

ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДІВ ТА ДИГАПЛОЇДІВ БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ (*Beta vulgaris* L.) В УМОВАХ IN VITRO

О.Л. КЛЯЧЕНКО,

професор, доктор сільськогосподарських наук

<https://orcid.org/0000-0002-4087-4082>

klyachenko@ukr.net

Національний університет біоресурсів і природокористування України,

Київ, Україна

Л.М. ПРИСЯЖНЮК,

кандидат сільськогосподарських наук

<https://orcid.org/0000-0003-4388-0485>

Український інститут експертизи сортів рослин, Київ, Україна

Анотація. Значну роль в селекційному процесі відіграють біотехнологічні методи, оскільки уможливають з високою ефективністю створювати вихідний матеріал. Пріоритетним напрямом у сучасній інноваційній біотехнології рослин є метод експериментальної гаплоїдії. Підбрано та застосовано ступінчасту передобробку ізольованих бутонів зниженими (+4°C упродовж 36 год) і підвищеними температурами (+22°C упродовж 21 доби та +30°C – 10, 14, 21 діб), яка дає можливість завершення процесу диференціації. Показано, що для індукції ембріогенного розвитку незалежно від генотипу оптимальною виявилася температура +30°C за тривалості культивування упродовж 21 доби. Водночас регенераційна здатність отриманих ембріоїдів обумовлювалась вихідним генотипом. Одержані укорінені гаплоїдні рослини-регенеранти з нормальною гео- і фототропічною реакцією переводили на диплоїдний рівень ($2n=38$) за допомогою дії водного розчину 0,1 % колхіцину на кореневу систему за експозиції 4 год. Встановлено, що створення гомозиготних ліній залежить від генотипних особливостей донорного матеріалу, який визначає кількість отриманих гаплоїдних рослин-регенерантів з різними характерними ознаками. Водночас велике значення має послідовність живильних середовищ для проведення стабілізації гаплоїдних форм. Залежно від морфологічного розвитку регенерантів чередування безгормонального і доповненого фітогормонами живильних сере-

довищ сприяє виживанню рослин у межах 90-95%. Вивчено вплив експантатів на регенераційну здатність гаплоїдних рослин. Показано, що оптимальним для індукування процесів прямого та непрямого морфогенезу *in vitro* є жилки та черешки цукрових буряків. Розроблена нами методика для отримання гаплоїдних рослин безпосередньо із ЧС ліній буряків цукрових дає можливість в короткий термін отримати гомозиготний матеріал, який може бути використано в гетерозисній селекції, оскільки традиційними методами гомозиготність досягається шляхом глибокого інбридингу і появою інбредної депресії.

Ключові слова: цукрові буряки, гаплоїди, дигаплоїди, калюс, рослини-регенеранти.

Вступ.

У селекційно-генетичних дослідженнях широке застосування методів експериментальної гаплоїдії пов'язано, в першу чергу, з можливістю отримання гомозиготного константного матеріалу за одну генерацію із цінних гібридних комбінацій, тоді як у традиційній селекції для цього проводиться декілька поколінь інбридингу [1]. Метод гаплоїдії *in vitro* з послідовним подвоєнням числа хромосом шляхом колхіцинування є одним із сучасних біотехнологічних методів [2]. Застосування одержаних клонів полегшує відбір фенотипів за якісними та кількісними ознаками, дає можливість отримати гомозиготні константні гаплоїдні сорти та гібриди, які зберігають в генотипі господарсько-цінні ознаки вихідних форм і прискорити оцінку їхньої перспективності [1, 3, 4, 5].

Для буряків цукрових як перехреснозапильної культури існують деякі особливості як в селекції, так і в насінництві, оскільки вирощування гібридного матеріалу виявляється комерційно вигіднішим, ніж вирощування сортів. Основною вимогою до батьківських компонентів в гетерозисній селекції буряків цукрових є їхня гомозиготність за більшістю

генів [3, 6], яка в традиційній селекції досягається глибоким інцухтом і ускладнюється наявністю генів, які детермінують систему самонесумісності в рослин [4]. Альтернативним шляхом одержання гомозиготних ліній буряків цукрових є метод індукції гаплоїдів із незрілих зародків в умовах *in vitro* [7, 8, 9], який дає можливість за короткий термін одержувати гомозиготний матеріал практично за всіма генами та в 2-3 рази зменшити строки його створення [10, 11]. Використання клонального мікророзмноження дає змогу швидко розмножити гаплоїди та отримати з них гомозиготні лінії шляхом поліплоїдизації в культурі *in vitro* [12]. Розроблені селективні середовища та умови для зміни рівня геному (диплоїдизація) на основі колхіцинування дозволяють впровадити цей метод у селекційну практику буряків цукрових [13, 14]. Однак, незважаючи на велику кількість експериментальних робіт, присвячених індукуванню гаплоїдів у буряків цукрових, технологія отримання залишається недосконалою в зв'язку з низьким виходом гаплоїдів.

