


Методы биотехнологии как потенциал развития селекции сахарной свеклы

Т.П. Жужжалова, Е.О. Колесникова , Е.Н. Васильченко, Н.Н. Черкасова

Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова, пос. ВНИИСС, Рамонский район, Воронежская область, Россия

 e-mail: kolelkb@mail.ru

Аннотация. Рассмотрены аспекты использования в селекционном процессе сахарной свеклы биотехнологических методов, позволяющих ускоренно создавать, размножать и сохранять растения с улучшенными или новыми признаками. Представлен обзор работ, проведенных по данным направлениям во Всероссийском НИИ сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова. Показана тесная взаимосвязь морфофизиологических исследований культивируемых *in vitro* органов и тканей с селекционными признаками, обеспечивающая разработку экспериментальных систем реконструкции растений без полового скрещивания. Рассмотрено воздействие условий культуры *in vitro* на гаплоидные клетки неоплодотворенных семязачатков сахарной свеклы в процессе получения удвоенных гаплоидных линий с высокой степенью гомозиготности и сохранением ценных селекционных свойств. В отличие от классического инбридинга, время создания гомозиготного растительного материала с помощью данного метода было сокращено с 10–12 до 3–5 лет. Исследования по культивированию зиготических зрелых зародышей сахарной свеклы на основе селективных систем *in vitro* позволили повысить адаптивные свойства растений и обеспечить комплексную устойчивость к стрессовым факторам внешней среды. Благодаря жесткому отбору в условиях абиотического стресса созданы изогенные линии сахарной свеклы с толерантностью к засухе, засолению и кислотности почвы. Предложена оригинальная схема массового микроклонального размножения и депонирования *in vitro* элитных растений – компонентов высокопродуктивных гибридов, которая может служить для получения выровненного селекционного материала улучшенного качества. Разработанные технологии являются приоритетным и инновационным направлением исследований, так как внедрение данных разработок в селекционный процесс сахарной свеклы будет способствовать получению конкурентоспособных гибридов с комплексом хозяйственно полезных признаков. Сочетание биотехнологических подходов, в том числе культуры тканей, с методами традиционной селекции даст возможность получать новый исходный материал для создания отечественных сортов и гибридов нового поколения с гетерозисным эффектом и широким спектром устойчивости, сохраняющимися в ряду поколений.


Ключевые слова: сахарная свекла; гаплоидный партеногенез; абиотические стрессы; селективные агенты; морфогенез; микроразмножение; штеклинги; селекционные линии; семена элиты.

Для цитирования: Жужжалова Т.П., Колесникова Е.О., Васильченко Е.Н., Черкасова Н.Н. Методы биотехнологии как потенциал развития селекции сахарной свеклы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(1): 40-47. DOI 10.18699/VJ20.593

Biotechnological methods as a tool for efficient sugar beet breeding

T.P. Zhuzhhalova, E.O. Kolesnikova , E.N. Vasilchenko, N.N. Cherkasova

A.L. Mazlumov All-Russia Research Institute of Sugar Beet, VNISS, Ramon raion, Voronezh oblast, Russia

 e-mail: kolelkb@mail.ru

Abstract. Here we consider aspects of the application of biotechnological methods to rapid creation, propagation, and maintenance of plants with improved or new traits in sugar beet breeding. The results of the works carried out in these fields by the Federal State Budgetary Scientific Institution "The A.L. Mazlumov All-Russia Research Institute of Sugar Beet" are reviewed. A close association between morphological and physiological changes in *in vitro* cultured organs and tissues, on the one hand, and breeding traits, on the other hand, which allows the development of experimental systems for non-amphimictic plant reconstruction is shown. The influence of *in vitro* growth conditions on haploid cells of unfertilized sugar beet ovules in the course of obtaining doubled haploid lines with high degree of homozygosity and maintenance of valuable breeding properties is considered. As compared to common inbreeding, this method shortens the time for development of homozygous material from 10–12 to 3–5 years, which is of great importance for speeding-up the breeding process. The results of studies on the culturing of mature sugar beet zygotic embryos based on *in vitro* selective systems have made it possible to improve the adaptive potential of plants and to provide complex resistance to environmental stress factors. Strict selection under abiotic

stress conditions allowed creation of sugar beet isogenic lines with tolerance of drought, salinity, and soil acidity. It is shown that the proposed original design of mass-scale microclonal *in vitro* reproduction and deposition of elite plants as components of highly productive hybrids can be used to obtain seeds of uniform high-quality breeding material. The technologies developed by biotechnological methods are a topical and innovative direction of inquiry, since the application of these techniques to sugar beet breeding will promote obtaining of competitive hybrids with a set of commercially valuable traits. The combination of biotechnology methods, including tissue culture, and traditional breeding techniques is expected to provide an opportunity to obtain a new starting material to develop domestic varieties and hybrids of new generation with heterosis effect and a wide resistance spectrum persisting across generations.

Key words: sugar beet; haploid parthenogenesis; abiotic stresses; selective agents; morphogenesis; micropropagation; stecklings; breeding lines; elite seeds.

For citation: Zhuzhzhlova 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

Введение

Одно из главных направлений селекции сахарной свеклы в современных условиях развития сельскохозяйственного производства – это создание высокопродуктивных гибридов на линейной основе. Поэтому традиционный селекционный процесс направлен на длительный отбор самоопыленных линий с выровненными морфологическими признаками, хозяйственно полезными свойствами (урожайность, сахаристость и др.) и высоким качеством семян. Однако используемые методы селекции долговременны и трудоемки, что обусловлено двухлетним циклом развития растений, инбредной депрессией, явлением само- и перекрестной несовместимости, вызывающих трудности при сохранении генетической однородности полученного материала. В связи с этим для создания, стабилизации и сохранения ценных признаков селекционного материала приоритетными признаны биотехнологические методы, основанные на культивировании органов и тканей *in vitro*. Применение биотехнологий в селекционном процессе позволит сократить, а затем и ликвидировать отставание от зарубежных стран по различным показателям сельскохозяйственного производства.

