tseng C.C. Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. *Sci. Sin.* 1973;16:79-95.
- Pazuki A., Aflaki F., Gürel E., Ergül A., Gürel S. Gynogenesis induction in sugar beet (*Beta vulgaris*) improved by 6-benzylaminopurine (BAP) and synergized with cold pretreatment. *Sugar Tech.* 2018a;20:69-77. DOI 10.1007/s12355-017-0522-x.
- Pazuki A., Aflaki F., Gürel S., Ergül A., Gürel E. Production of doubled haploids in sugar beet (*Beta vulgaris*): an efficient method by a multivariate experiment. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2018b;132(1):85-97. DOI 10.1007/s11240-017-1313-5.
- Ragot M., Steen P. Genetic and environmental effects on chromosome doubling of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) haploids. *Euphytica.* 1992;63:233-237. DOI 10.1007/BF00024549.
- Rogozinska J.H., Goska M. Attempts to induce haploids in anther culture of sugar, fodder and wild species of beet. *Acta Soc. Bot. Pol.* 1982;51(1):91-105.
- Sahijram S., Rao B.M. (Eds.) Hybrid Embryo Rescue in Crop Improvement. Plant Biology and Biotechnology. Division of Biotechnology, Indian Institute of Horticultural Research (IIHR). India: Bangalore, 2015;2:363-383. DOI 10.1007/978-810322-2283-5_18.
- Sears E.R. History of Chinese Spring aneuploids. In: Proc. 7th Int. Wheat Genetics Symp. 1988;1:4-6.
- Seman I. Possibilities of detection and induction of haploids in *Beta vulgaris* L. *Biologia (Bratislava).* 1983;38(11):1113-1122.
- Svirshchevskaya A.M., Dolezel F.J. Production and performance of gynogenetic sugarbeet lines. *J. Sugar Beet Res.* 2000;37(4):117-133. DOI 10.5274/jsbr.37.4.117.
- Tomaszewska-Sowa M., Figas A.S., Gatz A. Histological analysis of organogenesis and somatic embryogenesis during shoot formation

- in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) via gynogenesis. *Polish J. Nat. Sci.* 2017;32(4):705-717.
- Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (Eds.) *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Dordrecht: Springer Science + Business Media BV, 2009;347. DOI 10.1007/978-1-4020-8854-4.
- Turesson I.K.D., Öhlund R.C.V. Plant regeneration through culture of isolated microspores of *Triticum aestivum* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1993;34:163-167.
- Urazaliyev K.R., Orsini J.M., Abekova A.M., Bazylova T.A., Daniyarova A.K. Speeding wheat breeding using dihaploids obtained by microspore culture. *Vestnik KazNU. Seriya Ekologicheskaya = Bulletin of the KNU: Environmental Series.* 2013;38(2/2):369-374.
- Van Geyt J., Speckmann G.J., D'Halluin K., Jacobs M. *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 1987;73(6):920-925. DOI 10.1007/BF00289399.
- Watts A., Kumar V., Bhat S.R. Centromeric histone H3 protein: from basic study to plant breeding applications. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 2016;25:339-348. DOI 10.1007/s13562-016-0368-4.
- Weich E.W., Levall M.W. Doubled haploid production of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). In: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (Eds.) *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. New York: Springer Science + Business Media, 2003;255-263. DOI 10.1007/978-94-017-1293-4_38.
- Zheng M.Y. Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*) – doubled haploid production via induced embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2003;73:213-230. DOI 10.1023/A:1023076213639.

ORCID ID

E.O. Kolesnikova orcid.org/0000-0002-7926-5129

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.05.2021. После доработки 30.09.2021. Принята к публикации 08.10.2021.