Мета роботи – отримання гаплоїдів та дигаплоїдів буряка цукрового *in vitro* і застосування в селекційній практиці.

Матеріали та методи досліджень.

Робота виконана в лабораторії біотехнології рослин Національного університету біоресурсів і природокористування України за участю спеціалістів лабораторії молекулярно-генетичного аналізу Українського інституту експертизи сортів рослин в 2017-2019 рр. Матеріалом досліджень слугували бутони буряків цукрових вирощені в польових умовах. Дослідження проводили на 3 генотипах: чоловічостерильні лінії буряків цукрових ЧС 1628, БЧС 42 та RR 230. Із кожного селекційного номера використовували від 3 до 7 рослин. Повторність досліду трикратна. Всього вводили в культуру *in vitro* приблизно 100 незапліднених насінневих зачатків кожного генотипу. Відбір зразків проводили в літній період (липень-серпень). У роботі притримувались загальноприйнятих принципів стерилізації посуду, живильних середовищ та інструментів [15].

Холодову передобробку бутонів проводили за температури 3-5°C протягом 3-5 діб. Для стерилізації експлантатів використовували 0,5% розчин сулеми з експозицією 10 хв і тричі по 15 хв промивали стерильною дистильованою водою [16]. Насінневі зачатки вичленяли в стерильних умовах ламінар-боксу під бінокулярним мікроскопом ($\times 15$) за допомогою гострої голки. Обсяг вибірки становив 100 незапліднених насінневих зачатків для кожного дослідженого генотипу.

Для отримання гаплоїдних рослин насінневі зачатки переносили на агаризоване середовище Мурасіге-Скуга (МС) [17] з додаванням 2,4-Д та 6-БАП в різних концентраціях.

Контролем слугувало безгормональне живильне середовище МС. Експлантати культивували упродовж 14 діб за регульованої температури 20-23°C в термостаті, без освітлення.

Утворені структури пересаджували на модифіковані живильні середовища МС: з додаванням 1) 0,3 мг/л 2,4-Д і 0,5 мг/л 6-БАП; 2) МС + 0,8 мг/л 2,4Д; 3) МС + 0,4 мг/л 2,4Д + 0,25 мг/л 6-БАП для регенерації або розмноження брунькуванням. Ембріогенну здатність експлантатів визначали через кожні 15 діб. Культивування калюсних тканин здійснювали в умовах темряви за регульованої температури 23-25°C і відносної вологості 70-80%. Проростки культивували в світловій культуральній кімнаті за температури 23-25°C та 16-годинному фотоперіоді. Етап стабілізації гаплоїдів здійснювали на безгормональному і органогенному (доповненому, цитокінінами і ауксинами) живильних середовищах МС упродовж чотирьох тижнів їхнього культивування в кожному пасажі.

Отримані гаплоїдні рослини-регенеранти переводили на диплоїдний рівень в умовах *in vitro* на безгормональному живильному середовищі МС з додаванням 0,005-0,05% водного розчину колхіцину. Культивування рослин-регенерантів проводили впродовж двох діб в абсолютній темряві за температури 23-25°C. Потім рослини переносили на середовище МС, доповнене 0,25 мг/л БАП для збільшення кількості плідних клітин і культивували за 16-годинного фотоперіоду. Рівень плідності визначали на цитофлуоресційному фотометрі Partec (Німеччина). Статистичну обробку результатів одержаних експериментальних даних здійснювали з використанням паке-

ту програм «Аналіз електронних таблиць Microsoft Excel», Statistica 6.0.

Результати та обговорення.

Гіногенез є практично єдиним експериментальним способом отримання гаплоїдів у чоловічостерильних генотипів. Для експлантації відбирали не розкриті бутони з верхніх, середніх та нижніх ярусів центрального квітконосного пагону рослин, які вирощувались в польових умовах. Холодову передобробку бутонів проводили за температури 3-5°C упродовж 3-5 діб, витримуючи гілки з квітами в холодильній камері. Нами вивчена здатність незапліднених насінневих зачатків до індукції гаплоїдії в культурі *in vitro* залежно від розміщення бутонів на квітконосі. Квітконосні рослини буряку цукрового другого року життя мають центральний пагін з боковими гілками, які щодо центрального мають ярусний характер. За результатами наших досліджень найбільшу схильність до індукції гаплоїдії мають насінневі зачатки з центрального пагону. Водночас вихід гаплопродуктів в 1,5 рази вище порівняно з експлантацією насінневих зачатків із бокових гілок (табл.1).