Получение удвоенных гаплоидов сахарной свеклы в культуре тканей обеспечивает создание гомозиготных линий с комплексом хозяйственно полезных признаков. Этот важный этап в селекции сахарной свеклы должен быть разработан и включен в технологический процесс.

Перспективным направлением биотехнологии в селекции сахарной свеклы является также использование селективных систем *in vitro*, способствующих получению растений с высокой устойчивостью к абиотическим стрессам, что основано на способности растительных организмов к созданию механизмов защиты от неблагоприятных факторов среды на клеточном уровне (Духовский и др., 2003; Lamaoui et al., 2018).

К главным направлениям работ по культуре изолированных тканей в практической селекции сахарной свеклы относится совершенствование биотехнологических методов массового размножения и длительного сохранения селекционно ценных форм. В основе таких методов лежит уникальное свойство тотипотентности растительных клеток, характеризующее весь потенциал признаков, который при культивировании реализуется различными путями морфогенеза: эмбриоидогенез, органоидогенез и гистогенез (Батыгина, 2000). В связи с этим морфогенетическая ком-

петенция культивируемых тканей и органов растений сахарной свеклы может способствовать определённому пути развития, что требует особого внимания при микроклонировании созданного материала.

Для исследований по вышеперечисленным направлениям был привлечен целый ряд международных научных учреждений. Так, в США для улучшения зародышевой плазмы сахарной свеклы применяются методы создания удвоенных гаплоидов (ДН), оценки устойчивости к стрессам, молекулярной биологии и др. Все разработки курирует Служба сотрудников Министерства сельского хозяйства – USDA ARS (Козловская и др., 2016). Международный интерес к гаплоидным растениям в Евросоюзе подтвержден созданием программы GOST 851 «Гаметные клетки и молекулярная селекция для улучшения растений». Во всех селекционно-семеноводческих фирмах Европы (Strube, KWS, Syngenta, Fiorimond Despres и др.), занимающихся созданием гибридов сахарной свеклы и семенного материала, включаются в работу гомозиготные линии. Получение гаплоидных и удвоенных гаплоидных форм (х/хх) сахарной свеклы является неотъемлемой частью работ научно-исследовательского центра Planta. Там проводят изучение основных направлений биотехнологии, включая разработку методов отбора сахарной свеклы с устойчивостью к стрессам. Селекционные материалы сахарной свеклы с применением биотехнологий получены в Германии, Турции (Gürel et al., 2003), Польше (Tomaszewska-Sowa, 2012), Болгарии (Kikindonov et al., 2016) и других странах. Интерес представляют технологические показатели селекционного материала, созданного с помощью удвоенных гаплоидов сахарной свеклы в Беларуси, демонстрирующие положительные результаты селекции на уровне (или выше) обычных гибридов. При испытании было установлено статистически достоверное превышение по урожайности (43 и 45 т/га) и сахаристости (20.9 и 21.1 %) по сравнению с диплоидным стандартом (Кильчевский, Хотылева, 2012). Многолетнее изучение гибридов, созданных с использованием ДН-линий в Болгарии, показало их высокую продуктивность по сравнению с обычными гибридами. Урожай корнеплодов у дигаплоидных гибридов превысил контрольный уровень на 11.4–13.7 %, а сбор сахара варьировал на уровне стандарта (Kikindonov et al., 2016). Данные результаты являются практическим достижением, которое обуславливает внедрение в селекционный процесс технологий на

основе методов культуры тканей для ускоренного получения селекционного материала с ценными признаками.

Таким образом, весьма актуальны исследования по разработке и включению в отечественный селекционный процесс сахарной свеклы биотехнологий направленного получения генетически улучшенного исходного материала для создания перспективных гибридов нового поколения. Успех таких исследований может быть обеспечен при учете специфики морфогенетических потенций развития определенных органов растений, проявляющих в условиях *in vitro* склонность к активным процессам регенерации и размножения.

Гаплоидный партеногенез

В процессе многолетних исследований в ФГБНУ «Всероссийский НИИ сахарной свеклы им. А.Л. Мазлумова» были разработаны методические приемы индукции гаплоидного партеногенеза *in vitro* и определены оптимальные условия культивирования эксплантов сахарной свеклы (Васильченко и др., 2018). Важное условие – выбор исходных растений-доноров эксплантов по фенотипическим характеристикам, включающим морфологический габитус семенных растений, высокую степень раздельноцветковости и завязываемости семян. Первичными эксплантами для культивирования *in vitro* являлись семязачатки, расположенные в бутонах на центральном колосе кистевидной части плейохазия. Использование цитозембриологических исследований (Барыкина и др., 2004) позволило установить, что формирование гаплоидных эмбриоидов *in vitro* происходило на всех этапах развития ядер и клеток зародышевого мешка. Этому способствовали хорошо выраженная полярность и высокая компетентность гаплоидных ядер к развитию. Наибольшую активность к формированию гаплоидных эмбриоидов проявляли семязачатки, содержащие в зародышевых мешках 8 гаплоидных ядер или 7 клеток (но тоже 8-ядерных). Согласно современным представлениям, в этот период возможно переключение гаметофитной программы развития на спорофитную (Батыгина, Васильева, 2002). Этот процесс стимулируется предобработкой материала низкими положительными температурами в течение 2–4 суток.

