УДК 633.63:631. 52:58.085 https://doi.org/10.21498/2518-1017.14.4.2018.151900

Прямий індукований андрогенез у культурі *in vitro* буряків цукрових (*Beta vulgaris* L.)

С. М. Гонтаренко*, Г. М. Герасименко

*Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України, вул. Клінічна, 25, м. Київ, 03110, Україна, *e-mail: sgontarenko44@gmail.com*

Мета. Розробити метод прямого індукованого андрогенезу в культурі *in vitro* буряків цукрових. **Методи.** Біотехнологічні, цитологічні, селекційні, статистичні. **Результати.** Розроблено специфічні для буряків цукрових складники методу прямого індукованого андрогенезу в культурі *in vitro*, зокрема, визначено фазу розвитку мікроспор, оптимальну для ініціації андрогенезу, температурний режим передоброблення експлантів, умови культивування пиляків. За результатами цитологічного аналізу мікроспор та пилку буряків цукрових визначено, що одноядерна фаза вакуолізованої мікроспори є оптимальною для інокуляції пиляків на живильне середовище, а передоброблення експлантів із використанням низькотемпературного стресу (4–8 °С) протягом 3–15 діб є потрібним чинником, що ініціює перехід мікроспор з гаметофітного на спорофітний шлях розвитку. Розроблено склад живильних середовищ, різних за вмістом макроелементів, амінокислот, вітамінів та регуляторів росту, для культивування пиляків, ініціації процесів прямого андрогенезу та утворення ембріоїдів. За основу брали модифіковане живильне середовище Мурасіге–Скуга – 0,5 дози макроелементів з додаванням вітамінів: B_1 – 10,0 мг/л; B_6 – 1,0 мг/л; РР – 1,0 мг/л; С – 1,0 мг/л та амінокислот: глютамінової – 250,0–500,0 мг/л, аспарагінової – 1,0–10,0 мг/л, аргініну – 2,0–10,0 мг/л, тірозину – 1,0–10,0 мг/л, гідроксипроліну – 2,0–4,0 мг/л. За результатами досліджень визначено три найефективніші живильні середовища з різним умістом регуляторів росту: полістимулін А-6 – 1,0–3,0 мг/л за діючою речовиною + 6-БАП – 0,3–0,8 мг/л; 2,4-Д – 1,0–2,5 мг/л + 6-БАП – 0,3–0,8 мг/л + АБК – 0,3–1,0 мг/л або 6-БАП – 0,1–0,6 мг/л. Культивування пиляків буряків цукрових на розроблених живильних середовищах дало змогу отримати 0,15–1,32% андрогенних ембріоїдів різних типів та мікроклони андрогенного походження. **Висновки.** Розроблено метод прямого індукованого андрогенезу буряків цукрових: визначена оптимальна стадія розвитку мікроспор для інокуляції пиляків, режим температурного передоброблення експлантів, склад живильних середовищ для ініціації прямого андрогенезу *in vitro* та отримання різних типів андрогенних ембріоїдів. Результати проведеної роботи мають важливе значення для створення гаплоїдів та гомозиготних подвоєних гаплоїдних ліній, що сприятиме прискоренню селекційного процесу отримання нових сортів та гібридів буряків цукрових.

Ключові слова: *андрогенні ембріоїди; живильні середовища; мікроклони; пиляки; регулятори росту; буряки цукрові.*

Вступ

Експериментальний андрогенез – це спосіб отримання гаплоїдних рослин на живильних середовищах *in vitro* з ізольованих пиляків або мікроспор. В умовах *in vitro* індукція утворення ембріоїдів може відбуватися двома шляхами: прямим – безпосередньо в культурі пиляків і мікроспор та непрямим – за рахунок утворення калусу та індукції соматичних зародків [1]. Ембріоїд – це зародкоподібна біполярна структура, що утворюється асексуально [2]. Цей термін було запропоновано Вєзілом та Хільдебрантом [3] для позначення зародкоподібних структур, які виникають як в умовах *in vivo* («нуцеллярні» і «фоліарні» зародки), так і *in vitro* [2].

З погляду селекції найпривабливішим є прямий андрогенез, оскільки калус може утворюватися як з мікроспор, так і з соматичних клітин пиляків, а отримані регенеранти можуть мати різну плоїдність.

Відомо, що процес переходу мікроспор із гаметофітного на спорофітний шлях розвитку визначається на генетичному рівні, але реалізується залежно від конкретних фізіологічних умов та індукуючих факторів різної дії, температурного режиму передоброблення, фази розвитку мікроспор, на якій

Svitlana Gontarenko
http://orcid.org/0000-0003-0472-720X
Ganna Gerasymenko
http:// orcid.org/ 0000-0003-4338-7295

були ізольовані пиляки, а також складу живильного середовища та умов культивування, які прискіпливо вивчалися на багатьох культурах [4]. Метод прямого андрогенезу набув значного поширення. Його використовують більш ніж на 250 видах рослин господарсько-цінних культур для отримання гаплоїдів. Зокрема, це отримання гаплоїдів моркви [5–7], капусти [8], кукурудзи [9], ячменю [10], картоплі [11], пшениці [12, 13], соняшнику [14]. Використання гаплоїдів у селекції дає змогу розв'язати такі задачі: швидко отримати константний, гомозиготний за всіма алельними генами, селекційний матеріал та інцухт лінії для гетерозисної селекції, найбільш ефективно проводити добір мутантів, оскільки експресія рецесивних генів у них має фенотиповий прояв, а також завдяки елімінації рослин, що несуть летальні та напівлетальні гени та загалом скоротити селекційний процес на 3–4 роки [9, 11, 15]. Але сьогодні за даними літературних джерел спроби розробити метод прямого індукованого андрогенезу у буряків цукрових у культурі *in vitro* та отримати гаплоїди не були результативними [15–17].

