


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

Методические подходы создания удвоенных гаплоидов сахарной и столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.)

Т.Р. Григолова , А.В. Вишнякова, А.А. Сеницына, А.В. Воронина, О.Н. Зубко, О.В. Зудова, С.Г. Монахос

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия
 grigolava1@gmail.com

Аннотация. Производство удвоенных гаплоидов *in vitro* – актуальный биотехнологический способ ускоренного создания родительских линий для селекции гибридов F1. В отличие от классического инбридинга время создания гомозиготных линий свеклы (*Beta vulgaris*) с помощью технологии удвоенных гаплоидов сокращается с пяти–шести до двух поколений. Гиногенез является наиболее распространенным биотехнологическим методом производства удвоенных гаплоидов сахарной и столовой свеклы. Протоколы производства удвоенных гаплоидов для видов *B. vulgaris* немногочисленны и разработаны в основном для сахарной свеклы (*B. vulgaris* convar. *saccharifera* Alef.). Наибольший успех достигнут в производстве удвоенных гаплоидов сахарной свеклы гиногенезом в культуре изолированных семязачатков. Для столовой свеклы (*B. vulgaris* convar. *esculenta* Salisb.) проведены единичные исследования с показанной низкой эффективностью производства гаплоидных растений андро- и гиногенезом. В итоге протоколы производства удвоенных гаплоидов столовой свеклы отсутствуют, а протоколы, разработанные для сахарной свеклы, неэффективны для столовой, несмотря на принадлежность к одному виду. Исследования производства удвоенных гаплоидов путем андрогенеза у представителей рода *Beta* активно проводились в 70–80-х гг. прошлого столетия и не закончились получением растений-регенерантов, однако в настоящее время среди ученых снова возник интерес к данному методу и в разных странах возобновлены работы по изучению андрогенеза у представителей рода *Beta*. Статья содержит обзор исследований, посвященных созданию удвоенных гаплоидов; обсуждение подходов решения основных проблем при получении удвоенных гаплоидов и методов, позволяющих повысить выход эмбрионидов и растений-регенерантов, а также удвоенных гаплоидов у растений вида *B. vulgaris*.
Ключевые слова: *Beta vulgaris*; гаплоидные технологии; гиногенез; культура микроспор; эмбриогенез; удвоенные гаплоиды.

Для цитирования: Григолова Т.Р., Вишнякова А.В., Сеницына А.А., Воронина А.В., Зубко О.Н., Зудова О.В., Монахос С.Г. Методические подходы создания удвоенных гаплоидов сахарной и столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(3):276–283. DOI 10.18699/VJ21.031

Methodological approaches for producing doubled haploids in sugar beet and red beet (*Beta vulgaris* L.)

T.R. Grigolava , A.V. Vishnyakova, A.A. Sinitsyna, A.V. Voronina, O.N. Zubko, O.V. Zudova, S.G. Monakhos

Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia
 grigolava1@gmail.com

Abstract. The *in vitro* production of doubled haploids is a biotechnological path of an accelerated development of parental lines in F1-hybrid breeding programs. Unlike the traditional inbreeding method requiring 5 to 6 generations to reach a sufficient homozygosity of lines, the number of generations to produce pure lines of beet by haploid technologies is reduced to 2. The production of doubled haploids by gynogenesis is the most common biotechnological approach in sugar and red beets. Protocols for the production of doubled haploids for *B. vulgaris* species are few and have been developed mainly for sugar beets. There are no protocols for the production of doubled haploids for red beet (*B. vulgaris* convar. *esculenta* Salisb.), and the protocols developed for sugar beet (*B. vulgaris* convar. *saccharifera* Alef.) are ineffective for red beet, even though these two crops belong to the same species. The greatest success has been achieved in the production of doubled haploids by gynogenesis through isolated ovule culture, especially in sugar beet. Studies on the production of doubled haploids by androgenesis were actively carried out in the 1970s and 1980s and did not lead to the production of regenerated plants. However, at present, there is renewed interest among researchers in this approach, and scientists in different countries are conducting studies of *Beta vulgaris* androgenesis through isolated microspore culture. This article provides an overview of studies devoted to the production of doubled haploids, addressing the main problems of doubled haploid technologies, and methods to increase the frequency of embryogenesis and doubled haploid plant formation in *B. vulgaris* crops.
Key words: *Beta vulgaris*; haploid technology; gynogenesis; microspore culture; embryogenesis; doubled haploids.

For citation: Grigolava T.R., Vishnyakova A.V., Sinitsyna A.A., Voronina A.V., Zubko O.N., Zudova O.V., Monakhos S.G. Methodological approaches for producing doubled haploids in sugar beet and red beet (*Beta vulgaris* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(3):276–283. DOI 10.18699/VJ21.031

Введение

Представители вида *B. vulgaris* относятся к ценным овощным (свекла столовая), кормовым (свекла кормовая) и техническим (свекла сахарная) культурам. В настоящее время основным направлением селекции большинства сельскохозяйственных растений является создание гетерозисных гибридов F1 на основе подбора и скрещивания гомозиготных родительских линий. Традиционный метод создания гомозиготных линий для двулетней культуры свеклы – самоопыление и отбор на протяжении минимум 4–6 поколений, что требует 8–12 лет (De La Fuente et al., 2013). Длительное время получения родительских линий – один из существенных недостатков селекции гибридов F1. Технологии производства удвоенных гаплоидов позволяют сократить процесс создания чистых линий свеклы до 3–5 лет (Zhuzhzhhalova et al., 2020). Существенное преимущество технологии производства удвоенных гаплоидов – возможность добиться полной гомозиготности в одном поколении. Еще одно преимущество гаплоидных технологий – проявление рецессивных аллелей у гаплоидных растений, замаскированных в гетерозиготном состоянии у диплоидных растений, что облегчает выявление, оценку и отбор растений с полезными признаками (Doctrinal et al., 1989; Klimek-Chodacka, Baranski, 2013).