Ключевым моментом при культивировании семязачаток оказался прием чередования питательных сред B_5 различной консистенции. Содержание в жидкой питательной среде гиббереллина в высокой концентрации вызывало прямую регенерацию гаплоидных эмбриоидов с образованием первичного корешка и семядольных листьев. При пересадке на твердую питательную среду формировались ростовые побеги. Присутствие в жидкой среде 6-БАП приводило к образованию каллусной ткани, в которой при пересадке на твердую питательную среду с добавлением кинетина (Кн) и 2.4 Д происходило развитие регенерантов путем гемморизогенеза. Применение данного приема способствовало сохранению жизнеспособности культивируемых эксплантов до 4–6 месяцев при активизации процессов пролиферации и дифференциации ядер женского гаметофита. Специализация возникающих новообразований растительных тканей обеспечивала увеличение выхода гаплоидных регенерантов через прямой эмбриоидогенез до 18.9 %, а путем каллусогенеза – до 11.0 %. При этом

дифференциация клеток ускорилась на 25–30 %, количество сформированных регенерантов увеличилось до 13–19 % (Васильченко, 2016).

Следующий этап заключался в отборе морфологически развитых гаплоидных регенерантов, а затем в переводе их на диплоидный уровень. Процесс сопровождался отборами по цитологическим, биохимическим и молекулярно-генетическим признакам (Жужжалова и др., 2016). О получении гаплоидных растений известно давно. Ранее ploидность определяли путем непосредственного подсчета хромосом на метафазных пластинках (Ницше, Венцель, 1980; Паушева, 1988). Анализ яДНК методом проточной цитометрии на анализаторе ploидности, основанный на флуоресцентном окрашивании ядер растений (Tomaszewska-Sowa, 2010), дал возможность быстро и эффективно выделять регенеранты с гаплоидным набором хромосом ($n = 9$), а после колхицинирования провести отбор удвоенных гаплоидов ($2n = 18$). Следует заметить, что после мутагенеза у гаплоидов часто наблюдались нарушения в процессах деления клеток, приводящие к варьированию у регенерантов количества хромосом и возникновению миксоploидных, анеуплоидных форм, которые браковались (Жужжалова и др., 2016).

Биохимическая оценка позволила выявить различия в активности ферментов у опытных образцов. По сравнению с исходными диплоидными формами гаплоидные растения характеризовались увеличенным в 1.6 раза количеством белка и большей активностью ферментов пероксидазы, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы. У регенерантов после удвоения хромосом эти показатели возвращались к уровню контроля или незначительно превышали его (Землянухина и др., 2016). Можно предположить, что изменение активности ферментов у гаплоидных регенерантов сахарной свеклы было обусловлено метилированием ДНК участков генома, связанных с функционированием белка. Установленные различия отражали более глубокие изменения, вызванные клеточной дифференцировкой при культивировании тканей (Ванюшин, 2010). Данный вопрос требует глубокого изучения.

После проведения диплоидизации регенерантов существенное значение имело выявление генетических изменений, которые не проявлялись фенотипически. PCR и RFLP-анализ с использованием рестриктазы Hind III (Beckman, Sollen, 1983) позволили идентифицировать тип цитоплазмы по числу рестриктов при удвоении хромосом. У микроклонов с нормальной цитоплазмой амплифицировался один фрагмент (800 п. н.). У форм со стерильным типом цитоплазмы обнаруживались два продукта рестрикции – 320 и 480 п. н. Удвоенные гаплоиды, у которых этот фрагмент не рестрицировался Hind III, были представлены полностью фертильными формами с нормальной цитоплазмой (N) и ядерными генами в рецессивном состоянии (rf). В остальных образцах наблюдался полиморфизм фрагментов, что предполагало наличие у соответствующих гаплоидных форм стерильной цитоплазмы (S) и разное сочетание рецессивных и доминантных аллелей ядерных генов Rf_1/rf_1 и Rf_2/rf_2 . Выявление типа цитоплазмы у регенерантов на ранних этапах культивирования облегчало создание линий с ЦМС, представляя

значительный интерес для селекции сахарной свеклы (Васильченко, 2016; Васильченко и др., 2018).

Последний этап культивирования *in vitro* включал процессы клонирования регенерантов с удвоенной плоидностью и последующее их укоренение на питательной среде с измененным гормональным составом. Отобранные микроклоны с мощной корневой системой и хорошо развитой листовой поверхностью высаживали в грунт в условиях теплицы. Благодаря высокой влажности воздуха удалось сохранить до 72 % микроклонов. В дальнейшем осуществляли выращивание растений в течение 3 месяцев до получения штеклингов массой 70–100 г, которые затем яровизировали 45 дней. В начале стеблеобразования температуру воздуха в теплице повышали до 14–20 °С, поддерживая непрерывное освещение на протяжении месяца. В этот период отмечался активный рост и развитие семенных растений. Затем наблюдались процессы бутонизации и цветения. Высота растений достигала 1.5 м и больше, толщина основного цветоносного стебля – около 3 см, цветение происходило одновременно и интенсивно. Фертильность пыльцевых зерен варьировала от 87 до 92 %. Через 8–10 недель формировались семена с высокой разделноплодностью.

Проведенные исследования позволили выявить основные условия для проведения гаплоидного партеногенеза и разработать трехлетний технологический цикл создания гомозиготных ДН-линий. Полученные семена четырех ДН-линий послужили новым исходным материалом и в настоящее время используются в селекционной работе. Создание гомозиготных линий сахарной свеклы будет способствовать ускоренному получению гибридов с комплексом хозяйственно ценных признаков (Колесникова и др., 2018б).

Селективные системы *in vitro*

В результате наших научных экспериментов разработан метод селективного отбора *in vitro* форм сахарной свеклы, позволяющий создавать оригинальный селекционный материал с устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды (Черкасова, Жужжалова, 2011). В основу метода положено двукратное пассирование регенерантов в жестких селективных условиях, при которых количество выживших регенерантов в условиях хлоридного засоления достигало 66.0–81.7 %. Дальнейшее пассирование солетолерантных форм на питательной среде с добавлением неионного осмотика (0.45 М) способствовало повышению адаптивных механизмов защиты растений в условиях осмотического стресса. Выживаемость генотипов в данном случае повышалась в два раза при увеличении уровня общей адаптации регенерантов к абиотическому стрессу (засуха + засоление) до 59.0 %. Пассирование полученных регенерантов в условиях повышенной кислотности (рН 3.5) происходило при активном развитии ростовых побегов, что свидетельствовало о высокой устойчивости 69.1–87.5 % микроклонов. Уровень общей адаптации регенерантов к более сложному стрессу (засуха + кислотность) повышался в 10 раз (Черкасова и др., 2018).