Мета досліджень – розробити метод прямого індукованого андрогенезу в культурі *in vitro* буряків цукрових.

Матеріали та методика досліджень

Досліди проводили в Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків упродовж 2012–2017 рр. У дослідженнях використовували селекційний матеріал Білоцерківської дослідно-селекційної станції – генотипи тетраплоїдних запилювачів цукрових буряків селекційних номерів 1475К22, 1475К26, 1475К29, диплоїдних запилювачів 1309К4, 1309К5, 1309К7 та сорту популяції 'Білоцерківський однонасінний 45' селекційних номерів БЦ45К4, БЦ45К6, БЦ45К8.

Стерилізацію, передоброблення експлантів, інокуляцію та культивування пиляків проводили за відомими схемами та методами [4, 6, 8, 11], які були модифіковані для роботи з пиляками та пилком буряків цукрових у культурі *in vitro*. Для передоброблення рослинного матеріалу використовували низькотемпературний стрес – пагони з бутонами насінників буряків цукрових витримували в холодильній камері за температури 4–8 °С. Передоброблення також проводили в культуральній кімнаті за температури 30–32 °С та 16-годинному освітленні 1,0–2,0 клк протягом 7–30 діб.

Для досліджень фаз розвитку мікроспор буряків цукрових щодо здатності до ініціації ембріоїдогенезу: фаза тетрад, невакуолізованої мікроспори, вакуолізованої мікроспори, трьохклітинного пилку та відбору пиляків у фазі, що найбільш придатна для стимуляції андрогенезу (вакуолізованої мікроспори або двоклітинного пилкового зерна), проводили визначення фази розвитку мікроспор та їх цитологічний аналіз з використанням світлової мікроскопії. Для досліджень застосовували тимчасові препарати пиляків та пилку, які було забарвлено 2%-м розчином карміну у 45%-й оцтовій кислоті [18].

Для стерилізації рослинного матеріалу використовували розчини: 70%-го етилового спирту протягом 1–2 хв, 1–2%-го гіпохлориду натрію протягом 30–35 хв, 3% пероксиду водню протягом 10–15 хв. Після холодового передоброблення простерилізовані бутони розтинали, пиляки вилучали з бутонів та інокулювали на живильні середовища. Кількість інокульованих пиляків на одну колбу становила від 10 до 30 шт. Культивування пиляків після висаджування на живильні середовища здійснювали за температури 26–32 °С, освітлення 1,0–2,0 клк протягом 18 годин та в темряві до ініціації ембріогенезу. Після появи первинних новоутворень, колби з темряви переносили в умови культуральної кімнати з освітленням протягом 18 годин за температури 24–32 °С. У дослідах визначали: загальну кількість пиляків, що були висаджені на кожному середовищі, кількість пиляків, що виявили морфогенну активність, загальну кількість новоутворень та ембріоїдів.

Для ініціації утворення ембріоїдів було розроблено прописи живильних середовищ, які різнилися за вмістом макроелементів, амінокислот, вітамінів, регуляторів росту.

За базове обрали середовище Мурасіге–Скуга [19] з повною та зменшеною вдвічі кількістю макроелементів, з вітамінами за Гамборгом [20], із додаванням аскорбінової кислоти (вітаміну С) – 1,0 мг/л, та амінокислоти глутаміну – 500 мг/л, сахарози – 40 г/л. Середовища модифікували, додаючи до складу базового середовища такі компоненти: амінокислоти – аспарагінову – 30,0–50,0 мг/л, аргінін – 2,0–250,0 мг/л, пролін – 1,0–5,0 мг/л, гідроксипролін – 2,0–4,0 мг/л, тирозин – 1,0–10,0 мг/л, гліцин – 2,0–5,0 мг/л, регулятори росту: полістимулін А–6 – 1,0–3,0 мг/л за діючою речовиною, 2,4-Д – 1,0–2,5 мг/л, 6-БАП – 0,6–4,0 мг/л, АБК – 0,03–1,0 мг/л, НОК – 0,1–0,5 мг/л. Як еталон було обране живильне середовище Гамборга (В5) з додаванням ауксинів – 2,4-Д – 0,5 мг/л та НОК – 0,2 мг/л, яке було застосоване для

отримання ембріоїдів моркви у процесі інокуляції пиляків на живильне середовище в умовах *in vitro* [7].

