

Ускоренное получение НОВЫХ ГОМОЗИГОТНЫХ ЛИНИЙ сахарной свёклы (*B. vulgaris* L.)

Е.Н. ВАСИЛЬЧЕНКО, ст. научн. сотрудник

Т.П. ЖУЖЖАЛОВА, гл. научн. сотрудник, д-р биолог. наук, профессор

Е.О. КОЛЕСНИКОВА, ст. научн. сотрудник, канд. биолог. наук

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»

(e-mail: biotechnologiya@mail.ru)

Введение

На современном этапе развития сельскохозяйственного производства приоритетным направлением в селекции сахарной свёклы является создание высокопродуктивных гибридов на линейной основе. Поэтому селекционная работа обычно направлена на продолжительный повторяющийся отбор самоопылённых линий по выравненности морфологических признаков при длительном сохранении хозяйственно полезных свойств (урожайность, сахаристость) и улучшенном качестве семян. Однако используемые методы селекции довольно долговременны и трудоёмки как при получении самоопылённых линий, так и при проведении гибридизации. Это обусловлено прежде всего двухлетним циклом развития растений, инбредной депрессией, явлением само- и перекрёстной несовместимости, вызывающими трудности при сохранении генетической однородности созданного исходного материала.

Большая экономическая значимость сахарной свёклы в России в настоящее время требует внедрения в селекционный процесс нетрадиционных биотехнологий на основе методов культуры изолированных органов и тканей, позволяющих целенаправленно по-

лучать генетически улучшенный исходный материал для создания перспективных гибридов нового поколения. Данные технологии могут быть реализованы лишь с учётом специфики морфогенетических потенций развития органов растений, обеспечивающих в условиях *in vitro* активные процессы морфогенеза, регенерации и размножения.

Наиболее признанным технологическим подходом для селекции сахарной свёклы на сегодняшний день является метод гаплоидного партеногенеза, обеспечивающий ускоренное создание гомозиготных линий удвоенных гаплоидов (DH – double haploid). Данный метод, широко применяемый в большинстве развитых стран, ускоряет в два раза процесс создания гибридов с хозяйственно ценными признаками по сравнению с классическими методами селекции. Интерес представляют технологические показатели селекционного материала, созданного с использованием удвоенных гаплоидов сахарной свёклы в Беларуси, демонстрирующие положительные результаты селекции на уровне (или выше) обычных гетерозиготных гибридов. При испытании было установлено статистически достоверное превышение по признакам урожайности (43–45 т/га) и саха-

ристости (20,9 и 21,1 %) по сравнению с диплоидным стандартом [1]. Многолетнее изучение гибридов с использованием ДН-линий, созданных в Болгарии, показало также довольно высокие результаты продуктивности в сравнении с обычными гибридами. По урожаю корнеплодов превышение контроля у дигаплоидных гибридов составило 11,4–13,7 %, а сбор сахара в основном варьировал на уровне стандарта [2]. Данные результаты представляют значительный практический интерес и стимулируют внедрение в селекционный процесс нетрадиционных технологий на основе методов культуры тканей для ускоренного получения генетически улучшенного исходного материала и создания высокопродуктивных гибридов сахарной свёклы, что является актуальным направлением исследований.

Материалы и методы

В ходе экспериментов использовали селекционные материалы лаборатории ЦМС и лаборатории исходного материала ФГБНУ ВНИИ сахарной свёклы и сахара им. А.Л. Мазлумова.

Отбор растительного материала для исследований проводили на основе фенотипических, морфологических и цитоэмбриоло-

гических маркерных признаков. Генотипы *B. vulgaris* L. характеризовались высокой урожайностью, сахаристостью и устойчивостью к стрессовым факторам окружающей среды. Важным условием являлся выбор исходных растений-доноров по фенотипическим характеристикам, включающим морфологическое строение семенных кустов, оптимальное развитие соцветий, бутонов, семязачатков.