Отримані результати можливо пов'язані з підвищеною фізіологічною активністю всіх біохімічних і фі-

зіологічних процесів, що проходять в основних пагонах рослини буряку цукрового. Отже, під час відбору донорського матеріалу для індукції гаплоїдії доцільно використовувати морфологічну оцінку квітки, а для масового отримання гаплоїдів і зниження травмування експлантатів необхідно використовувати центральний квітконосний пагін буряку цукрового.

Відомі на сьогодні дослідження щодо оптимізації технології одержання гаплоїдів буряків цукрових в культурі *in vitro* незапліднених насінневих зачатків свідчать про значний вплив на вихід гаплоїдів вмісту ІОК, БАП або кінетину в живильному середовищі, особливо на фоні різних концентрацій сахарози. Відмічається також достовірний вплив сезонності (червень) для ізолювання і введення в культуру експлантатів та генотипу на їхні процеси регенерації [12, 18]. В інших дослідженнях кращі результати одержано на середовищі МС з БАП і НОК, де максимальна регенерація рослин досягала 18%. Водночас спостерігалась висока варіабельність індукції гаплоїдів не тільки між лініями цукрових буряків, але і між окремими генотипами всередині ліній [19].

У наших дослідженнях до живильного середовища МС додавали 6-БАП та 2,4D у різних концентраціях, переносили утворені структури

1. Частота формування гаплоїдів під час культивування насінневих зачатків, виділених із бутонів різних ярусів

Ярус квітконоса	Висаджено насінневих зачатків, шт.	Отримано рослин-регенерантів	
		шт.	%
Верхній	141	35	2,5
Центральний пагін	214	14	4,5
Нижній	155	39	2,5
НІР ₀₅		1,5	0,2

2. Вплив 6-БАП на розвиток насіннєвих зачатків цукрових буряків

Варіант середовища	Повторність	К-сть насіннєвих зачатків, шт.	Кількість отриманих структур					
			Всього		Калюс		Проростки	
			шт.	%	шт.	%	шт.	%
1. МС+0,5мг/л	1	250	25	10,0	23	9,1	2	0,9
6-БАП+0,1мг/л	2	205	21	10,2	20	9,7	1	0,5
2,4Д	3	175	19	11,0	17	9,7	2	1,3
2. МС+1мг/л	1	225	6	2,7	3	1,3	3	1,3
6-БАП+0,1мг/л	2	168	2	1,2	1	0,6	1	0,6
2,4Д	3	147	6	4,0	2	1,5	4	2,5
3. МС+1,5мг/л	1	370	5	1,4	-	-	5	1,4
6-БАП+0,1мг/л	2	356	3	0,9	-	-	3	0,9
2,4Д	3	300	6	1,9	-	-	6	1,9
НІР ₀₅			0,5	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1

3. Вплив 2,4 Д на розвиток насіннєвих зачатків цукрового буряку

Варіант середовища	Повторність	К-сть насіннєвих зачатків, шт.	Кількість отриманих структур					
			Всього		Калюс		Проростки	
			шт.	%	шт.	%	шт.	%
1МС+0,5мг/л	1	500	58	11,6	54	10,8	4	0,2
6-БАП+0,1мг/л	2	615	51	8,3	47	7,6	4	-
2,4Д	3	601	73	12,2	66	11,0	7	0,4
2МС+1мг/л	1	540	139	25,8	138	25,6		1,3
6-БАП+0,5мг/л	2	589	118	20,0	118	20,0	1-	0,6
2,4Д	3	500	176	35,2	174	34,8	2	2,5
3МС+1,5мг/л	1	620	268	43,2	268	43,2	-	-
6-БАП+1мг/л	2	754	292	38,8	292	38,8	-	-
2,4Д	3	705	356	47,6	356	47,6	-	-
НІР ₀₅			8,5	1,3	8,4	1,3	0,1	0,02

та культивували їх за фотоперіоду 16 год, підвищений інтенсивності освітлення до 5 тис. люкс, що стимулювало швидкість розвитку і кількість гіногенних гаплоїдів. Встановлено, що збільшення концентрації цитокінів від 0,5 до 1 мг/л збільшує кількість проростків, проте зменшує вихід калюсної маси (табл. 2). Більш високі концентрації 6-БАП інгібують процес органогенезу.