Утворені ембріоїди пересаджували на середовища іншого складу – модифіковані середовища Мурасіге–Скуга, що містили вітаміни: нікотинову кислоту (РР) – 1,0 мг/л, піридоксин (B_6) – 1,0 мг/л, тіамін (B_1) – 10,0 мг/л та 6-БАП – 0,1–0,5 мг/л. Пасивування отриманих ембріоїдів продовжували на середовищах, призначених для подальшого росту, розвитку та стимуляції органогенезу.

У дослідах визначали: кількість пиляків, що виявили андрогенну активність та частоту утворення ембріоїдів, як відсоток від кількості висаджених пиляків для кожного генотипу та живильного середовища [21].

Результати досліджень

Здатність до андрогенезу значною мірою залежить від фази розвитку мікроспор у момент їх введення в культуру *in vitro*. Тому важливо визначити оптимальну фазу розвитку мікроспор, найсприятливішу для інокуляції на живильні середовища. Визначено п'ять основних фаз розвитку мікроспор [1]: тетрада, невакуолізована мікроспора, слабковакуолізована мікроспора, сильновакуолізована мікроспора, триклітинний пилок. Оптимальною фазою розвитку мікроспор для інокуляції може бути як невакуолізована мікроспора, наприклад, для капусти білокачанної [8], так і вакуолізована мікроспора – для пшениці [1], моркви [5–7], кукурудзи [9].

Установлено, що для буряків цукрових фаза вакуолізованої мікроспори є оптимальною для інокуляції пиляків на живильне середовище. Саме на цій фазі спостерігали ембріогенез і формування мікроклонів. Тоді як інокуляція пиляків з пилком на інших фазах розвитку не була результативною.

Визначено, що фаза одноядерної вакуолізованої мікроспори є оптимальною для інокуляції пиляків на живильне середовище, в порівнянні із фазами невакуолізованої одноядерної мікроспори або триклітинним пилком.

Установлено, що передоброблення експлантів із використанням низькотемпературного стресу (4–8 °С) протягом 3–15 діб є фактором, що ініціює перехід мікроспор з гаметофітного на спорофітний шлях розвитку, тоді як застосування високотемпературного стресу (30–32 °С) для передоброблення експлантів не дало позитивних результатів.

Для отримання ембріоїдів з пиляків буряків цукрових протестовано понад 30 різних прописів живильних середовищ, які відрізнялися за наявністю та складом вітамінів, амінокислот та, насамперед, регуляторів росту. Прописи найбільш ефективних середовищ порівняно з еталоном – живильним середовищем Гамборга (В5) з додаванням 2,4-Д – 0,5 мг/л, НОК – 0,2 мг/л, яке використовують для отримання ембріоїдів моркви [7], наведено в таблиці 1.

Отримані дані свідчать, що застосування еталонного середовища В5 з додаванням регуляторів росту – 2,4-Д – 0,5 мг/л, НОК –

Таблиця 1

Вплив живильного середовища на частоту ініціації утворення ембріоїдів на пиляках цукрових буряків

№	Живильне середовище	Частота ініціації утворення ембріоїдів у різних генотипів буряків цукрових, %								
		1*	2*	3*	4	5	6	7	8	9
1	Живильне середовище – В5 (Гамборга) з додаванням 2,4-Д – 0,5 мг/л, НОК – 0,2 мг/л – еталон	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	Живильне середовище – МС 0,5 дози макроелементів + вітаміни: B_1 – 10,0 мг/л; B_6 – 1,0 мг/л; РР – 1,0 мг/л; С – 1,0 мг/л + амінокислоти: глютамінова – 250,0–500,0 мг/л, аспарагінова – 1,0–10,0 мг/л, тірозин – 1,0–10,0 мг/л, аргінін – 2,0–10,0 мг/л, гідроксипролін – 2,0–4,0 мг/л + регулятори росту: полістимулін А-6 – 1,0–3,0 мг/л за д.р., 6-БАП – 0,3–0,8 мг/л (1)	0,92	0,61	–	0,45	0,28	0,15	–	0,52	0,79
3	Те саме + регулятори росту: 2,4-Д – 1,0–2,0 мг/л, 6-БАП – 0,3–0,8 мг/л, АБК – 0,3–1,0 мг/л (11)	–	–	–	–	–	–	1,38	–	–
4	Те саме + регулятори росту: 6-БАП – 0,1–0,6 мг/л (111)	–	–	1,94	–	–	–	–	–	–

Примітка. 1*, 2*, 3* – генотипи тетраплоїдних запилювачів цукрових буряків 1475К29, 1475К26, 1475К22; 4, 5, 6, 7, 9 – генотипи диплоїдних запилювачів 1309К4, 1309К5, 1309К7 та сорту буряків цукрових БЦ45К8, БЦ45К6, БЦ45К4.