В качестве эксплантов для введения в культуру *in vitro* использовали неоплодотворённые семязачатки, изолированные из семенных растений сахарной свёклы в период бутонизации и начала цветения. Культивирование эксплантов осуществляли на питательной среде Гамборга разной консистенции (жидкая и твёрдая фазы) [3], разным составом желирующих веществ (агар, gelrite) с добавлением ауксинов и цитокининов в различных сочетаниях [4]. Освещение культивируемых эксплантов проводили в течение 16 часов при освещённости 10 тыс. люкс при 26 °С. Определение ploидности у регенерантов сахарной свёклы осуществляли методом проточной цитофотометрии на анализаторе ploидности фирмы Partec.

Результаты исследований

Экспериментальные исследования позволили изучить все аспекты индукции гаплоидного партеногенеза *in vitro* и определить оптимальные условия культивирования эксплантов [5]. Использование в качестве эксплантов неоплодотворённых семязачатков, расположенных в бутоне на центральном колосе кистевидной части соцветия (плейохазия), позволило индуцировать гаплоидные регенеранты. Формирование гаплоидных эмбриоидов в условиях *in vitro* наблюдается на всех этапах развития ядер зародышевого мешка. Наибольшую актив-

ность проявляли семязачатки, содержащие в зародышевых мешках 8 гаплоидных ядер или 7 клеток (но тоже 8-ядерных). Согласно современным представлениям этот период являлся критическим в развитии женского гаметофита, способствующим переключению морфогенеза с гаметофитной программы развития на спорофитную [6], обеспечивающим формирование эмбриоидов, содержащих гаплоидное число хромосом ($n=9$). Эффективное влияние на усиление перехода морфогенеза на спорофитный путь развития оказала также стрессовая предобработка материала холодом при положительной температуре 4–6 °С в течение 2–4 суток. Индукцию морфогенеза гаплоидных регенерантов по типу спорофита лимитировала питательная среда на основе минеральных солей по Гамборгу (B5) с витаминами по Уайту и различным гормональным составом, определяющим их формирование.

Ключевым моментом при культивировании семязачатков оказалось использование чередования питательных сред различной консистенции [7]. Содержание в жидкой питательной среде гиббереллина (ГК) вызывало прямую регенерацию гаплоидных эмбриоидов с образованием первичного корешка и семядольных листьев, которые при пересадке на твёрдую питательную среду формировали множественные ростовые побеги. Присутствие в жидкой среде 6-бензиламинопурина (БАП) приводило к формированию каллусной ткани, которая при пересадке на твёрдую питательную среду, содержащую кинетин (Кн) и 2,4 Д индуцировала развитие регенерантов путём гемморизогенеза. Использование данного приёма стимулировало сохранение жизнеспособности культивируемых эксплантов до 4–6 месяцев и активизацию процессов пролифе-

рации и дифференциации ядер и клеток женского гаметофита. Специализация возникших новообразований растительных тканей обеспечивала увеличение выхода гаплоидных регенерантов через эмбриоидогенез до 18,9 %, а путём каллусогенеза — до 13,7 %. Дальнейшее культивирование заключалось в отборе и стабилизации гаплоидных регенерантов, а затем в их переводе на диплоидный уровень при использовании питательной среды с колхицином. Проведение браковки миксоплоидных и анеуплоидных форм позволяло получать до 90 % регенерантов с постоянным удвоенным уровнем ploидности. Последний этап культивирования *in vitro* включал процесс укоренения на питательной среде с изменённым составом ауксинов и окончательным отбором диплоидизированных микроклонов с хорошо развитой корневой системой.

Следует отметить, что все процессы морфогенеза гаплоидов и удвоенных гаплоидов сопровождались отбором по цитологическим, биохимическим и молекулярно-генетическим признакам [8]. Так, использование цитофотометрического анализа для определения уровня ploидности позволило выделить растения-регенеранты на этапе стабилизации гаплоидов при их диплоидизации и создании линий удвоенных гаплоидов. Биохимический анализ выявил гаплоиды, характеризующиеся различной активностью ферментов и разной степенью электрофоретической подвижности изоферментных локусов, которые могут служить маркерами гомозиготности созданного материала. Молекулярно-генетические исследования с использованием секвенирования амплифицированных фрагментов ДНК митохондриального генома показали возможность генотипирования гаплоидных регенерантов по стерильному и фертильному

типам цитоплазмы для формирования гомозиготных линий с данными признаками.