Существенное значение при разработке метода имели эксперименты, позволившие установить, что культиви-

рование неспециализированных растительных тканей (черешки листьев, ростовые почки, незрелые зародыши и т. д.) на селективных питательных средах с добавлением морской соли (2 %) и сорбита (0.45 М при рН 4.0) приводило почти к полной деградации растительного материала. Появление регенерантов с устойчивостью наблюдалось при первичном отборе только у 2–4 % эксплантов, в качестве которых использовали зрелые зародыши. Этот период сопровождался медленным формированием ростовых побегов у выживших эксплантов, что было связано с замедлением процессов растяжения клеток и клеточных делений, приводившим к торможению развития регенерантов (Shabala, Munns, 2017). Эффективным оказался повторный отбор, позволивший в жестких селективных условиях также увеличить степень устойчивости регенерантов.

Дальнейший системный массовый отбор регенерантов по индексу длины корней (Косарева, 2012), который в опытах варьировал от 1.0 до 1.2, позволил повысить количество выживших толерантных растений до 87.5–89.2 %. Регенеранты, отобранные по длине корня в условиях, моделирующих повышенную кислотность почвы (рН 3.5) и засуху, отличались, наряду с выравненностью листового аппарата, хорошо развитой корневой системой. Процесс формирования корней в условиях осмотического стресса был менее подвержен изменению, чем развитие листьев. После воздействия осмолитиков скорость удлинения корней восстанавливалась быстрее. Активное развитие корневой системы в условиях осмотического стресса было обусловлено усилением роста боковых корней, обеспечивающих лучший доступ к воде и питательным веществам (Rahnama et al., 2011).

Выявленные особенности морфологического развития регенерантов сахарной свеклы были связаны с изменением целого ряда биохимических процессов, вызывающих активацию работы ферментов окислительного стресса, увеличение интенсивности синтеза белка (Землянухина и др., 2017), а также накопление свободного пролина (Bates et al., 1973).

Пролин в условиях водного дефицита повышал осмотическое давление клеточного сока, что свидетельствовало о его осморегуляторной функции (Сошникова и др., 2013). У солетолерантных регенерантов сахарной свеклы в условиях абиотического стресса накопление пролина (от 36.9 до 79.3 мкг/г) было связано с генотипом. При этом коэффициент стойкости (К), определяемый по отношению количества пролина при стрессе к исходному его содержанию, у солеустойчивых форм превышал контроль в 5.8–10 раз. Дальнейшее пассирование солетолерантных форм в присутствии сорбита в концентрации 0.40–0.45 М способствовало увеличению коэффициента стойкости в 1.9–1.5 раза. Общая осмотическая устойчивость генотипов сахарной свеклы при проведении системного отбора (засуха + засоление) увеличивалась в 7–12 раз. Полученные данные позволили использовать количественное содержание пролина как показатель адаптации регенерантов сахарной свеклы к стрессу и индикатор солеустойчивых компонентов (Черкасова, Жужжалова, 2014).

На заключительном этапе отобранные формы с хорошо развитой корневой системой выращивали в условиях за-

крытого грунта для получения корнеплодов, а затем из них – семенных растений.

Представленные разработки позволяют осуществлять селективный отбор форм сахарной свеклы с устойчивостью к эдафическим факторам внешней среды для создания изогенных линий в течение 3–4 лет вместо традиционных 8–10 лет. Это имеет большое значение в процессе селекции при создании новых гибридов сахарной свеклы с устойчивостью к абиотическим стрессам.

Микроразмножение

Исследования показали, что при культивировании черешков или листьев молодых проростков, а также зародышей сахарной свеклы в период создания изогенных линий с устойчивостью к стрессам воспроизведение нового организма шло путем эмбриоидогенеза (Жужжалова и др., 2006). Главное отличие возникающих зародышеподобных структур от гаплоидных эмбриоидов заключалось в особенности их формирования из диплоидных соматических клеток растений без участия половых гамет. Процесс морфогенеза происходил на основе образования в эпидермисе инициальных клеток, имеющих плотную цитоплазму и крупное ядро. При дальнейшем делении формировался двуклеточный проэмбрио, а затем соматический эмбриоид шаровидной формы. На следующем этапе наблюдалось образование сердцевидного эмбриоида и проростка с развитием стебля с зародышевыми листьями. По-видимому, стрессовая ситуация, создаваемая условиями *in vitro*, вызывала реализацию морфогенеза путем соматического эмбриоидогенеза. Возникшие гаметофитные и соматические эмбриоиды, независимо от происхождения, представляли собой зачатки новых организмов и являлись элементарными структурными единицами размножения растений по аналогии с меристематическими клетками (Батыгина, Васильева, 2002; Батыгина и др., 2010). В связи с этим ключевым моментом в процессе микроразмножения *in vitro* созданного растительного материала сахарной свеклы выступает этап индуцирования эмбриоидов.