2 мг/л, не сприяє процесам утворення ембріоїдів та мікроклонів з пиляків цукрових буряків в умовах *in vitro*. Ініціація андрогенезу та утворення ембріоїдів відбувались тільки на розроблених нами середовищах: № 1 – середовище Мурасіге–Скуга модифіковане за вмістом макроелементів – 0,5 дози, що містить вітаміни: B_1 – 10,0 мг/л, B_6 – 1,0 мг/л, РР – 1,0 мг/л за Гамборгом та вітамін С – 1,0 мг/л, з додаванням амінокислот: глютамінової – 250,0–500,0 мг/л, аспарагінової кислоти – 30,0–50,0 мг/л, тірозину – 1,0–10,0 мг/л, аргініну – 2,0–10,0 мг/л, гідроксипроліну – 2,0–4,0 мг/л, регулятора росту полістимуліну А-6 – 1,0–3,0 мг/л за діючою речовиною, 6-БАП – 0,3–0,8; середовище № 2, яке відрізняється від попереднього вмістом регуляторів росту: 2,4–Д – 1,0–2,5 мг/л, 6-БАП – 0,3–0,8 мг/л, АБК – 0,3–1,0 мг/л; середовище № 3, яке містить – 6-БАП – 0,1–0,6 мг/л. Використання саме таких прописів живильних середовищ сприяє утворенню ембріоїдів буряків цукрових *in vitro*.

Найрезультативнішим за кількістю генотипів, у яких відбувалася ініціація утворення ембріоїдів, виявилося середовище № 1 з додаванням регулятора росту полімерного ауксину полістимуліну А-6 – 1,0–3,0 мг/л, за діючою речовиною, 6-БАП – 0,3–0,8, яке сприяло ініціації андрогенезу *in vitro* у 7 з 9 обраних генотипів. Частота утворення ембріоїдів змінювалася у межах 0,15–0,92%. У тетраплоїдних генотипів частота утворення ембріоїдів становила 0,61–0,92%, у диплоїдних генотипів – 0,15–0,79%. На середовищах № 2 та № 3 кількість генотипів, що ініціювали ембріоїди, становила 11,1%, але частота ініціації ембріоїдів на цих середовищах була значно вище – 1,38% (№ 2) – диплоїд та 1,94% (№ 3) – тетраплоїд.

Використання декількох прописів живильних середовищ, що різняться за вмістом та співвідношенням регуляторів росту, дає змогу отримувати ембріоїди різних типів (рис. 1), та мікроклони (рис. 2) ширшого діапазону генотипів буряків цукрових.

Низьку частоту виходу ембріоїдів та гаплоїдних рослин, а також спонтанність ембріогенезу відзначали в культурі пиляків *in vitro* різних сортів моркви (0,75–0,78%) [4],

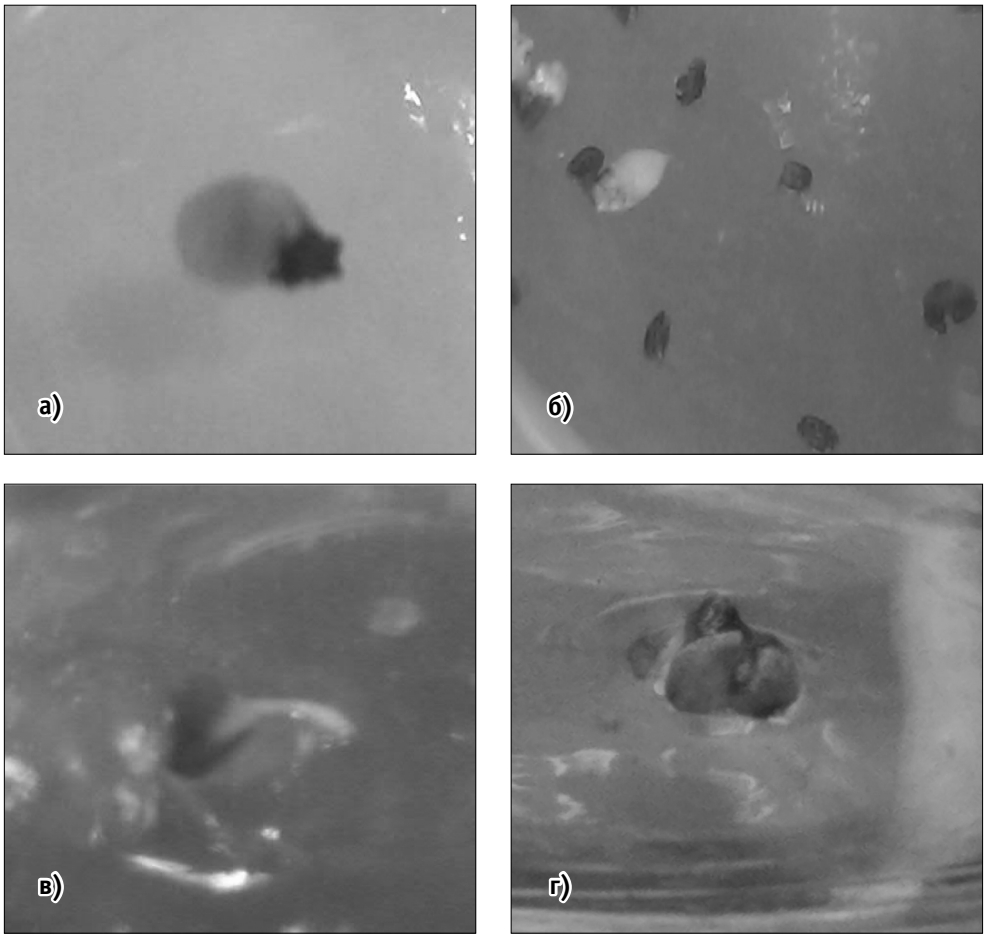

Рис. 1. Різновиди ембріоїдів:
а) шароподібний ембріоїд; б) формування булавоподібного ембріоїду;
в) торпедоподібний ембріоїд; г) розвиток сім'ядолей