Робочим діапазоном концентрацій цитокінінів є 0,5-1мг/л, що стимулює розвиток насіннєвих зачатків. За даних концентрацій ріст активуючих

речовин в середовищі, вихід проростків збільшується від 0,9 до 6%. Більш низькі концентрації 6-БАП не вказують на відповідність впливу на утворення і розвиток макроструктур. У разі підвищення в живильному середовищі концентрації цитокінінів вихід калюсних тканин достовірно знижується. Перевагою методу культури ізольованих насіннєвих зачатків є можливість індукції деяких елементів апоміксису.

Під час вивчення нами варіювання вмісту 2,4Д у живильному середовищі в межах від 01 мг/л до 1 мг/л спо-

4. Вплив регуляторів росту на формування гапліодних проростків цукрових буряків

Варі- ант	Склад середовища	Кількість експлантатів, шт.	Число сформованих структур	
			калюси	проростки
1	МС+0,8 мг/л 2,4Д	220	200±9,1	-
2	МС+0,4 мг/л 2,4Д+0,25 мг/л 6-БАП	220	80±3,2	120±5,4
3	МС+0,3 мг/л 2,4Д+0,5 мг/л 6-БАП	220	-	190±9,2

5. Індукція гапліодів за різних умов культивування

Умови освітлення	Кількість насіннєвих зачатків	Отримано			
		регенерантів		калюсів	
		шт.	%	шт.	%
Фотоперіод 16 год	146	32	2,2	62	4,2
Темрява	131	15	1,1	39	3,0
НІР ₀₅		1,8	0,08	2,5	0,2

стерігався негативний вплив ауксинів на утворення проростків (табл. 3).

З представлених даних можна бачити, що за збільшення вмісту 2,4Д в середовищі вихід проростків знижується до 0. Присутність в живильному середовищі 2,4Д в межах 0,1-1 мг/л стимулює калюсогенез із насіннєвих зачатків. Для індукції гіногенних калюсів та ембріодів у культурі незапліднених насіннєвих зачатків обов'язковою є присутність 2,4Д або НОК в живильному середовищі, тоді як проростання отриманих ембріодів проходить краще на безгормональних середовищах. Проведені дослідження показали, що для індукції розвитку насіннєвих зачатків в проростки, оптимальним варіантом живильного середовища є середовище МС з додаванням 0,1мг/л 2,4Д і 1 мг/л 6-БАП. Отже, використовуючи однорідне середовище для культивування насіннєвих зачатків і варіюючи концентраціями регуляторів росту,

часто можна визначити шлях розвитку експлантату в культурі *in vitro*.

У разі вивчення трьох варіантів складу живильного середовища для культивування незапліднених насіннєвих зачатків та індукції проростків встановлено, що оптимальним є середовище МС з додаванням 0,3 мг/л 2,4-Д і 0,5 мг/л 6-БАП. Сумісна дія 6-БАП і 2,4Д на регенераційну здатність незапліднених насіннєвих зачатків проявлялась в стимулюванні непрямого морфогенезу (утворення калюсу та подальшої індукції пагонів) (табл.4).

Доповнення живильного середовища 2,4-Д в концентрації 0,3 мг/л призводило до утворення неморфогенного калюсу. Варіювання гормонального складу живильного середовища зумовило появу двох напрямків морфогенезу незапліднених насіннєвих зачатків: пряму регенерацію (ембріогенез), непряму регенерацію через калюсогенез та утво-

рення неморфогенного калюсу. Під час вивчення умов культивування насінневих зачатків встановлено, що в умовах темряви проходить пригнічення експлантатів, які розвиваються і кількість регенерантів скорочується вдвічі, що складає 1,1% (табл. 5).

Освітлення стимулює появу проростків через 4-5 тижнів культивування. В умовах темряви перші проростки з'явились на 3-4 тижні пізніше. Регенераційна здатність експлантатів, які культивуються за 16-годинного фотоперіоду залежить від фізіологічного стану і генотипних особливостей донора, що пов'язано з умовами вирощування і обмінними процесами, які проходять в рослинному організмі.