В результате проведённых исследований для использования в селекционной работе были разработаны технологические приёмы создания удвоенных гаплоидов сахарной свёклы и получение семян ДН-линий в условиях закрытого грунта.

Технологические работы предусматривают трёхлетний период проведения биотехнологических и селекционных приёмов:

– на первом этапе осуществляют индукцию гаплоидных регенерантов *in vitro* из неоплодотворённых семязачатков. Учитываются морфологические, цитологические и молекулярно-генетические признаки. Осуществляют процесс стабилизации отобранных нормально развитых форм регенерантов с использованием микроразмножения на агаризованных средах;

– второй этап включает в себя создание ДН-линий с использованием диплоидизации гаплоидного материала путём колхицинирования, укоренения регенерантов и отбора по биохимическим и молекулярно-генетическим признакам;

– на третьем этапе укоренные микроклоны переводят в условия закрытого грунта, выращивают штеклинги и семенные растения, а затем получают семена гомозиготных ДН-линий.

Выводы

На основе научных экспериментов по воздействию стрессовых условий культуры *in vitro* на неоплодотворённые семязачатки сахарной свёклы разработана технология создания ДН-линий удвоенных гаплоидов. Исключая многократное самоопыление растений, этот приём дал возможность в два раза быстрее получать генетически и морфологически разнообразный материал с ценными селекционными признаками. Важным усло-

вием явилось использование цитофотометрического анализа для отбора гаплоидных и удвоенных гаплоидных линий. Проведение полимеразной цепной реакции ДНК дало возможность выделить гомозиготные линии с признаком цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС).

Разработанная технологическая схема по созданию гомозиготных ДН-линий будет способствовать ускоренному получению конкурентных гибридов с комплексом желаемых хозяйственно ценных признаков.

Список литературы

1. Кильчевский, А.В. Генетические основы селекции растений / Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия / А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Минск : Беларуская навука. – 2012. – С. 203–216.
2. Kikindonov, G. Economical qualities of crosses between doubled haploid sugar beet lines / G. Kikindonov, Tz. Kikindonov, S. Enchev // Agricultural science and technology. – 2016. – Vol. 8. – № 2. – Pp. 107–110.
3. Особенности морфогенеза и молекулярно-биохимических свойств гаплоидных регенерантов сахарной свёклы / Е.Н. Васильченко, Т.П. Жужжалова, О.А. Зем-

лянухина, Н.А. Карпеченко // Сахарная свёкла. – № 8. – 2017. – С. 14–20.

4. Tomashevskaja-Sowa, M. Effect of growth regulators and other components of culture medium on morphogenesis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) / M. Tomashevskaja-Sowa // Actaagrobotanica. – Vol. 65 (4). – 2012. – С. 91–100.

5. Подвигина, О.А. Индуцирование гаплоидии из неоплодотворённых семяпочек сахарной свёклы в условиях *in vitro* / О.А. Подвигина. – В сб. : Энциклопедия рода *Beta*. Биология, генетика и селекция свёклы (Научн. тр. Института цитологии и генетики СО РАН). – Новосибирск, 2010. – С. 455–465.

6. Батыгина, Т.Б. От микроспоры – к сорту / Т.Б. Батыгина [и др]. – М. : Наука, 2010.

7. Васильченко, Е.Н. Технология создания реституционных линий сахарной свёклы / Е.Н. Васильченко, Т.П. Жужжалова, Т.Г. Ващенко, Е.О. Колесникова // Вестник ВГАУ. – Вып. 1 (56). – Воронеж, 2018. – С. 42–50.

8. Жужжалова, Т.П. Гаплоидный партеногенез *in vitro* у сахарной свёклы (*Beta vulgaris*): факторы и диагностические признаки / Т.П. Жужжалова // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51. – № 5. – С. 636–644.