Удвоенные гаплоиды сельскохозяйственных растений производят *in vivo* путем партеногенеза или *in vitro* в культуре изолированных микроспор, пыльников, неоплодотворенных семязачатков и др. (Palmer, Keller, 2005). Среди способов производства удвоенных гаплоидов *B. vulgaris*, в частности свеклы сахарной, наиболее распространена технология культивирования неоплодотворенных семязачатков (гиногенез).

Гиногенез – достаточно простая, но трудоемкая технология с выходом эмбриоидов у наиболее отзывчивых генотипов до 15 штук на 100 культивируемых семязачатков сахарной свеклы (Wremmerth, Levall, 2003). Кроме того, не исключено появление клонов материнского растения из соматических клеток, окружающих зародышевый мешок, что делает необходимым разработку оперативных методов дифференциации гомо- и гетерозигот с отбором первых среди растений-регенерантов. Технология изолированных микроспор позволила бы избежать необходимость генетического анализа, т. к. андрогенные растения-регенеранты, полученные из изолированных микроспор, априори имеют гаплоидный статус.

Технология культивирования изолированных микроспор и микроспор в пыльниках свеклы долгое время считалась неэффективной, и исследователям удавалось получить лишь каллус или проэмбриоидные структуры без дальнейшей регенерации либо соматические клоны (Banba, Tanabe, 1972; Goska, Rogozinska, 1981; Van Geyt et al., 1985; Herrmann, Lux, 1988a). В 2017 г. польские исследователи получили эмбриониды свеклы столовой в культуре изолированных микроспор и пыльников, однако неукорененные розетки листьев погибли (Gorecka et al., 2017).

Цель обзора – обобщить данные о различных подходах производства удвоенных гаплоидов культур вида *B. vulgaris*, обозначить основные проблемы и пути их решения.

Развитие технологий производства удвоенных гаплоидов у рода *Beta*

Первые гаплоиды сахарной свеклы обнаружил в 1945 г. А. Levan (1945), позже об аналогичных открытиях сообщали К. Zimmermann (1953), Н.Е. Fischer (1956), Th. Butterfass (1959), А. Kruse (1961) и В.Л. Hammond (1966). Гаплоиды были выделены из четырех видов материала: 1) потомство растений, обработанных полиплоидизирующими агентами; 2) потомство, полученное из семян ди- или анизоплоидных сортов; 3) потомство, полученное вегетативным размножением диплоидных, цитоплазматически мужскистерильных растений; 4) из растений анизоплоидной сахарной свеклы.

Работа по экспериментальному получению гаплоидов сахарной свеклы начата Н. Bosermark (1971): при опылении стерильных диплоидных растений свеклы пыльцой тетраплоидных растений в потомстве ученый обнаружил около 0.2 % гаплоидов. К попыткам производства гаплоидов с помощью отдаленной гибридизации вернулись в 1983 г. в Чехословакии: I. Seman скрещивал мужскистерильные растения свеклы сахарной со свеклой салатной, выход гаплоидов составил 0.013 % (Seman, 1983). А. Buchter-Larsen (1986) предложил оригинальный способ производства гаплоидов: комбинировал опыление облученной пыльцой и последующее спасение зародышей, однако практически все растения оказывались гетерозиготными по одному или нескольким признакам. Спасение зародышей, полученных от опыления пыльцой других видов *Beta*, привело к относительно большому выходу негаплоидных растений (Buchter-Larsen, 1986). Так как данный метод обеспечивал низкий выход гаплоидов и был крайне трудоемким, исследователи оставили попытки производства удвоенных гаплоидов *in vivo*.

Андрогенез – простой и эффективный способ производства гаплоидов *in vitro* у многих культур, у рода *Beta* исследователи тоже попытались создать гаплоиды с применением культуры изолированных пыльников. Первые попытки производства гаплоидов сахарной свеклы *in vitro* предприняты Н. Banba и Н. Tanabe (1972): при культивировании изолированных пыльников они получили одно растение, происхождение (соматический клон или гаплоид) которого не указано. М. Goska и J.H. Rogozinska (1981) продолжили исследования по культивированию изолированных пыльников сахарной свеклы и получили растения, которые были неандрогенными.

D. Hoesmans и D. Bossoutrot (1983) занимались разработкой питательных сред для культивирования изолированных семязачатков и проводили цитологические исследования развивающихся на питательных средах семязачатков, которые показали, что наиболее склонны к развитию *in vitro* семязачатки, содержащие зрелый 7-ядерный зародышевый мешок. Исследователи получили 17 гаплоидных растений из 7237 изолированных семязачатков сахарной свеклы из мужскистерильных донорных растений.

Ученые неоднократно возвращались к попыткам создать гаплоидные растения свеклы, культивируя пыльники или изолированные микроспоры, однако получить полноценные растения-регенеранты либо не удавалось (Van

Geyt et al., 1985; Gorecka et al., 2017; Гонтаренко, Герасименко, 2018), либо они не были гаплоидами (Herrmann, Lux, 1988a). Поэтому главным методом производства гаплоидов сахарной и столовой свеклы стал гиногенез.

Основной объем исследований по изучению гиногенеза выполнен на сахарной свекле. Исследователи изучали влияние на выход эмбриоидов и регенерантов таких факторов, как тип и концентрация фитогормонов (D'Halluin, Keimer, 1986; Herrmann, Lux, 1988b; Ferrant, Bouharmont, 1994; Подвигина, 2003; Wremerth, Levall, 2003; Pazuki et al., 2018b), холодовая предобработка бутонов и семязачатков (Herrmann, Lux, 1988b; Svirshchevskaya, Dolezel, 2000; Подвигина, 2003; Pazuki et al., 2018b), шоковая стимуляция повышенными температурами изолированных семязачатков (Baranski, 1996; Wremerth, Levall, 2003), время введения семязачатков в культуру *in vitro* (Lux et al., 1990; Baranski, 1996), расположение бутонов на соцветии (D'Halluin, Keimer, 1986; Doctrinal et al., 1989; Подвигина, 2003) и др.