У процесі культивування незапліднених насінневих зачатків буряка цукрового в культурі *in vitro* формувались макроструктури, що відрізнялись за морфологічними ознаками. Їх умовно можна було підрозділити на декілька типів: проростки з нормально розвиненим первинним корінцем, гіпокотилем і сім'ядолею; первинний корінь не розвинутий або слабо розвинутий, нормально розвинуті гіпокотилі і сім'ядолі; первинний корінець не розвинений, гіпокотиль розрісся, ущільнений, укорочений, сім'ядолі ущільнені продовгуваті і дрібні; калюс ущільнений або пухкий, коричневого або темно-зеленого кольору; калюс з обмеженою морфогенною здатністю. У разі перепасирування на живильне середовище спостерігається утворення проростків або вторинного калюсу, на якому проходить стебловий органогенез. Інколи спостерігається морфогенез без перепасирування калюсу на регенераційні середовища. Перші три типи структур складали 61,35% від загального

числа утворень, із яких в основному, отримані гаплоїдні рослини. Проростки, отримані в процесі культивування насінневих зачатків перенесли на живильні середовища для розмноження і укорінення.

Для вивчення морфогенетичного потенціалу калюсних тканин і розвитку рослин-регенерантів нами протестовано близько 10 варіантів живильних середовищ, які відрізнялись за вмістом мінеральних солей, співвідношенням ауксинів, цитокінів, вітамінів. Як показали дослідження, реакція калюсних тканин була різною і залежала від генотипу рослин. Так, за умов перепасирування їх на живильне середовище МС з додаванням 0,5 мг/л 6-БАП, 0,5 мг/л ІОК, 0,4 мг/л тіаміну, 30 г/л сахарози утворювався вторинний калюс. Процес органогенезу не спостерігався. Найбільш вдалим для морфогенезу у калюсних тканинах різних генотипів буряку цукрового виявилось середовище МС доповнене 1 мг/л 6-БАП, 0,5 мг/л кінетину, 0,2 мг/л НОК, 1 мг/л вітамінів по Уайту, 30 мг/л сахарози. Відсоток регенерації, в середньому, за генотипами становив 22,4% (табл. 6). Водночас вже на другий тиждень культивування відмічається регенерація великої кількості пагонів, бічних бруньок та мікророзеток.

Отже, виділені типи структур, які можуть формуватися під час розвитку насінневих зачатків в культурі *in vitro*. Показано шляхи їхнього перетворення під час культивування на різних живильних середовищах. Слід відмітити, що для збільшення виходу гаплоїдів необхідною умовою є одержання прямої регенерації проростків безпосередньо із насінневих зачатків, оминаючи стадію калюсоутворення. Водночас враховуючи, що росли-

6. Регенерація пагонів із калюсних ліній ЧС форм буряків цукрових

Донорний генотип	Кількість висаджених експлантів, шт.	Регенерація пагонів із калюсу, %	Довжина пагону, мм	Число пагонів, шт.
ЧС 1628	50	36	10	20
БЧС 42	50	24	8	18
RR 230	50	28	8	18
НСР ₀₅		1,4	0,6	0,9

7. Частота прямої регенерації гаплоїдних рослин залежно від походження експлантату (лінія RR 230)

Варіант	Експлантат	Кількість висаджених експлантатів, шт.	Регенерація рослин						Калюсоутворення		Некроз експлантату	
			пряма		через ущільнений експлантат		Всього					
			шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
1	Листок	65	—	—	—	—	—	—	33	50,7	32	49,3
	Жилка	65	—	—	—	—	—	—	34	52,3	31	47,7
	Черешок	65	7	10,8	2,1	32,3	2,8	43,1	16	24,6	21	32,3
2	Листок	50	—	—	—	—	—	—	21	42,0	29	58,6
	Жилка	50	—	—	—	—	—	—	24	48,0	26	52,0
	Черешок	50	4	8,0	15	30,0	19	38	13	26,0	18	36,0
3	Листок	60	—	—	—	—	—	—	17	28,3	43	71,7
	Жилка	60	—	—	—	—	—	—	20	33,3	40	66,7
	Черешок	60	—	—	—	—	—	—	19	-	41	68,3
НІР ₀₅			0,2	0,5	0,4	1,5	0,5	2,0	1,1	1,9	1,6	2,7

ни-регенеранти отримані із калюсних тканин не завжди мають гаплоїдну природу.

Для одержання потрібної кількості гаплоїдних рослин буряка цукрового нами використано пряму регенерацію рослин в культурі *in vitro*. Здатність до регенерації визначається генотипом вихідного матеріалу та експлантатом. В наших дослідженнях в якості експлантів використано і проаналізовано окремо листок і черешок. Експлантати поміщали на живильні середовища таким способом, щоб нижня частина листка доторкалась до середовища, а черешки наполовину занурювали в живильне середовище. В нульовому пасажі визначали відсоток калюсоутворення

і прямої регенерації. Результати представлені в таблиці 7.