Рис. 2. Мікроклони, отримані за методом прямого андрогенезу

капусти (1–4%) [8]. Початок розвитку ембріоїдів візуально фіксували на 7–21 добу після їхньої інокуляції, які за жовтувато-зеленим або зеленим забарвленням відрізняються від іншої частини пиляка. Через 30–35 діб спостерігали формування мікроклонів.

В експериментах виявлено ідентичність фаз морфогенезу ембріоїдів *in vitro* та морфогенезу зиготичного зародка буряків цукрових *in vivo*.

Відомо, що в цукрових буряків поділ зиготи відбувається наприкінці першої доби після запліднення [22]. Унаслідок цього поділу утворюється апікальна та базальна клітини. Після другого поділу утворюється чотири-, а потім восьмиклітинний проембріо з лінійним розташуванням клітин. На третю добу зародки диплоїдів та на 5–7 добу тетраплоїдів набувають булавоподібної форми. Форми кулі зародки диплоїдів набувають на п'яту добу, тетраплоїдів – на 8–10 добу. Серцеподібної форми зародки диплоїдів досягають на восьму добу, у тетраплоїдів – на дванадцяту. На дванадцяту добу в диплоїдів та на шістнадцяту в тетраплоїдів витягуються сім'ядолі. На шістнадцяту добу в диплоїдів та на двадцяту добу в тетраплоїдів ріст зародка зупиняється, але фізіологічна зрілість у диплоїдів настає тільки на 26–30 добу, а у тетраплоїдів дещо пізніше – після накопичення зародком білкових та жироподібних речовин, а периспермом – крохмалю.

Специфіка морфогенезу андрогенного ембріоїду *in vitro* полягає у триваліших строках формування та проходження основних етапів: восьмиклітинного проембріо з лінійним розташуванням клітин, булавоподібного ембріоїда у формі кулі, серцеподібного, формування та витягування сім'ядолей.

Отже, ембріональні структури генеративних органів буряків цукрових, як і інших рослинних організмів, є найбільш консервативними, відносно постійними та менш мінливими порівняно з вегетативними органами і тому більшою мірою є відображенням загального напряму прогресивної еволюції [2].

Висновки

Розроблено метод прямого індукованого андрогенезу буряків цукрових. Визначено, що стадія одноядерної, вакуолізованої мікроспори є оптимальною для індукції андрогенезу в культурі *in vitro* пиляків буряків цукрових, а тригером цього процесу є стресовий фактор – вплив низьких позитивних температур (4–8 °С) протягом 7–20 діб. Установлено, що найбільш результативними для індукції прямого андрогенезу є середовища, що містять 2,4-Д та його полімерну форму – полістимулін А-6, а також 6-БАП, АБК з додаванням амінокислот – глютамінової, аспарагінової, аргініну, тирозину, гідроксипроліну та вітамінів – B_1, B_6, РР, С. Виявлено подібність фаз морфогенезу ембріоїдів *in vitro* та морфогенезу зиготичного зародка буряків цукрових *in vivo*. Кількість утворених ембріоїдів змінювалась в межах від 0,15 до 1,32%.

Використана література

1. Батыгина Т. Б., Круглова Н. Н., Горбунова В. Ю. Андрогенез *in vitro* у злаков: анализ с эмбриологических позиций. *Цитология*. 1994. Т. 36, № 9–10. С. 993–1005.
2. Круглова Н. Н. Микроспора злаков как модельная система для изучения путей морфогенеза : дис. … д-ра биол. наук : спец. 03.00.05 «Ботаника» / Ин-т биологии Уфимского научн. центра РАН. Уфа, 2002. 460 с.
3. Vasil I. K., Hildebrandt A. C. Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures. I. *Cichorium endivia*. *Am. J. Bot.* 1966. Vol. 53, Iss. 9. P. 860–869. doi: 10.1002/j.1537-2197.1966.tb06843.x
4. Plant Biotechnology. Vol. 1. Principles, Techniques, and Applications / B. D. Prasad, S. Sahni, P. Kumar, M. W. Siddiqui (eds). New York : Apple Academic Press., 2017. 586 p.
5. Поляков А. В., Демидкина М. А., Зонтиков Д. Н. Эмбриогенез моркови столовой (*Daucus carota* L.) в культуре микроспор. *Вестник КГУ им. Н. А. Некрасова*. 2013. № 4. С. 24–26.
6. Тюкавин Г. Б. Основы биотехнологии моркови. Москва : ВНИИССОК, 2007. 480 с.
7. Zhuang F. Y., Pei H. X., Ou C. G. et al. Induction of microspores-derived embryos and calli from anther culture in carrot. *Acta Hortic. Sin.* 2010. Vol. 37, Iss. 10. P. 1613–1620.
8. Cilingir A., Dogru S. M., Kurtar E. S., Balkaya A. Anther culture in red cabbage (*Brassica oleraceae* L. var. *capitata* subvar. *rubra*): embryogenesis and plantlet initiation. *Ekin J.* 2017. Vol. 3, Iss. 2. P. 82–87.
9. Сатарова Т. Н. Андрогенез та ембріокультура у кукурудзи *in vitro* : дис. … д-ра біол. наук : спец. 03.00.20 «Біотехнологія» / Ін-т клітинної біології та генетичної інженерії НААН України. Київ, 2002. 537 с.
10. Белинская Е. В. Эффективность получения андрогенных гаплоидов ячменя в зависимости от способа регенерации рас-