Гиногенез столовой свеклы менее исследован, изучением этой темы занимался R. Baranski (1996), который анализировал влияние гормонального состава питательных сред и температуры культивирования изолированных семязачатков на выход эмбриоидов и каллуса, а также влияние сезона года и места выращивания маточников (теплица/поле) на выход регенерантов. Ученый показал, что выход регенерантов выше из материала, отобранного с растений, выращенных в теплице, по сравнению с материалом, полученным от растений в открытом грунте, при этом различий между материалом, полученным с маточных растений весной и летом, не отмечено.

Факторы, влияющие на эффективность производства гаплоидов в культуре изолированных семязачатков

Процесс производства гаплоидов определяется на генетическом уровне, но реализуется в зависимости от физиологических условий и индуцирующих факторов, что прямо сказывается на проценте выхода регенерантов (Baranski, 1996; Подвигина, 2003). Основными факторами являются генотипические особенности растений-доноров, стадии развития женского гаметофита, расположение бутона на соцветии.

Высокую значимость имеют экзогенные факторы, оказывающие влияние на регенерационную способность культивируемых семязачатков. К таким факторам относят процентное соотношение регуляторов роста в питательных средах, сезон и продолжительность выращивания (возраст) растений-доноров, холодовую и рентгеновскую обработку бутонов, температуру и условия культивирования изолированных семязачатков (Van Geyt et al., 1987; Lux et al., 1990; Gurel et al., 2000).

Среди факторов, влияющих на успех эмбриогенеза, генотип считается наиболее значимым. Исследователи отмечают, что наиболее отзывчивы при введении в культуру изолированных семязачатков материалы гибридного и линейного происхождения – инцухт-линии, гибриды и сибсы, а самую низкую регенерационную способность имеют линии на основе ЦМС и сорта-популяции (Gurel et al., 2000; Подвигина, 2003).

У рода *Beta* исследования количества генов, контролирующей склонность генотипов к формированию эмбриоидов *in vitro*, не проводили, что, вероятно, связано с низкой отзывчивостью генотипов и трудоемкостью используемых методов производства гаплоидов. Выявить отзывчивые генотипы можно только экспериментальным путем. Маркерным признаком отзывчивого генотипа сахарной свеклы может выступать наличие аномальных структур в мужском гаметофите (аномальных пыльцевых зерен и микроспор), вызванных нарушением функции веретена деления, нерегулярным образованием каллозной перегородки, отсутствием цитокинеза в ходе мейоза (Подвигина, 2003).

Определенное значение при индуцировании гаплоидов сахарной свеклы имеют месторасположение отбираемых бутонов на соцветии и стадии развития зародышевых мешков. Наибольшей регенерационной активностью характеризуются неоплодотворенные семязачатки из бутонов с 1-го по 25-й снизу вверх от цветка в средней части соцветия, кроме того, максимальный выход гаплоидов отмечается с центрального побега и побегов первого порядка по сравнению с ветвями второго порядка (D'Halluin, Keimer, 1986; Doctrinal et al., 1989; Подвигина, 2003). Способность изолированных семязачатков к эмбриогенезу сохраняется на всех этапах развития женского гаметофита, однако 7- и 8-ядерные зародышевые мешки наиболее отзывчивы к эмбриогенезу и легче переходят с гаметофитного пути развития на спорофитный (Van Geyt et al., 1987; Подвигина, 2003). Маркерными признаками 7- и 8-ядерной стадий развития зародышевого мешка семязачатка для изолирования и введения в культуру *in vitro* являются наличие одноядерных микроспор и двух-, трехядерной пыльцы в пыльниках, находящихся с семязачатками в одном бутоне (Подвигина, 2003). Обнаружить бутоны с необходимой стадией развития женского гаметофита можно за 1–5 дней до цветения.

Подготовка донорных растений

Выращивание и подготовка донорных растений – один из важнейших этапов технологии производства удвоенных гаплоидов свеклы. Донорные растения должны быть достаточно мощными и здоровыми, чтобы давать экспланты высокого качества. W.E. Wremerth и M.W. Levall (2003) рекомендуют еженедельно вносить растворы макро- и микроэлементов под донорные растения для формирования мощных маточников. Выращивать растения-доноры большинство исследователей советуют в условиях теплиц или климатических камер, чтобы минимизировать воздействие неблагоприятных погодных факторов и поражение вредителями (Lux et al., 1990; Baranski, 1996; Gurel, 2000; Wremerth, Levall, 2003). Однако в исследованиях О.А. Подвигиной (2003) наибольшей регенерационной способностью обладали семязачатки, отобранные с растений, выращенных в поле.

Выращивать донорные растения рекомендуют летом, семязачатки с таких растений более отзывчивы на культивирование *in vitro* по сравнению с семязачатками растений, выращенных в осенне-зимний сезон (Lux et al., 1990; Baranski, 1996). О.А. Подвигина (2003) сделала интересное наблюдение о связи регенерационной способно-

сти семязачатков и погодных условий в период введения в культуру – при резких колебаниях дневных и ночных температур воздуха увеличивался выход гаплоидных проростков.