Аннотация. В статье представлен метод культуры изолированных органов и тканей, который позволяет целенаправленно получать генетически улучшенный исходный материал сахарной свёклы. Воздействие стрессовых условий культуры *in vitro* на гаплоидные клетки семязачатков *B. vulgaris* L. дали возможность создать удвоенные гаплоидные линии (ДН) с высокой гомозиготностью и получить качественные семена компонентов высокопродуктивных гибридов. Внедрение данного метода в селекционный процесс будет способствовать ускоренному получению конкурентноспособных гибридов с комплексом желаемых полезных признаков.

Ключевые слова: сахарная свёкла, культура *in vitro*, семязачатки, удвоенные гаплоиды (ДН).

Summary. The article presents a method of culture of isolated organs and tissues, which allows you to purposefully obtain a genetically improved source material of sugar beets. The impact of stressful *in vitro* culture conditions on the haploid cells of the ovule *B. vulgaris* L. made it possible to create double haploid lines (DH) with high homozygosity and to obtain high-quality seeds of components of highly productive hybrids. The introduction of this method into the breeding process will contribute to the accelerated production of competitive hybrids with the complex of desired useful traits.

Keywords: sugar beet, *in vitro* culture, ovules, doubled haploids (DH).

Профрезерв

Мы — лидеры рынка по аутсорсингу персонала

www.profreserv.ru

Главный офис:

г. Москва,
2-й Кабельный проезд, д. 1

Отдел продаж:

+7(499) 648-02-45

E-mail: info@profreserv.ru

Решение бизнес-процессов через аутсорсинг персонала

Аутсорсинг (outsourcing) — это эффективная технология управления предприятием, суть которой состоит в передаче отдельных направлений предпринимательской деятельности (производства, услуг, складских работ) в ведение сторонней компании, принимающей на себя все риски по подбору и трудоустройству персонала в интересах заказчика. Аутсорсер несёт ответственность за делопроизводство в процессе работы, управление приглашёнными работниками и их размещение. Целью является обеспечение желаемого заказчиком результата требуемого качества точно в срок.

В России услуга кадрового аутсорсинга популярна уже более 10 лет. Избавляясь от управления непрофильными функциями, заказчики оптимизируют свой бизнес и получают возможность сосредоточиться на важнейших задачах. Работа с кадрами перестаёт быть проблемой руководства и не отнимает дополнительные ресурсы от развития бизнеса.

Преимущества кадрового аутсорсинга

1. Избавляет владельцев бизнеса от необходимости тратить время и средства на управление неосновными процессами. Сокращает прямые издержки.
2. Снижает численность, оптимизирует состав и структуру постоянного штата, включая HR-менеджеров и бухгалтеров.

3. Уменьшает фонд оплаты труда и, соответственно, уплачиваемых с него налогов. Расчёты с наёмным персоналом производит аутсорсинговая компания.

4. Подобный наём позволяет растущей компании сохранить юридический статус, остаться в прежнем налоговом поле. Заказчик экономит на отчислениях в бюджет, оставаясь субъектом малых форм бизнеса.

5. Работодатель избавлен от заключения трудовых соглашений с нанимаемыми работниками.

6. Отношения с трудовыми комиссиями, затраты на охрану труда персонала, контроль соблюдения персоналом техники безопасности — всё это является обязанностью аутсорсера.

7. Договор между работодателем и аутсорсинговой компанией оговаривает размер расходов, подлежащих возмещению в случае неисполнения или ненадлежащего исполнения объёма или качества работ, размер вознаграждения. Оплата услуг аутсорсинговой организации производится по факту.

Владелец бизнеса избавляется от ряда существенных рисков и проблем, таких как штрафы за время простоя, размещение и питание работников, страхование их профессиональных рисков.

Кадровый аутсорсинг является эффективным средством оптимизации бизнес-модели заказчика, сокращения издержек и экономии на трудозатратах и оборотных средствах. Выбор аутсорсинговой компании должен основываться на её достижениях, тарифах на услуги, клиентоориентированности, отзывах заказчиков.