тений, состава питательной среды и плотности инокуляции пыльников. *Известия Самарского научного центра РАН*. 2013. Т. 15, № 3. С. 1571–1574.
11. Генетические основы селекции растений. В 4 т. Т. 3. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия / науч. ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. Минск : Беларус. навука, 2012. 489 с.
12. Горбунова В. Ю. Андрогенез *in vitro* у яровой мягкой пшеницы : дис. … д-ра биол. наук : спец. 03.00.15 «Генетика» / Башкирский гос. пед. ин-т. Уфа, 2000. 290 с.
13. Круглова Н. Н., Батыгина Т. Б., Горбунова, В. Ю., Титова Г. Е., Сельдимирова О. А. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы: атлас. Москва : Наука, 2005. 99 с.
14. Костина Е. Е., Лобачев Ю. В., Ткаченко О. В. Андрогенез в культуре пыльников *in vitro* генетически маркированных линий подсолнечника. *Современные проблемы науки и образования*. 2015. № 3. URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=19996
15. Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology / R. N. Trigiano, D. J. Gray (eds). London : CRS Press, 2016. 608 p.
16. Ranabhatt H., Kapor R. Plant Biotechnology. New Delhi : WPI Publishing, 2017. 526 p.
17. Pazuki A., Aflaki F., Gurel S. et al. Production of doubled haploids in sugar beet (*Beta vulgaris*): an efficient method by a multivariate experiment. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2018. Vol. 132, Iss. 1. P. 85–97. doi: 10.1007/s11240-017-1313-5
18. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. 4-е изд., перераб. и доп. Москва : Агропромиздат, 1988. 271 с.
19. Murashige T., Skoog A. F. Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15, Iss. 3. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
20. Gamborg O. L., Constable F., Shiluk J. P. Organogenesis in callus form shoot apices of *Pisum sativum*. *Physiol. Plant.* 1974. Vol. 30, Iss. 2. P. 125–128. doi: 10.1111/j.1399-3054.1974.tb05003.x
21. Шеламова М. А., Инсарова Н. И., Лещенко В. Г. Статистический анализ медико-биологических данных с использованием программы Excel. Минск : БГМУ, 2010. 96 с.
22. Зайковская Н. Э. Биология цветения, цитология и эмбриология сахарной свеклы. *Биология и селекция сахарной свеклы* / под ред. И. Ф. Бузанова. Москва : Колос, 1968. С. 137–207.