Индукция эмбриогенеза в культуре изолированных семязачатков

У *B. vulgaris* для стимуляции эмбриогенеза используют тепловую обработку бутонов и изолированных семязачатков: чаще всего проводят предобработку бутонов при пониженных температурах – 4–6 °С в течение 5 сут, с последующим культивированием изолированных семязачатков в термошкафу при температуре 28–32 °С (Lux et al., 1990; Baranski, 1996; Gurel et al., 2000; Подвигина, 2003; Wremerth, Levall, 2003). А. Pazuki и коллеги (2018b) показали, что обработка соцветий в течение 7 дней при 4 °С может стимулировать эмбриогенез у семязачатков, далее изолированные семязачатки культивировали при 27±2 °С в климатической камере с 18-часовым фотопериодом. О.А. Подвигина (2003) культивировала при 4 °С в течение 5 сут непосредственно изолированные семязачатки сахарной свеклы, что стимулировало их развитие даже на безгормональной среде В5, однако наибольший выход наблюдался при их культивировании на среде В5 с добавлением 2 мг/л гиббереллина.

О.А. Подвигина (2003) для стимуляции эмбриогенеза использовала предобработку семязачатков рентгеновскими лучами. Исследования показали, что выход гаплоидных регенерантов зависел от дозы рентгеновского облучения, максимальный выход составил 5.3 % при дозе обработки 3000 рентген, увеличение дозы облучения до 5000 рентген стимулирующего эффекта не оказало и привело к возникновению нежелательных мутаций.

Культивировать изолированные семязачатки при повышенных положительных температурах до появления эмбриоидов рекомендуют многие авторы (Lux et al., 1990; Baranski, 1996; Wremerth, Levall, 2003), однако встречаются исследования о культивировании изолированных семязачатков при более низких температурах (Baranski, 1996; Подвигина, 2003). О.А. Подвигина (2003) культивировала изолированные семязачатки свеклы сахарной при температуре 21–26 °С и показала, что оптимальной является температура 23–25 °С. W.E. Wremerth и M.W. Levall (2003) разработали протокол производства удвоенных гаплоидов сахарной свеклы – оптимальной для культивирования изолированных семязачатков, по мнению авторов, следует считать температуру 30±2 °С, максимальный выход эмбриоидов у самых отзывчивых генотипов составил 15 %. R. Baranski (1996) проводил исследования по влиянию температуры культивирования изолированных семязачатков столовой свеклы на выход эмбриоидов. Ученый установил, что температура 25 °С оказалась наименее благоприятной для развития и выход регенерантов из семязачатков составил 4 %; между температурой 27 и 32 °С значительных различий в выходе регенерантов не наблюдалось, выход составил 12.7 и 11.3 % соответственно.

Инкубирование изолированных семязачатков обычно проводят в темноте до появления эмбриоидов/каллуса, после чего их помещают в отдельные культуральные сосуды и культивируют на свету.

Состав питательной среды для индукции эмбриогенеза

Условия культивирования изолированных семязачатков влияют как на количество регенерантов (эмбриоидов и каллуса), так и их качество. Правильный подбор питательных сред является важным условием производства гаплоидных растений в культуре изолированных семязачатков.

Исследователи используют различные питательные среды для культивирования изолированных семязачатков: MS, N6, В5. Чаще всего применяют твердые питательные среды MS и В5 с добавлением различных регуляторов роста. На жидких средах культивировали семязачатки Н. Lux с коллегами (1990) и Е.Н. Васильченко и сотрудники (2017). Е.Н. Васильченко с коллегами при исследовании влияния консистенции питательных сред показали, что на жидкой питательной среде активизировался процесс пролиферации ядер и клеток женского гаметофита, что оказывало воздействие на инициацию новообразований, а при переносе полученных структур на твердые среды наблюдалась индукция гаплоидных регенерантов.

Для гелирования питательных сред для культуры изолированных семязачатков свеклы обычно используют агар, агарозу и фитагель. В основном для культуры изолированных семязачатков применяют среды с добавлением агара или агарозы (Baranski, 1996; Подвигина, 2003; Wremerth, Levall, 2003). W.E. Wremerth и M.W. Levall (2003) рекомендуют использовать агарозу в качестве гелеобразователя на эмбриоиндукционной питательной среде в протоколе по созданию удвоенных гаплоидов сахарной свеклы и агар – для гелирования побего- и корнеиндукционных сред. В исследованиях (Gurel et al., 2000; Васильченко и др., 2017; Pazuki et al., 2017) отмечается положительное влияние фитагеля в концентрации 2–3 г/л на эмбриогенез и регенерацию: его преимущество состоит в низких расходе и стоимости при эффекте, аналогичном агару.

Наиболее существенное влияние на развитие эксплантов оказывает гормональный состав питательных сред (Seman, Farago, 1990; Gurel et al., 2000; Подвигина, 2003). Различают пять направлений развития неоплодотворенных изолированных семязачатков:

1. Из семязачатка формируется один эмбриоид (прямая регенерация).
2. Клетки семязачатков неорганизованно делятся, в результате чего появляется каллусная ткань, из которой формируются вторичные эмбриоиды.
3. Перерождение первичного регенеранта в каллусоподобную структуру и дальнейшая вторичная регенерация через образование адвентивных побегов.
4. Формирование неморфогенного каллуса.
5. Развитие аморфных структур, перерождение первичного регенеранта в каллусоподобное образование без дальнейшей регенерации (Seman, Farago, 1990; Подвигина, 2003).

О.А. Подвигина (2003) и Е.Н. Васильченко с коллегами (2017) указывают, что добавление в питательную среду гиббереллина (2 мг/л) вызывает эмбриоидогенез, а присоединение к гиббереллину ауксинов (ИМК) и цитокининов (6-БАП и кинетина) стимулирует рост каллуса наряду с эмбриоидами и морфогенез через все возможные направления развития изолированных семязачатков.

W.E. Wremerth и M.W. Levall (2003) рекомендуют использование ступенчатого культивирования изолированных семязачатков на средах с различными комбинациями и концентрациями регуляторов роста. На первых этапах культивирования используют среды с добавлением 0.5 мг/л 2.4-Д и 0.3 мг/л 6-БАП с целью вызвать эмбрио- или каллусогенез.