Калюс утворювався на всій верхній листовій черешку і листовій жилці, мав зелене або світло-коричневе забарвлення, трохи пухку або щільну консистенцію.

З літературних джерел відомо, що інтенсивна регенерація пагонів буряків цукрових спостерігається з тканин стеблових сегментів, черешків, а також у разі поранення центральної жилки листової пластинки [22]. Для вивчення прямої регенерації пагонів як експлантат використовували черешки, що мають високу органогенну здатність, які культивували на модифікованому середовищі МС, доповненому 0,1-0,3 мг/л ІОК,

8. Пагоноутворення в гаплоїдних ліній буяків цукрових із експлантатів

Час обліку	Донорний генотип	Число пагонів довжиною, см			Всього пагонів, шт.
		1-2,9	3-4,9	5 і вище	
Кількість пагонів через 3 тижні культивування, шт.	ЧС 1628	32	16	2	50
	БЧС 42	30	15	3	48
	RR 230	37	13	4	54
Кількість пагонів через 6 тижнів культивування, шт.	ЧС 1628	43	22	8	73
	БЧС 42	45	21	7	73
	RR 230	49	28	5	82
НІР ₀₅		1,83	1,2	0,95	3,6

0,5-0,8 мг/л 6-БАП, 1-2 мг/л ГК, 10 мг/л глютаміну. Живильне середовище для пагоноутворення містило речовину групи цитокинінів 6-БАП в концентрації 0,5-0,8 мг/л, яке викликає інтенсивне утворення бруньок і численних пагонів, які формувались упродовж двох тижнів. Через 3-6 тижнів культивування проводили облік пагоноутворення (табл. 8). Максимальна кількість пагонів спостерігалась у генотипу RR 230.

У результаті проведених досліджень були виділені морфогенні калюси, у яких здатність до регенерації пагонів *in vitro* зберігалась упродовж 3-4 років.

Регенеранти майже всіх генотипів відрізнялись за морфологічними ознаками: забарвленням і формою листків, довжиною і забарвленням черешка, висотою рослин. Аналіз хромосомного набору рослин-регенерантів проводили в точках росту рослин.

Як правило, плідність рослин визначають за вмістом ДНК, кількістю хлоропластів в протидіах. Плідність отриманих проростків визначали за допомогою цитологічного аналізу на проточному цитофлуориметрі Partec (Німеччина).

Регенеранти, які пройшли період стабілізації і оцінку плідності ви-

користовували як матеріал для створення гаплоїдних ліній. Використовуючи мікроклональне розмноження кількість гаплоїдів доводили до необхідного рівня, при цьому коефіцієнт розмноження становив 1,5-1,75 рослин на одну пробірку залежно від генотипу. Подальше вивчення морфологічного розвитку рослин гаплоїдних ліній показало, що характерними ознаками є довжина черешків рослин, низькорослість та звуженість листових пластинок, що характерно для гаплоїдів.

Отже, створення гомозиготних ліній залежить від генотипних особливостей донорного матеріалу, який визначає кількість отриманих гаплоїдних рослин-регенерантів з різними характерними ознаками. Водночас велике значення має послідовність живильних середовищ для проведення стабілізації гаплоїдних форм. Залежно від морфологічного розвитку регенерантів чередування безгормонального і доповненого фітогормонами живильних середовищ сприяє виживанню рослин в межах 90-95%.

Відомо, що штучна поліплоїдизація займає значне місце в селекційних програмах зі створення нового вихідного матеріалу та у разі створення комерційних сортів [7, 14].

Найчастіше для створення дигаплоїдів використовують колхіцин, який впливає на поділ клітин рослини. Дослідженнями підтверджено, що експериментальне подвоєння числа хромосом у гаплоїдів – ефективний шлях отримання гомозиготних диплоїдних ліній у селекції буряків цукрових [20]. Для досягнення цієї мети використовують різні способи обробки колхіцином: замочування сухого насіння в розчині колхіцину, обробка замочених або накілчених насінин, повне занурення проростків або молодих рослин у розчин колхіцину, занурення кореневої системи рослин у розчин колхіцину, нанесення розчину на конус наростання, обробка в умовах *in vitro* [12]. Вченими визначено оптимальний склад селективних середовищ та умови для зміни рівня геному (диплоїдизація) на основі колхіцинування, які дають можливість впроваджувати цей метод створення гомозиготних матеріалів у селекційну практику [21, 22]. Отримання дигаплоїдів буряків цукрових тим часом проводиться внаслідок додавання колхіцину в живильне середовище або обробкою його розчином кореневої системи рослин-регенерантів перед перенесенням в ґрунт або апексів рослин, що росли в ґрунті.