Известно, что сахарная свекла в естественных условиях размножается только семенным способом и для выживания вида имеет лишь резервный способ вегетативного размножения путем травматической партикуляции. В прошлом веке данный прием широко применялся в селекционной практике для вегетативного размножения корнеплодов – родоначальников (педигри) ценного исходного материала с сохранением наиболее важных признаков: высокой сахаристости, продуктивности, формы корнеплода и др. На сегодняшний день научно доказано, что типы, способы и формы семенного размножения могут определять репродуктивную способность любого вида растений при активном взаимоотношении с вегетативным (Батыгина и др., 2010). Наиболее продуктивны лишь те виды, у которых сочетаются генеративная и вегетативная репродукция. Поэтому использование у сахарной свеклы размножения растений путем микроклонирования может способствовать улучшению репродуктивной способности и повышению как семенной продуктивности, так и других ценных признаков и свойств.

В настоящее время микроразмножение *in vitro* на основе культуры меристем является основным методом для уско-

ренного размножения селекционно ценных материалов и длительного их сохранения (Жужжалова и др., 2018). Применение микроклонирования в практической селекции позволяет сохранить в культуре, размножить и включить в селекционный процесс целый ряд исходных линий с признаками ЦМС, закрепительной способности, гладкой поверхностью корнеплода, плотным расположением семян на семенных растениях и др. (Знаменская, 2010).

Значительный практический интерес имели исследования по использованию микроразмножения и депонирования *in vitro* для улучшения морфогенетического потенциала компонентов гибридов, создаваемых согласно трехлинейной селекционной схеме. Включение в селекционный процесс культуры тканей обеспечивало как повышение репродуктивной способности компонентов создаваемых гибридов, так и получение семян сахарной свеклы улучшенного качества (Колесникова и др., 2018а).

На первом этапе осуществляли выделение элитных генотипов из трех компонентов высокопродуктивного гибрида: линий с цитоплазматической мужской стерильностью, опылителя О-типа с закрепительной способностью ЦМС и фертильного опылителя, способного в F₁ стимулировать эффект гетерозиса. При отборе генотипов применяли экспресс-диагностику по морфологическим и цитозембриологическим признакам, отражающим фазы развития семенных растений, отдельно-сростноцветковость, фертильность пыльцевых зерен, синхронность цветения, плоидность и др. Для введения в культуру *in vitro* отобранных генотипов использовали апексы цветonoсных побегов в количестве 10–20 шт. с одного семенного растения. Основными индукторами развития ростовых побегов из верхушечной меристемы служили гормональные компоненты питательной среды Гамборга и Мурасиге–Скуга (Бутенко, 1964). Присутствие в ростовой питательной среде гормонов роста (6-бензиламинопурина, кинетина и гиббереллина) способствовало образованию до 8 адвентивных побегов на один эксплант; высота регенерантов достигала 60–73 мм. В конце процесса стабилизации сформированные регенеранты имели интенсивно зеленые листья, оптимальное соотношение черешка и листовой пластинки, хорошую кустистость и развитую точку роста. Такие микроклоны успешно формировали множество пазушных побегов, а затем необходимое количество элитных регенерантов ЦМС-формы, О-типа и ОП (Колесникова, Жужжалова, 2018).

Необходимое количество морфологически развитых регенерантов линейных компонентов гибрида параллельно культивировали в коллекции элитных клонов *in vitro* путем депонирования. Это позволяло длительное время сохранять в чистоте линейные компоненты гибрида на уровне первого поколения. Культивирование регенерантов без пересадок осуществляли на безгормональной питательной среде с увеличенным содержанием агара при слабом освещении (500–600 люкс), фотопериоде 16 ч день/8 ч ночь.

Второй этап включал массовое микроразмножение, укоренение регенерантов и получение штекерлинов компонентов гибрида. Для массового размножения элитные регенеранты, прошедшие депонирование, пересаживали на гормональную питательную среду В₅, которая акти-

визировала меристемы и обеспечивала пролиферацию боковых побегов. Многократная пересадка побегов давала возможность создавать необходимое количество микроклонов. Наибольшее число регенерантов получали от раздельноплодных фертильных линий (в среднем 48 побегов на 1 эксплант), наименьшее – от МС-линий и опылителей (16 и 13 побегов соответственно). Следует заметить, что формы с ЦМС оказались очень чувствительными к изменению условий выращивания и погибали чаще по сравнению с фертильными генотипами. Их было сложнее стабилизировать в условиях *in vitro* и в дальнейшем репродуцировать (Колесникова и др., 2018а).

Укоренение регенерантов было связано с индуцированием адвентивных корней, что достигалось изменением гормонального состава питательной среды. Процесс корнеобразования длился 3–4 недели. Полученные микроклоны сахарной свеклы с мощной корневой системой и хорошо развитой надземной частью переводили в нестерильные условия почвенного субстрата, где осуществляли адаптацию микроклонов. Приживаемость микроклонов, их рост и развитие в период адаптации определяли условиями гидратации микроклонов. Создание высокой влажности воздуха после посадки позволяло сохранить 80–100 % микроклонов. Растения, формирующиеся в теплице, характеризовались выровненностью морфологических признаков в пределах линии. Развитые растения линейных компонентов гибрида выращивали в условиях закрытого грунта до формирования штеклингов. Заключительным важным процессом данного этапа была уборка штеклингов и их яровизация, которую осуществляли путем хранения корнеплодов в холодильниках.

На третьем этапе семенные растения, полученные из штеклингов, использовались селекционерами для гибридизации в полевых условиях на отдельных специализированных участках, согласно схемам при получении семян простого гибрида и многосемянного опылителя улучшенного качества (Жужжалова и др., 2017).

Разработка биотехнологических приемов массового размножения и депонирования *in vitro* селекционных материалов сахарной свеклы имеет приоритетное и инновационное значение, так как дает возможность получать линии сахарной свеклы с высокой генетической однородностью и улучшенным качеством семенного материала. Реализация данного приема, в два раза ускоряющего продолжительность селекционного процесса, внесет ощутимый вклад в создание высокопродуктивных гибридов для коммерциализации, а также в семеноводческий процесс, обеспечивая сохранение высоких показателей хозяйственно полезных свойств создаваемого селекционного материала.