В качестве источника углеводов в питательную среду добавляют сахарозу, однако нет единого мнения о необходимом количестве сахарозы в питательной среде – ее концентрация варьирует в пределах 30–100 г/л в зависимости от технологии. S. Gurel и коллеги предлагают добавлять сахарозу в питательную среду для эмбриогенеза сахарной свеклы в концентрации 100 г/л (Gurel et al., 2000; Pazuki et al., 2018a, b). R. Baranski (1996) использовал для индукции гиногенеза столовой свеклы питательные среды с добавлением сахарозы в концентрации 60 г/л. W.E. Wremerth и M.W. Levall (2003) для производства удвоенных гаплоидов сахарной свеклы добавляли 80 г/л сахарозы в эмбриоиндукционную среду и 20 г/л в побегоиндукционную. H. Lux с коллегами (1990) добавляли 100 г/л сахарозы в эмбриоиндукционную среду и 20 г/л в среду для регенерации. Выход эмбриоидов сильно варьирует в пределах каждого исследования, что затрудняет выбор оптимальной концентрации углеводов в питательной среде, однако во всех работах прослеживается общая тенденция: для индукции эмбриогенеза используют среды с повышенным содержанием углеводов, а для регенерации – с уменьшенным.

S. Gurel и сотрудники (2000) сообщают, что добавление в питательную среду 0.5 % активированного угля существенно увеличивает выход эмбриоидов (в среднем по генотипам с 3.3 до 12.8 %), а Е.Н. Васильченко с коллегами (2017) указывают, что добавление 3 г/л активированного угля негативно влияет на развитие растений-регенерантов сахарной свеклы, что может быть обусловлено адсорбцией гормональных веществ из сред. При этом Е.Н. Васильченко рекомендует использование активированного угля на этапе укоренения, что позволяет значительно увеличить выход укорененных растений благодаря адсорбции фенольных соединений, ингибирующих корнеобразование.

При изучении индуцированного эмбриогенеза столовой свеклы R. Baranski (1996) выявил, что наибольший выход регенерантов наблюдается на питательной среде N6 (by Chu), где при использовании сочетания 0.5 мг/л ИУК и 0.2 мг/л 6-БАП максимальный выход регенерантов составил 8.3 %.

Регенерация растений

Одним из наиболее значимых этапов создания удвоенных гаплоидов является регенерация растений из эмбриоидов и/или каллуса. Исследователи получают растения-регенеранты либо на той же питательной среде, на которой культивируют семязачатки (Baranski, 1996), либо используют среды с иными концентрациями и видами регуляторов роста (Подвигина, 2003; Wremerth, Levall, 2003; Васильченко и др., 2017).

О.А. Подвигина (2003) указывает, что гаплоидные растения на первых этапах развития характеризуются слабым ростом и жизнеспособностью, что обусловлено их

гаплоидным статусом. Гибель растений на этом этапе может достигать 45.5 % в зависимости от генотипа растения-донора. Для увеличения выхода растений-регенерантов предложено ввести этап стабилизации гаплоидов, включающий последовательное культивирование регенерантов на средах без добавления гормонов и ростовых веществ, содержащих гиббереллин, 6-БАП и ИМК. Несколько пассажей с чередованием культивирования на гормональных и безгормональных средах позволило снизить избыточную концентрацию гормонов в тканях гаплоидов и стимулировать их к дальнейшей регенерации. Также в ходе исследования отмечено, что способность гаплоидных регенерантов адаптироваться к смене сред зависела от генетических особенностей донорного растения.

W.E. Wremerth и M.W. Levall (2003) для решения проблемы жизнеспособности развивающихся растений-регенерантов разработали технологию ступенчатого культивирования регенерантов сахарной свеклы, полученных из изолированных семязачатков. Для регенерации побегов из эмбриоидов сахарной свеклы рекомендуют использовать питательные среды MS с содержанием кинетина (0.2 мг/л) и ИУК (0.1 мг/л), в состав предукореняющей среды MS входят кинетин в концентрации 0.5 мг/л и ИМК в концентрации 0.55 мг/л. Для укоренения розеток следует применять 1/2 среды MS с высокой концентрацией ИМК (5.5 мг/л). А. Pazuki и коллеги (2018a) изучили влияние добавления антистрессового агента – аминокислоты пролин – на побего- и корнеобразование у растений-регенерантов сахарной свеклы, полученных из изолированных семяпочек. Добавление в питательные среды 0.2 и 0.3 мМ пролина стимулировало активное побегообразование и более быстрое укоренение растений в сравнении с полным отсутствием пролина или его концентрацией в среде 0.1 и 0.4 мМ.

Полиплоидизация

Клетки регенерирующих из семязачатков растений могут быть гаплоидными, диплоидными, полиплоидными и встречаться в одном регенеранте в различных соотношениях. Уровень спонтанной диплоидизации у изученных образцов сахарной свеклы значительно варьирует: по данным S. Gurel и сотрудников (2000), в проведенных исследованиях только 5 % растений подверглись спонтанной диплоидизации; M. Goska (1997) получил от 2 до 10 % диплоидных растений сахарной свеклы, а в работах M. Tomaszewska-Sowa (2010) на средах с добавлением кинетина формировалось до 93.8 % диплоидных растений.