References

1. Batygina, T. B., Kruglova, N. N., & Gorbunova, V. Yu. (1994). Androgenesis *in vitro* in cereals: analysis from embryological positions. *Tsitologiya* [Cytology], *36*(9–10), 993–1005. [in Russian]
2. Kruglova, N. N. (2002). *Mikrospora zlakov kak model'naya sistema dlya izucheniya putey morfogeneza* [Microspores of cereals as a model system for studying the pathways of morphogenesis] (Dr. Biol. Sci. Diss.). Institute of Biology, Ufa Scientific Center of RAS, Ufa, Russia. [in Russian]
3. Vasil, I. K., & Hildebrandt, A. C. (1966). Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures. I. *Cichorium endivia*. *Am. J. Bot.*, *53*(9), 860–869. doi: 10.1002/j.1537-2197.1966.tb06843.x
4. Prasad, B. D., Sahni, S., Kumar, P., & Siddiqui, M. W. (Eds.). *Plant Biotechnology. Vol. 1. Principles, Techniques, and Applications*. New York: Apple Academic Press., 2017. 586 p.
5. Polyakov, A. V., Demidkina, M. A., & Zontikov, D. N. (2013). Embryogenesis of carrot (*Daucus carota* L.) in microspor culture. *Vestnik KGU im. N. A. Nekrasova* [Vestnik of Kostroma State University named after N.A. Nekrasov], *4*, 24–26. [in Russian]
6. Tyukavin, G. B. (2007). *Osnovy biotekhnologii morkovi* [Basics of carrot biotechnology]. Moscow: VNIISSOK. [in Russian]
7. Zhuang, F. Y., Pei, H. X., Ou, C. G., Hu, H., Zhao, Z. W., & Li, J. R. (2010). Induction of microspores-derived embryos and calli from anther culture in carrot. *Acta Hortic. Sin.*, *37*(10), 1613–1620.
8. Cilingir, A., Dogru, S. M., Kurtar, E. S., & Balkaya, A. (2017). Anther culture in red cabbage (*Brassica oleraceae* L. var. *capitata* subvar. *rubra*): embryogenesis and plantlet initiation. *Ekin J.*, *3*(2), 82–87.
9. Satarova, T. N. (2002). *Androhenez ta embriokultura u kukurudzy in vitro* [Androgenesis and embryonic culture of corn *in vitro*] (Dr. Biol. Sci. Diss.). Institute of Cells Biology and Genetic Engineering, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine. [in Ukrainian]
10. Belinskaya, E. V. (2013). Efficiency of obtaining androgenic barley haploids depending on the method of plant regeneration, the composition of the nutrient medium and the density of inoculation of anthers. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra RAN* [Izvestia RAS SamSC], *15*(3), 1571–1574. [in Russian]
11. Kil'chevskiy, A. V., & Khotyleva, L. V. (Eds.) (2012). *Geneticheskie osnovy selektsii rasteniy. T. 3. Biotekhnologiya v selektsii rasteniy. Kletochnaya inzheneriya* [Genetic basis of plant breeding. Vol. 3. Biotechnology in plant breeding. Cell Engineering]. Minsk: Belarus. navuka. [in Russian]
12. Gorbunova, V. Yu. (2010). *Androgenez in vitro u yarovoy myagkoy pshenitsy* [Androgenesis *in vitro* in spring soft wheat] (Dr. Biol. Sci. Diss.). Bashkir State Pedagogical Institute, Ufa, Russia. [in Russian]
13. Kruglova, N. N., Batygina, T. B., Gorbunova, V. Yu., Titova, G. E., & Sel'dimirova, O. A. (2005). *Embriologicheskie osnovy androklinii pshenitsy: atlas* [Embryological bases of wheat androclinia: atlas]. Moscow: Nauka. [in Russian]
14. Kostina, E. E., Lobachev, Yu. V., & Tkachenko, O. V. (2015). Androgenesis in anther culture in vitro genetically marked lines of sunflower. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern Problems of Science and Education], *3*. Retrieved from http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=19996
15. Trigiano, R. N., & Gray, D. J. (Eds.). *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. London: CRS Press, 2016. 608 p.
16. Ranabhatt, H., & Kapor, R. (2017). *Plant Biotechnology*. New Delhi: WPI Publishing.
17. Pazuki, A., Aflaki, F., Gurel, S., Ergul, A., & Gurel, E. (2018). Production of doubled haploids in sugar beet (*Beta vulgaris*): an efficient method by a multivariate experiment. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2018. Vol. 132, Iss. 1. P. 85–97. doi: 10.1007/s11240-017-1313-5
18. Pausheva, Z. P. (1988). *Praktikum po tsitologii rasteniy* [Workshop on plant cytology]. (4rd ed., rev.). Moscow: Agropromizdat. [in Russian]
19. Murashige, T., & Skoog, A. F. (1962). Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.*, *15*(3), 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
20. Gamborg, O. L., Constable, F., & Shiluk, J. P. (1974). Organogenesis in callus form shoot apices of *Pisum sativum*. *Physiol. Plant.*, *30*(2), 125–128. doi: 10.1111/j.1399-3054.1974.tb05003.x
21. Shelamova, M. A., Insarova, N. I., & Leshchenko, V. G. (2010). *Statisticheskiy analiz mediko-biologicheskikh dannykh s ispol'zovaniem programmy Excel* [Statistic analyses of medical and biological data with using Excel program]. Minsk: BGMU. [in Russian]
22. Zaykovskaya, N. E. (1968). Flowering biology, cytology and embryology of sugar beet. In I. F. Buzanov (Ed.), *Biologiya i selektsiya sakharnoy svekly* [Biology and selection of sugar beet] (pp. 137–207). Moscow: Kolos. [in Russian]

УДК 633.63:631. 52:58.085
Гонтаренко С. Н.*, Герасименко А. Н. Прямой индуцированный андрогенез в культуре *in vitro* сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Plant Varieties Studying and Protection. 2018. Т. 14, № 4. С. 375–381.
https://doi.org/10.21498/2518-1017.14.4.2018.151900

*Институт биоэнергетических культур и сахарной свеклы НААН Украины, ул. Клиническая, 25, г. Киев, 03110, Украина, *e-mail: sgontarenko44@gmail.com*