Заключение

В данном обзоре мы описываем основные биотехнологические приемы, которые в настоящее время используются для получения и размножения нового исходного материала сахарной свеклы. Инновационным и перспективным в селекционной работе является метод гаплоидного партеногенеза. Исключая многократное самоопыление растений, метод позволил сократить в два раза время создания гомозиготного материала с ценными селекционными

признаками. На его основе созданы линии удвоенных гаплоидов и получены выровненные раздельноплодные семена компонентов гибридов сахарной свеклы.

Существенное значение имели исследования, которые легли в основу методики селективного отбора *in vitro*, повышающего устойчивость регенерантов сахарной свеклы к сильному засолению, засухе и кислотности почвы. Благодаря проведенным исследованиям в течение трех лет были созданы изогенные линии с высокой осмотической устойчивостью к абиотическим факторам внешней среды.

Значительный практический интерес для внедрения в селекцию сахарной свеклы представляет массовое микроразмножение и депонирование *in vitro* элитных компонентов гибридов при использовании трехлинейной селекционной схемы. Этот прием дает возможность не только повысить продуктивную способность семенных растений, но и получать семена сахарной свеклы улучшенного качества.

Внедрение в селекционно-семеноводческий процесс сахарной свеклы данных технологий является приоритетным и инновационным направлением, позволяющим повышать уровень гомозиготности линий и качественные признаки семенного материала при сохранении высокой продуктивности создаваемых гибридов.

Список литературы / References

- Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2004. <http://bookre.org/reader?file=1483744&pg=1>
- [Barykina R.P., Veselova T.D., Devyatov A.G., Dzhililova Kh.Kh., Ilyina G.M., Chubatova N.V. The Handbook of Botanic Microtechniques: Fundamentals and Methods. Moscow: Publ. House of Moscow State University, 2004. Available at <http://bookre.org/reader?file=1483744&pg=1> (in Russian)]
- Батыгина Т.В. Эмбриодогения – новый тип вегетативного размножения. В: Батыгина Т.В. (ред.). Эмбриология цветковых растений: Терминология и концепции. Т. 3. Системы репродукции. СПб.: Мир и Семья, 2000;334-349. <https://www.twirpx.com/file/435188/>
- [Batygina T.V. Embryoidogeny is a new type of a vegetative propagation. In: Batygina T.V. (Ed.). Embryology of Flowering Plants: Terminology and Concepts. Vol. 3. Reproductive Systems. St. Petersburg: Mir i Semya Publ., 2000;334-349. Available at <https://www.twirpx.com/file/435188/> (in Russian)]
- Батыгина Т.В., Васильева В.Е. Размножение растений. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2002.
- [Batygina T.V., Vasilyeva V.E. Plant Reproduction. St. Petersburg: St. Petersburg University Publ., 2002. (in Russian)]
- Батыгина Т.В., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдирирова О.А. От микроспоры – к сорту. М.: Наука, 2010.
- [Batygina T.V., Kruglova N.N., Gorbunova V.Yu., Titova G.E., Sel-dimirova O.A. From a Microspore to a Variety. Moscow: Nauka Publ., 2010. (in Russian)]
- Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964.
- [Butenko R.G. Isolated Tissue Culture and Physiology of Plant Morphogenesis. Moscow: Nauka Publ., 1964. (in Russian)]
- Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК – эпигенетическая регуляция роста и развития растений. В: Биология развития: морфогенез репродуктивных структур и роль соматических, стволовых клеток в онтогенезе и эволюции: Материалы Междунар. конф.,