Нами застосовано технологію переведення гаплоїдів на дигаплоїдний рівень в умовах *in vitro* на живильних середовищах з додаванням 0,005% колхіцину. Водночас виживання рослин буряків цукрових в середньому складало 87,8%, а вихід дигаплоїдів – 62%.

Висновки і перспективи

Створення гомозиготних ліній залежить від генотипних особливостей

донорного матеріалу, який визначає кількість отриманих гаплоїдних рослин-регенерантів з різними характерними ознаками. Тим часом велике значення має послідовність живильних середовищ для проведення стабілізації гаплоїдних форм. Залежно від морфологічного розвитку регенерантів чергування безгормонального і доповненого фітогормонами живильних середовищ сприяє виживанню рослин в межах 90-95%. Розроблена нами методика для отримання гаплоїдних рослин безпосередньо із ЧС ліній буряків цукрових дає можливість в короткий термін отримати гомозиготний матеріал, який може бути використаний в гетерозисній селекції, оскільки в традиційними методами гомозиготність досягається внаслідок глибокого інбридингу і появою інбредної депресії.

References

1. Kovalchuk, N., Roik, M., Hadzalo, Y., Nediak, T., & Zinchenko, O. (2019). Improvement of the technology of obtaining stable (di) haploid regenerants from embryonic culture of apomictic sugar beet (*Beta vulgaris*) breeding material without the use of colchicine. *Agricultural Science and Practice*, 6 (2), 3-17. <https://doi.org/10.15407/agrisp6.02.003>
2. Bochkareva, E.B., Horlova, L.A., Serdyuk, V.V., Strelnikov, E.A. (2019). Breeding value of dihaploid spring rapeseed rape (*Brassica napus* L.). *Oil crops*, 4 (180), 18-22. <https://doi.org/10.25230/2412-608X-2019-4-180-18-22>
3. Tomaszewska-Sowa, M., & Keutgen, A. J. (2022). Plant regeneration from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) on growing media with different carbohydrates. *Sugar Tech*, 24(2), 542-550. <https://doi.org/10.1007/s12355-021-00975-7>

4. Nohzadeh Malakshah, S., Habibi Rezaei, M., Heidari, M., & Hosseini Salekdeh, G. (2007). Proteomics reveals new salt responsive proteins associated with rice plasma membrane. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(9), 2144-2154. <https://doi.org/10.1271/bbb.70027>
5. Belynskaya, E. V. (2007). Creation of a collection of barley traits based on the ability to androgenesis in vitro and its use in genetic and biotechnological research. *Visn. Ukraine t-va geneticists and breeders*. 5 (1, 2), 11-20.
6. Balkov, I. Ya. (1990). CMS of sugar beet. M.: Agropromizdat, 239.
7. Klyachenko, O. L. (2011). Features microclonal reproduction of O-types of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). In *Sugar Beet Crops: Growth, Fertilization & Yield* (pp. 173-179).
8. Batygina, T.B., Vasilyeva, V.E. (2002). Reproduction of plants. S.-Pub.: Izd-stvo St. Petersburg University, 232.
9. Tomaszewska-Sowa, M., & Olszewska, D. (2019). Evaluation of genetic stability of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants obtained from unfertilized ovules using RAPD markers. *Journal of Central European Agriculture*, 20(3), 928-937. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/20.3.2175>
10. DellaPenna, D., & Pogson, B. J. (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annual review of plant biology*, 57 (1), 711-738. <https://doi.org/10.1146/>
11. Satarova, T. N., Cherchel, V. Yu., Cherenkov, A. V. (2013). Maize: biotechnological and breeding aspects. Dnipropetrovsk: New Ideology, 552
12. Podvigina, O. A. (2010). Induction of haploidy from unfertilized ovules of sugar beet under in vitro conditions. In *Encyclopedia of the genus Beta. Biology, genetics and selection of beets* (p. 455).
13. Seguí-Simarro, J. M., & Nuez, F. (2007). Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by in vitro culture of tomato isolated microspores and whole anthers. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 1119-1132. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl271>
14. Pazuki, A., Aflaki, F., Gürel, S., Ergül, A., & Gürel, E. (2018). The effects of proline on in vitro proliferation and propagation of doubled haploid sugar beet (*Beta vulgaris*). *Turkish Journal of Botany*, 42(3), 280-288. <https://doi.org/10.3906/bot-1709-14>
15. Klyachenko, O. L., & Melnychuk, M. D. (2014). *Biotechnology and agriculture: Study guide*. Vinnytsia, 265
16. Klyachenko, O. L. (2002). Morphogenesis in vitro unfertilized ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Bulletin of the State Nikitsky Botanical Gardens*, 86, 30-32.
17. Skoog, F., Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473-497.
18. Dragunova, O. K. (2005). Induction of halo parthenogenesis under in vitro culture conditions in sugar beet. *Collection of scientific works [Sugar Beet Institute of the Ukrainian Academy of Sciences]*, (8), 411-418.
19. Zhuzhzhhalova, T. P., Podvigina, O. A., & Znamenskaya, V. V. (2010). Ways of reproduction of a new organism of sugar beet in in vitro culture. In *Sat.: Encyclopedia of the genus Veta. Biology, genetics and selection of beets (researcher of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences)*. Novosibirsk, 403-419.
20. Grigolava, T. R., Vishnyakova, A. V., Sinit-syna, A. A., Voronina, A. V., Zubko, O. N., Zudova, O. V., & Monakhos, S. G. (2021). Methodological approaches for producing doubled haploids in sugar beet and red beet (*Beta vulgaris* L.). *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 25(3), 276. <https://doi.org/10.18699/VJ21.031>
21. Finch-Savage, B. (2013). *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy* (3rd edition) -JD Bewley, KJ Bradford, HWM Hilhorst H. Nonogaki. 392 pp. Springer-