Достоверных данных о факторах, влияющих на степень спонтанной диплоидизации гаплоидов, нет, поэтому необходимо переводить полученные гаплоидные растения на диплоидный уровень. Для удвоения хромосомного набора гаплоидных растений-регенерантов, как правило, используют колхицин (Gurel et al., 2000; Подвигина, 2003). Обработку гаплоидных растений *in vivo* проводят раствором колхицина в точке роста корнеплода или цветения, погружением корней в раствор колхицина или в условиях *in vitro*, культивируя на питательных средах, содержащих мутаген (Подвигина, 2003). Время обработки и концентрация мутагена могут быть разными: S. Gurel и коллеги (2000) рекомендуют удваивать количество хро-

мосом, помещая гаплоидные растения на питательную среду с добавлением колхицина в концентрации 5 г/л на 5 мин. По данным О.А. Подвигиной (2003), при добавлении колхицина в питательную среду в концентрации 0.05 % с экспозицией двое суток уровень диплоидизации составил 83.3 %.

Миксоплоидность – характерное для меристем сахарной свеклы явление (Харечко-Савицкая, 1940; Yudanov et al., 2004; Lukaszewska, Sliwinska, 2007), усложняющее определение уровня плоидности полученных растений.

Уровень плоидности растений можно определить не только прямым подсчетом числа хромосом в клетках меристем, но и по косвенному показателю – числу хлоропластов в замыкающих клетках устьиц (Yudanov et al., 2004). Однако число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц может зависеть не только от уровня плоидности, но и способа размножения (самоопыление или скрещивание). Например, у диплоидного гетерозисного гибрида сахарной свеклы среднее число хлоропластов может быть 12–15 шт. на клетку, тогда как у самоопыленных образцов среднее число хлоропластов на клетку составляет около 18 шт., что делает данный косвенный метод недостоверным (Малецкий и др., 2013).

Проблему определения уровня плоидности растений-регенерантов свеклы решают применением проточной цитометрии (Васильченко и др., 2017; Gorecka et al., 2017) или методом абсорбционной цитофотометрии (Yudanov et al., 2004).

Некоторые исследователи (Подвигина, 2003; Tomaszewska-Sowa, 2010) считают целесообразным выделять гаплоидные растения по фенотипу: гаплоидные растения сильно отличаются от диплоидных – имеют многочисленные мелкие узкие листья и меньший габитус по сравнению с диплоидами.

Технология культуры изолированных микроспор и пыльников: состояние и перспективы

Андрогенез, по сравнению с гиногенезом, является менее трудоемким способом, так как не требует изоляции мелких семязачатков вручную. Культура изолированных микроспор позволяет избежать формирования соматических клонов – как в случае гиногенеза (из тканей, окружающих зародышевый мешок). В связи с этим исследования в этой области являются перспективными, однако у рода *Beta* подобные работы проводились редко и были малоуспешны.

Производство гаплоидов в культуре изолированных пыльников и микроспор успешно применяют у многих видов растений, однако индукция гаплоидии в культуре изолированных пыльников или микроспор сахарной и столовой свеклы приводила только к появлению проэмбрионных структур, которые иногда формировали каллус и/или корни. Ранние попытки производства гаплоидов в культуре пыльников сахарной свеклы не привели к получению андрогенных растений (Banba, Tanabe, 1972; Goska, Rogozinska, 1981; Van Geyt et al., 1985; Herrmann, Lux, 1988a). Одной из вероятных причин неудачи всех исследователей может являться наличие амилопластов в пыльцевых зернах, что ингибирует андрогенез из-за повы-

шенного содержания крахмала в пластидах одноядерных микроспор (Sangwan, Sangwan-Norreel, 1987). Возможность элиминации крахмальных зерен в микроспорах столовой свеклы изучали К. Gorecka и сотрудники (2017), для чего исследовали два варианта обработки. В первом случае проводили полив растений-доноров раствором гиббереллина в концентрации 50 мг/л по 250 мл на одно растение дважды в неделю, что привело к увеличению выхода андрогенных регенерантов только у одного из образцов, в то время как у других образцов выход эмбриоидов не изменился, а у одного генотипа регенерация отсутствовала вовсе. Во втором случае изолированные пыльники выдерживали в растворе альфа-амилазы в концентрации 3 мг на 80 мл H₂O (из ячменного солода типа VIII-A, Sigma-Aldrich) в течение 2 мин, а затем переносили на среду для индукции андрогенеза, что привело к формированию двух эмбриоидов у двух генотипов. Получить растения исследователям не удалось, так как регенерировавшие розетки чернели и погибали. С аналогичной проблемой столкнулись М. Klimek-Chodacka и R. Baranski (2013) на некоторых генотипах столовой свеклы в культуре неоплодотворенных семязачатков, что связывают с генотип-специфичностью.

К. Gorecka и коллеги (2017) получили каллус в культуре изолированных микроспор и пыльников столовой свеклы. Авторы установили, что бутоны длиной 1.3–1.5 мм содержат около 80 % микроспор одноядерной стадии развития и около 15 % двуядерной стадии, что наиболее оптимально для культуры изолированных микроспор и пыльников у большинства культур. Лучшей питательной средой для культивирования пыльников и микроспор авторы указали В5 с добавлением 100 г/л сахарозы и 100 мг/л 2,4-Д. При цитологическом исследовании полученных образцов каллуса и розеток уровень плоидности составил 4х, что говорит о неоднократной эндоредупликации в каллусной ткани.

С.М. Гонтаренко и Г.М. Герасименко (2018) в культуре изолированных пыльников у сахарной свеклы смогли получить эмбриоиды, выход которых составил 0.15–0.92 %. Авторы определили, что оптимальной стадией развития микроспор для культуры пыльников следует считать одноядерную. Показали, что предобработка эксплантов с использованием низкотемпературного стресса (4–8 °С) в течение 3–15 сут служит фактором, инициирующим переход микроспор с гамето- на спорофитный путь развития, тогда как предобработка высокими температурами (30–32 °С) не дает положительных результатов. Наиболее подходящей питательной средой для культуры пыльников оказалась MS половинной концентрации с добавлением ряда витаминов (В1 – 10 мг/л, В6 – 1 мг/л, РР – 1 мг/л, С – 1 мг/л) и аминокислот (глутаминовой – 250–500 мг/л, аспарагиновой – 30–50 мг/л, тирозина – 1–10 мг/л, аргинина – 2–10 мг/л, гидроксипролина – 2–4 мг/л).