- посвящ. 50-летию юбилею Лаборатории эмбриологии и репродуктивной биологии БИН РАН (13–16 дек. 2010 г.). М.: Т-во науч. изданий КМК, 2010;41-43.
- [Vanyushin B.F. DNA methylation is an epigenetic regulation of growth and development of plants. In: Development Biology: Morphogenesis of Reproductive Structures and a Role of Somatic, Stem Cells in Ontogenesis and Evolution: Proceedings of the Int. conf. dedicated to the 50th anniversary of the Laboratory of Embryology and Reproductive Biology, Biological Institute of the Russian Academy of Sciences (December 13–16, 2010). Moscow: KMK Association of Scientific Editions. 2010;41-43. (in Russian)]
- Васильченко Е.Н. Индуцирование гаплоидной партеногамии сахарной свеклы в условиях *in vitro*. Сахарная свекла. 2016;6:2-4. [Vasilchenko E.N. Induction of haploid partenogeny of sugar beet *in vitro*. Sakharnaya Svekla = Sugar Beet. 2016;6:2-4. (in Russian)]
- Васильченко Е.Н., Жужжалова Т.П., Ващенко Т.Г., Колесникова Е.О. Технология создания реституционных линий сахарной свеклы. Вестн. ВГАУ. Воронеж, 2018;1(56):42-50. DOI 10.172338/issn2071-2243.2018.1.56. [Vasilchenko E.N., Zhuzhzhhalova T.P., Vashchenko T.G., Kolesnikova E.O. The technology of creating restitution sugar beet lines. Vestnik VGU = Bulletin of Voronezh State Agrarian University. 2018;1(56):42-50. DOI 10.172338/issn2071-2243.2018.1.56. (in Russian)]
- Духовский П., Юкнис Р., Бразайтите А., Жукаускайте И. Реакция растений на комплексное воздействие природных и антропогенных стрессов. Физиология растений. 2003;2:165-173. [Dukhovskiy P., Yuknis R., Brazaitite A., Zukauskaite I. Plant response to integrated impact of natural and anthropogenic stress factors. Fiziologiya Rasteniy = Russ. J. Plant Physiol. 2003;50(2): 147-154.]
- Жужжалова Т.П., Знаменская В.В., Ошевнев В.П., Грибанова Н.П., Колесникова Е.О., Васильченко Е.Н., Черкасова Н.Н. Инновационный прием микроклонирования *in vitro* сахарной свеклы в селекционном процессе. Сахарная свекла. 2017;4:12-18. [Zhuzhzhhalova T.P., Znamenskaya V.V., Oshevnev V.P., Gribanova N.P., Kolesnikova E.O., Vasilchenko E.N., Cherkasova N.N. An innovative method of sugar beet *in vitro* micropropagation in the breeding process. Sakharnaya Svekla = Sugar Beet. 2017;4:12-18. (in Russian)]
- Жужжалова Т.П., Знаменская В.В., Подвигина О.А., Ярмолук Г.И. Репродуктивная биология сахарной свеклы. Воронеж: Сотрудничество, 2006. [Zhuzhzhhalova T.P., Znamenskaya V.V., Podvigina O.A., Yarmolyuk G.I. Reproductive Biology of Sugar Beet. Voronezh: Sotrudnichestvo Publ., 2006. (in Russian)]
- Жужжалова Т.П., Колесникова Е.О., Васильченко Е.Н., Черкасова Н.Н. Аспекты использования микроклонирования в селекции сахарной свеклы. В: Селекционно-генетическая наука и образование (Парижские чтения): Материалы VII междунар. науч. конф., 19–21 марта 2018. Умань, Украина, 2018:78-81. [Zhuzhzhhalova T.P., Kolesnikova E.O., Vasilchenko E.N., Cherkasova N.N. Issues of microcloning use in sugar beet breeding. Proceedings of the VII International Scientific Conference “Breeding and Genetic Science and Education: Pariyskiy readings. March 19–21, 2018. Uman, Ukraine, 2018:78-81. (in Russian)]
- Жужжалова Т.П., Подвигина О.А., Знаменская В.В., Васильченко Е.Н., Карпеченко Н.А., Землянухина О.А. Гаплоидный партеногенез *in vitro* у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.): факторы и диагностические признаки. С.-х. биология. 2016;51(5):636-644. DOI 10.15389/agrobiol.2016.5.636rus. [Zhuzhzhhalova T.P., Podvigina O.A., Znamenskaya V.V., Vasilchenko E.N., Karpechenko N.A., Zemlyanukhina O.A. Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) haploid parthenogenesis *in vitro*: factors and diagnostic characters. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2016;51(5):636-644. DOI 10.15389/agrobiol. 2016.5.636eng.]
- Землянухина О.А., Васильченко Е.Н., Карпеченко Н.А., Жужжалова Т.П., Карпеченко И.Ю., Калаев В.Н. Молекулярно-биохимические признаки гаплоидных и дигаплоидных растений-регенерантов сахарной свеклы. В: Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции Adflim. ActaNaturae (специальный выпуск). 2016;2:59. [Zemlyanukhina O.A., Vasilchenko E.N., Karpechenko N.A., Zhuzhzhhalova T.P., Karpechenko I.Yu., Kalaev V.N. Molecular-biochemical characters of haploid and dihaploid sugar beet regenerant plants. In: Proc. of the V Congress of CIS physiologists, V Congress of Russia biochemists, Adflim Conferences. ActaNaturae (spec. iss.). 2016;2:59. (in Russian)]
- Землянухина О.А., Черкасова Н.Н., Жужжалова Т.П., Калаев В.Н. Биохимические и морфологические признаки кислотоустойчивых растений – регенерантов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). Вестн. ВГУ. Воронеж. 2017;2:59-67. [Zemlyanukhina O.A., Cherkasova N.N., Zhuzhzhhalova T.P., Kalaev V.N. Biochemical and morphological traits of sugar beet acid-resistant plants-regenerants (*Beta vulgaris* L.). Vestnik VGU = Bulletin of Voronezh State University. 2017;2:59-67. (in Russian)]
- Знаменская В.В. Микроклонирование *in vitro* как метод поддержания и размножения линий сахарной свеклы. В: Энциклопедия рода *Beta*. Биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск: Сова, 2010;420-437. [Znamenskaya V.V. *In vitro* microcloning as a method of maintenance and reproduction of sugar beet lines. In: Encyclopedia of *Beta* Genus. Biology, Genetics, and Breeding of Beet. Novosibirsk: Sov Publ., 2010;420-437. (in Russian)]
- Кильчевский А.В., Хотылева Л.В. (ред.). Генетические основы селекции растений. Т. 3. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия. Минск: Беларус. наука, 2012;203-216. [Kilchevskiy A.V., Hotyleva L.V. (Eds.). Genetical Basis of Plant Breeding. Vol. 3. Biotechnology in Plant Breeding. Cell Engineering. Minsk: Belarus. Navuka Publ., 2012;203-216. (in Russian)]
- Козловская В.Ф., Апасов И.В., Жужжалова Т.П., Федулова Т.П. Основные направления и результаты селекции сахарной свеклы в США. Сахарная свекла, 2016;8:35-41. [Kozlovskaya V.F., Apasov I.V., Zhuzhzhhalova T.P., Fedulova T.P. Main directions and results of sugar beet breeding in USA. Sakharnaya Svekla = Sugar Beet. 2016;8:35-41. (in Russian)]
- Колесникова Е.О., Васильченко Е.Н., Черкасова Н.Н. Возможности использования биотехнологических приемов для сахарной свеклы в селекционном процессе. В: Научное обеспечение отрасли растениеводства: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 90-летию РУП «Опытная научная станция по сахарной свекле» (Несвиж, 5–6 сент. 2018 г.). Минск: Беларус. наука, 2018a;40-48. [Kolesnikova E.O., Vasilchenko E.N., Cherkasova N.N. Possibilities of using biotechnology methods for sugar beet in breeding process. In: Scientific Support of Beet-Growing Industry: Proc. of the Int. scientific-practical conf. dedicated to the 90th anniversary of the Sugar Beet Experimental Research Station (Nesvizh, September 5–6, 2018). Minsk: Byelarus. Navuka Publ., 2018a;40-48. (in Russian)]
- Колесникова Е.О., Жужжалова Т.П. Микроклонирование и сохранение линейного материала в селекционном процессе сахарной свеклы. В: Материалы IV(XII) Междунар. ботан. конф. молодых ученых в Санкт-Петербурге 22–28 апреля 2018 года. СПб., 2018;267-268. [Kolesnikova E.O., Zhuzhzhhalova T.P. Microcloning and maintenance of lines material in sugar beet breeding process. In: Proc. of IV (XII) Int. Botanical Conf. of Young Scientists in St. Petersburg, April 22–28, 2018. St. Petersburg, 2018;267-268.]
- Колесникова Е.О., Жужжалова Т.П., Черкасова Н.Н., Васильченко Е.Н. Перспективные технологии культуры изолированных тканей в селекционном процессе сахарной свеклы. Рос. с.-х. наука. 2018b; 6:13-17. DOI 10.31857/S250026270001825-2.