- er, New York-Heidelberg-Dordrecht-London 2013978-1-4614-4692-7. Seed Science Research, 23(4), 289-289. <https://doi.org/10.1017/S0960258513000287>
22. Pazuki, A., Aflaki, F., Gürel, E., Ergül, A., & Gürel, S. (2018). Gynogenesis induction in sugar beet (*Beta vulgaris*) improved by 6-benzylaminopurine (BAP) and synergized with cold pretreatment. Sugar Tech, 20(1), 69-77. <https://doi.org/10.1007/s12355-017-0522-x>

Kliachenko O., Prysiazhnuk L. (2022).

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHANGES OF TOMATO PLANTS UNDER BACTERIAL INFLUENCE OBTAINING HAPLOIDS AND DIHAPLOIDS OF SUGAR BEET (*Beta vulgaris* L.) IN VITRO CONDITIONS

BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 13(3-4): 34-45.

<http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/article/view/16702>

[https://doi.org/10.31548/biologiya13\(3-4\).2022.004](https://doi.org/10.31548/biologiya13(3-4).2022.004)

Abstract. Biotechnological methods play a significant role in the breeding process, as they have a mechanism to develop parent material with high efficiency. The priority approach in modern innovative plant biotechnology is the method of experimental haploidy. The stepwise pretreatment of isolated buds with reduced (+4°C for 36 hours) and increased temperatures (+22°C for 21 days and +30°C – 10, 14, 21 days) was selected and applied, which ensures to complete the differentiation process. It was shown that for the induction of embryogenic development, regardless of the genotype, the optimal temperature was +30°C for the cultivation for 21 days. At the same time, the regenerative capacity of the obtained embryos depended on the initial genotype. The obtained rooted haploid regenerant plants with normal geo- and phototropic reaction were transferred to the diploid level (2n=38) by treatment the root system of an aqueous solution of 0.1% colchicine for 4 hours. It was found that the creation of homozygous lines depends on genotypic characteristics of the donor material, which defines the number of haploid regenerant plants obtained with various specific features. In this case, the sequence of nutrient media for the stabilization of haploid forms is strong important. Depending on the regenerants morphological development, the alternation of hormone-free and media supplemented with phytohormones contributes to the survival of plants in the range of 90-95%. The explants influence on the regenerative capacity of haploid plants was studied. It is shown that the nerves and leafstalks of sugar beet are optimal for inducing the processes of direct and indirect morphogenesis in vitro. The developed method for obtaining haploid plants directly from CMS lines of sugar beets makes it possible to obtain homozygous material in a short time. These materials can be used in heterosis breeding process, since homozygosity is achieved by traditional methods through inbreeding and the appearance of inbred depression.

Keywords: sugar beet, haploids, dihaploids, callus, regenerant plants