Заключение

Создание гомозиготных линий с помощью гаплоидных технологий востребовано селекционерами по всему миру. Главным преимуществом гаплоидных технологий по сравнению с методами традиционной селекции является сокращение времени производства чистых линий и затрат

на многолетнее культивирование и самоопыление растений. Наиболее разработанной технологией производства линий удвоенных гаплоидов свеклы на настоящий момент следует считать технологию изолированных семязачатков, которая протестирована преимущественно на сахарной свекле. Данная технология создания чистых линий более трудоемкая по сравнению с технологией культуры изолированных микроспор, однако последняя практически не применима при получении удвоенных гаплоидов свеклы в силу недостатка исследований на эту тему. В связи с этим можно рекомендовать проведение исследований и разработку технологии создания удвоенных гаплоидов сахарной и столовой свеклы в культуре изолированных микроспор.

Список литературы / References

- Васильченко Е.Н., Жужжалова Т.П., Ващенко Т.Г., Землянчукина О.А., Карпеченко Н.А., Подвигина О.А. Особенности формирования гаплоидных регенерантов сахарной свеклы в культуре *in vitro*. *Вестник Воронежского государственного аграрного университета*. 2017;3(54):57-66. DOI 10.17238/issn2071-2243.2017.3.57.
- [Vasilchenko E.N., Zhuzhhalova T.P., Vashchenko T.G., Zemlyanukhina O.A., Karpechenko N.A., Podvigina O.A. Peculiarities of *in vitro* reproduction of sugar beet haploid regenerants. *Vestnik Voronezhskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Vestnik of Voronezh State Agrarian University*. 2017;3(54):57-66. DOI 10.17238/issn2071-2243.2017.3.57. (in Russian)]
- Гонтаренко С.М., Герасименко Г.М. Прямий індуцираний андрогенез у культурі *in vitro* буряків цукрових (*Beta vulgaris* L.). *Plant Varieties Studying and Protection*. 2018;14(4):375-381. DOI 10.21498/2518-1017.14.4.2018.151900.
- [Gontarenko S.M., Gerasimenko G.M. Direct induced androgenesis in culture *in vitro* in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Varieties Studying and Protection*. 2018;14(4):375-381. DOI 10.21498/2518-1017.14.4.2018.151900. (in Ukrainian)]
- Малецкий С.И., Юданова С.С., Малецкая Е.И. Гармонические пропорции числа хлоропластов в популяциях замыкающих клеток устьиц сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(1):72-80.
- [Maletskii S.I., Yudanova S.S., Maletskaya E.I. Harmonic proportions of chloroplast number in stomata of guard cell populations in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(1):72-80. (in Russian)]
- Подвигина О.А. Теоретическое обоснование и приемы использования методов биотехнологии в селекции сахарной свеклы: автореф. дис. ... д-ра с/х наук. Воронеж. 2003.
- [Podvigina O.A. Theoretical substantiation and biotechnology methods in sugar beet breeding: Dr Sci. (Agric.) Dissertation. Voronezh, 2003. (in Russian)]
- Харечко-Савицкая Е.И. Цитология и эмбриология сахарной свеклы. Свекловодство. Киев, 1940.
- [Kharechko-Savitskaya E.I. Cytology and embryology of sugar beet. Beet growing. Kiev, 1940. (in Russian)]
- Banba H., Tanabe H. A study of anther culture in sugar beet. *Bull. Sugar Beet Res.* 1972;14:9-16.
- Baranski R. *In vitro* gynogenesis in red beet (*Beta vulgaris* L.): effects of ovule culture conditions. *Acta Soc. Bot. Pol. Tow. Bot.* 1996; 65(1-2):57-60. DOI 10.5586/asbp.1996.010.
- Bosemark N. Haploids and homozygous diploids, triploids and tetraploids in sugar beet. *Hereditas*. 1971;69:193-204.
- Buchter-Larsen A. *In situ* Induction af Haploide Embryoner pa Sukkerroer efterfulgt af *In vitro* Embryokultur. Thesis, Acad. Technical Sciences. Copenhagen, 1986.
- Butterfass Th. Ploidie und Chloroplastenzahlen. *Ber. Dtsch. bot. ges.* 1959;72:440-451.
- De La Fuente G.N., Frei U.K., Lübberstedt T. Accelerating plant breeding. *Trends Plant Sci.* 2013;18:667-672. DOI 10.1016/j.tplants.2013.09.001.
- Doctrinal M., Sangwan R.S., Sangwan-Norreel 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.
- D'Halluin K., Keimer B. Production of haploid sugar beets (*Beta vulgaris* L.) by ovule culture. In: Genetic Manipulation in Plant Breeding. Berlin, 1986. DOI 10.1515/9783110871944.
- Ferrant V., Bouharmont J. Origin of gynogenetic embryos of *Beta vulgaris* L. *Sex. Plant Reprod.* 1994;7:12-16. DOI 10.1007/BF00241883.
- Fischer H.E. Untersuchungen an Zwillingen von *Beta vulgaris* L. *Der Züchter*. 1956;26:136-152. DOI 10.1007/BF00710616.
- Gorecka K., Kryzanowska D., Kowalska U., Kiszczak W., Podwyszynska M. Development of embryoids by microspore and anther cultures of red beet (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*). *J. Cent. Eur. Agric.* 2017;18(1):185-195. DOI 10.5513/JCEA01/18.1.1877.
- Goska M. Monografie i Rozprawy Naukowe. Haploidy i Podwojone Haploidy Buraka Cukrowego (*Beta vulgaris* L.) oraz Możliwości Ich Wykorzystania w Hodowli. Radzików: Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 1997.
- Goska M., Rogozinska J.H. Recent results on obtaining beet haploids through *in vitro* culture of anthers. *Biuletyn Inst. Hodowli i Aklimatyzacji Roslin*. 1981;145:141-143.
- Gurel S., Gurel E., Kaya Z. Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Rep.* 2000;19:1155-1159. DOI 10.1007/s002990000248.
- Hammond B.L. Homozygous diploid sugar beets. *J. Am. Soc. Sugar Beet Technol.* 1966;14:75-78.
- Herrmann L., Lux H. Antherenkultur bei Zuckerruben, *Beta vulgaris* L. var *altissima*. *Arch. Zuchtungsforsch. Berlin*. 1988a;18(6):375-383.
- Herrmann L., Wetzel C., Lux H. Haploiden-technik bei der zuckerrube. *Potsdam Forsch. B.* 1988b;57:95-99.
- Hosemans D., Bossoutrot D. Induction of haploid plant from *in vitro* culture of unpollinated beet ovules (*Beta vulgaris* L.). *Z. Pflanzenzucht.* 1983;91(1):74-77.
- Klimek-Chodacka M., Baranski R. Comparison of haploid and doubled haploid sugar beet clones in their ability to micropropagate and regenerate. *Electron. J. Biotechnol.* 2013;16(2):1-1. DOI 10.2225/vol16-issue2-fulltext-3.
- Kruse A. Haploids in polyembryos of beet, *Beta vulgaris* L. *Roy. Vet. Agric. Coll. Copenhagen: Yearb.* 1961;87-98.
- Levan A. A haploid sugar beet after colchicine treatment. *Hereditas*. 1945;31(3-4):399-410. DOI 10.1111/j.1601-5223.1945.tb02760.x.
- Lukaszewska E., Sliwinska E. Most organs of sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) plants at the vegetative and reproductive stages of development are polysomatic. *Sex. Plant Reprod.* 2007;20:99-107. DOI 10.1007/s00497-007-0047-7.
- Lux H., Herrmann L., Wetzel C. Production on 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.
- Palmer C.D., Keller W.A. Overview of haploidy. In: Haploids in Crop Improvement II. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer, Berlin, Heidelberg, 2005;56:3-9. DOI 10.1007/3-540-26889-8_1.
- Pazuki A., Aflaki F., Gürel S., Ergül A., Ekrem G. The effects of proline on *in vitro* proliferation and propagation of doubled haploid sugar beet (*Beta vulgaris*). *Turkish J. Bot.* 2018a;42(3):280-288. DOI 10.3906/bot-1709-14.
- 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.* 2018b;20:69-77. DOI 10.1007/s12355-017-0522-x.