- [Kolesnikova E.O., Zhuzhhalova T.P., Cherkasova N.N., Vasilchenko E.N. Perspective technologies of isolated tissue culture in sugar beet breeding process. Rossiyskaya Selskokhozyaystvennaya Nauka = Russian Agricultural Sciences. 2018b;6:13-17. DOI 10.31857/S250026270001825-2 (in Russian)]
- Косарева И.А. Изучение коллекции сельскохозяйственных культур и диких родичей по признакам устойчивости к токсическим элементам кислых почв. Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции. 2012;170:35-45.
[Kosareva I.A. The study of crops and wild relatives collections for signs of resistance to toxic elements of acid soils. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selektcii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 2012;170:35-45. (in Russian)]
- Ницше В., Венцель Г. Гаплоиды в селекции растений. М.: Колос, 1980.
[Nitzsche W., Wenzel G. Haploids in Plant Breeding. Berlin; Hamburg, 1977. (Russ. ed. Nitsche V., Ventsel' G. G. Gaploidy v selektsii rasteniy. Moscow: Kolos Publ., 1980.)]
- Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988.
[Pausheva Z.P. Workshop on Plant Cytology. Moscow: Agropromizdat Publ., 1988. (in Russian)]
- Сошникова Т.Н., Радюкина Н.Л., Королькова Д.В., Носов А.В. Пролин и функционирование антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Thellungiella salsuginea* при окислительном стрессе. Физиология растений. 2013;60(1):47-60. DOI 10.7868/S0015330313010090.
[Soshnikova T.N., Radyukina N.L., Korolkova D.V., Nosov A.V. Proline and functioning of an antioxidant plant system and cultivated cells of *Thellungiella salsuginea* during oxidative stress. Russ. J. Plant Physiol. 2013;60(1):41-54. DOI 10.1134/S1021443713010093.]
- Черкасова Н.Н., Жужжалова Т.П. Получение осмоустойчивых растений сахарной свеклы в культуре *in vitro*. Сахарная свекла. 2011;7:22-24.
[Cherkasova N.N., Zhuzhhalova T.P. Obtaining osmosis-resistant sugar beet plants under *in vitro* culture. Sakharnaya Svekla = Sugar Beet. 2011;7:22-24. (in Russian)]
- Черкасова Н.Н., Жужжалова Т.П. Моделирование селективных условий *in vitro* для создания форм сахарной свеклы, устойчивых к стрессовым факторам. Сахарная свекла. 2014;6:16-18.
[Cherkasova N.N., Zhuzhhalova T.P. Modeling of *in vitro* breeding conditions to develop sugar beet forms resistant to environment stress factors. Sakharnaya Svekla = Sugar Beet. 2014;6:16-18. (in Russian)]
- Черкасова Н.Н., Жужжалова Т.П., Колесникова Е.О. Создание растений-регенерантов сахарной свеклы, устойчивых к комплексу стрессовых факторов. Сахар. 2018;5:28-30.
[Cherkasova N.N., Zhuzhhalova T.P., Kolesnikova E.O. Development of sugar beet regenerant plants resistant to a set of stress factors. Sakhar = Sugar. 2018;5:28-30. (in Russian)]
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil. 1973;39:205-207. DOI 10.1007/BF00018060.
- Beckmann J.S., Soller M. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. Theor. Appl. Genet. 1983;67:35-43. DOI 10.1007/BF00303919.
- Gürel S., Gürel E., Kaya Z., Erdal M., Güler E. Effects of antimitotic agents on haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Biotechnol. Biotechnol. Equip. 2003;17(2):97-101. DOI 10.1080/13102818.2003.10817065.
- Kikindonov G., Kikindonov Tz., Enchev S. Economical qualities of crosses between doubled haploid sugar beet lines. Agric. Sci. Technol. 2016;8(2):107-110. DOI 10.15547/ast.2016.02.018.
- Lamaoui M., Jemo M., Datla R., Bekkaoui E. Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. Front. Chem. 2018;6:26. DOI 10.3389/fchem.2018.00026.
- Rahnama A., Munns R., Poustini K., Watt M. A screening method to identify genetic variation in root growth response to a salinity gradient. J. Exp. Bot. 2011;62:69-77. DOI 10.1093/jxb/erq359.
- Shabala S., Munns R. Salinity stress: physiological constraints and adaptive mechanisms. In: Shabala S. (Ed.). Plant Stress Physiology. 2nd edn. CABI, 2017;24-64.
- 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.
- Tomaszewska-Sowa M. Effect of growth regulators and other components of culture medium on morphogenesis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) in unfertilised ovule *in vitro* cultures. Acta Agrobotanica. 2012;65(4):91-100. DOI 10.5586/aa.2012.025.

ORCID ID

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.05.2019. После доработки 01.08.2019. Принята к публикации 09.08.2019.