Цель. Разработать метод прямого индуцированного андрогенеза в культуре *in vitro* сахарной свеклы. **Методы.** Биотехнологические, цитологические, селекционные, статистические. **Результаты.** Разработаны специфические для сахарной свеклы составляющие метода прямого индуцированного андрогенеза в культуре *in vitro* – определена фаза развития микроспор, оптимальная для инициации андрогенеза, температурный режим предобработки эксплантов, условия культивирования пыльников. По результатам цитологического анализа микроспор и пыльцы сахарной свеклы определено, что одноядерная фаза вакуолизированной микроспоры является оптимальной для инокуляции пыльников на питательную среду; а предобработка эксплантов с использованием низкотемпературного стресса – 4–8 °С в течение 3–15 суток является необходимым фактором, инициирующим переход микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития. Разработан состав питательных сред для культивирования пыльников, инициации процессов прямого андрогенеза и образования эмбриоидов, которые отличались по содержанию макроэлементов, аминокислот, витаминов, регуляторов роста. За основу использовали модифицированную среду Мурасиге–Скуга – 0,5 дози макроэлементов с добавлением витаминов: B_1 – 10,0 мг/л; B_6 – 1,0 мг/л; РР – 1,0 мг/л; С – 1,0 мг/л и аминокислот: глютаминовой – 250,0–500,0 мг/л, аспарагиновой – 1,0–10,0 мг/л, аргинина – 2,0–10,0 мг/л, тирозина – 1,0–10,0 мг/л, гидроксипролина – 2,0–4,0 мг/л. Определены три наиболее эффективные питательные среды, которые отличались содержанием регуляторов роста: полистимулин А-6 – 1,0–3,0 мг/л по действующему веществу + 6-БАП – 0,3–0,8 мг/л; 2,4–Д – 1,0 – 2,5 мг/л + 6-БАП – 0,3–0,8 мг/л + АБК – 0,3–1,0 мг/л или 6-БАП – 0,1–0,6 мг/л. Культивирование пыльников сахарной свеклы на разработанных питательных средах позволило получить 0,15–1,32% андрогенных эмбриоидов различных типов и микроклоны андрогенного происхождения. **Выводы**. Разработан метод прямого индуцированного андрогенеза сахарной свеклы: определена оптимальная стадия развития микроспор для инокуляции пыльников, режим предобработки эксплантов, состав питательных сред для инициации прямого андрогенеза *in vitro* и получения различных типов андрогенных эмбриоидов. Результаты проведенной работы имеют большое значение для создания гаплоидов и гомозиготны удвоенных линий, что будет способствовать ускорению селекционного процеса создания новых сортов и гибридов сахарной свеклы.

Ключевые слова: *андрогенные эмбриоиды; питательная среда; микроклоны; пыльники; регуляторы роста; сахарная свекла.*

UDC 633.63:631. 52:58.085
Hontarenko, S. M.*, & **Herasymenko, H. M.** (2018). Direct induced androgenesis in culture *in vitro* in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Varieties Studying and Protection*, *14*(4), 375–381.
https://doi.org/10.21498/2518-1017.14.4.2018.151900

*Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet, NAAS of Ukraine, 25 Klinichna St., Kyiv, 03110, Ukraine, *e-mail: sgontarenko44@gmail.com*

Purpose. To develop the method of direct induced androgenesis of sugar beet in culture *in vitro*. **Methods.** Biotechnological, cytological, breeding, statistical. **Results.** Specific for sugar beet components of the method of direct induced androgenesis in culture in vitro was developed, in particular, the phase of development of microspores, optimal for initiation of androgenesis, the temperature mode of explants pretreatment, conditions of anthers cultivation were determined. According to the results of cytological analysis of microspores and sugar beet pollen, it was determined that the single-nucleus stage of the vacuolized microspores is optimal for inoculation of anthers on the nutrient medium, and pre-treatment of explants using low-temperature stress (4–8 °C) for 3–15 days is a necessary factor that initiates the transition of microspores from gametophytic to sporophytic pathway of development. The composition of nutrient media, different in content of macroelements, amino acids, vitamins and growth regulators, for the cultivation of anthers, the initiation of processes of direct androgenesis and the formation of embryos have been developed. The modified Murazig-Skoog medium – 0.5 doses of macroelements with the addition of vitamins: B1 – 10.0 mg/l; B6 – 1.0 mg/l; PP – 1.0 mg/l; C – 1.0 mg/l and amino acids: glutamine – 250.0–500.0 mg/l, asparagine – 1.0–10.0 mg/l, arginine – 2.0–10.0 mg/l, tyrosine – 1.0–10.0 mg/l, hydroxyproline – 2.0–4.0 mg/liter was used as a basis. According to the results of research, three most effective nutrient media with different content of growth regulators have been determined: polystimulin A-6 – 1.0–3.0 mg/l for the active substance + 6-BAP – 0.3–0.8 mg/liter; 2.4-D – 1.0–2.5 mg/l + 6-BAP – 0.3–0.8 mg/l + ABK – 0.3–1.0 mg/l or 6-BAP – 0.1–0.6 mg/l. Cultivation of sugar beet anthers on the developed nutrient media allowed to obtain 0.15–1.32% of various types of androgen embryos and microclones of androgenic origin. **Conclusions.** The method of direct induced androgenesis of sugar beet is developed: the optimal stage of development of microspores for inoculation of anthers, the mode of temperature pretreatment of explants, the composition of nutrient media for the initiation of direct *in vitro* androgens and the obtaining of various types of androgenic embryoids have been determined. The results of this work are important for the creation of haploids and homozygous double-haploid lines, which will accelerate the breeding process for obtaining new varieties and hybrids of sugar beet.

Keywords: *androgenic embryoids; nutrient media; microclones; anthers; growth regulators; sugar beet.*

Надійшла / Received 04.10.2018
Погоджено до друку / Accepted 13.11.2018