- Sangwan R.S., Sangwan-Norreel B.S. Ultrastructural cytology of plastids in pollen grains of certain androgenic and nonandrogenic plants. *Protoplasma*. 1987;138:11-22. DOI 10.1007/BF01281180.
- Seman I. Possibilities of detection and induction of haploids in *Beta vulgaris* L. II *Biologia (Bratislava)*. 1983;38:1113-1122.
- Seman I., Farago J. *In vitro* cultivation of unfertilized ovules of sugar beet. Embryology and seed reproduction: XI Int. Symp. Leningrad, USSR, July 3-4, 1990. Leningrad, 1990;146.
- Svirshchevskaya A., Dolezel J. Production and Performance of Gynogenetic Sugarbeet Lines. *J. Sugar Beet Res. USA*. 2000;4(37):117-133.
- Śliwińska E., Łukaszewska E. Polysomaty in growing *in vitro* sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) seedlings of different ploidy level. *Plant Sci*. 2005;168:1067-1074. DOI 10.1016/j.plantsci.2004.12.003.
- Tomaszewska-Sowa M. Cytometric analyses of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants regenerated from unfertilized ovules cultured *in vitro*. *Plant Breed*. 2010;2:231-235.
- Van Geyt J., D'Halluin K., Jacobs M. Induction of nuclear and cell divisions in microspores of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Z. Pflanzenzuecht*. 1985;95:325-335.
- 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;73:920-925. DOI 10.1007/BF00289399.
- Wremeth W.E., Levall M.W. Doubled haploid production of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): Published protocols for other crop plant species. *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual*. Kluwer Academic Publishers, 2003. DOI 10.1007/978-94-017-1293-4_38.
- Yudanov S.S., Maletskaya E.I., Maletskii S.I. Epiplastome Variation of the Number of Chloroplasts in Stomata Guard Cells of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). *Russ. J. Genet*. 2004;40(7):930-939. DOI 10.1023/B:RUGE.0000036525.14205.3f.
- Zhuzhhalova T.P., Kolesnikova E.O., Vasilchenko E.N., Cherkasova N.N. Biotechnological methods as a tool for efficient sugar beet breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(1):40-47. DOI 10.18699/VJ20.593.
- Zimmermann K. Vermendung haploider Pflanzen in der Zuechtung. *Ber. Deut. Bot. Ges*. 1953;66:28-30. DOI 10.1007/BF00710616.

ORCID ID

T.R. Grigolava orcid.org/0000-0002-1594-8430
A.V. Vishnyakova orcid.org/0000-0002-9160-1164
A.A. Sinitsyna orcid.org/0000-0002-9470-3676
A.V. Voronina orcid.org/0000-0003-0249-246X
O.N. Zubko orcid.org/0000-0001-9701-6647
O.V. Zudova orcid.org/0000-0001-5405-9460
S.G. Monakhos orcid.org/0000-0001-9404-8862

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-905 от 16 ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.10.2020. После доработки 28.12.2020. Принята к публикации 03.01.2021.