

**МЕТОД ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ІНДУКЦІЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
АНДРОГЕНЕЗУ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ В УМОВАХ *IN VITRO***

Гонтаренко С.М., Герасименко Г.М.
Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН, Україна

У статті наведено результати дослідження впливу температурного режиму та складу живильних середовищ, що були застосовані для передобробки експлантів цукрових буряків – стебел з бутонами. У дослідженнях використовували тетраплоїдні запилювачі та диплоїдні насінники цукрових буряків, які вирощували в польових та лабораторних умовах. Експланти культивували *in vitro* при різних температурних режимах на модифікованих агаризованих живильних середовищах. У результаті розроблено метод підвищення ефективності індукції експериментального андрогенезу цукрових буряків в умовах *in vitro*, який включає низькотемпературну передобробку експлантів – стебел з бутонами цукрових буряків на модифікованому агаризованому середовищі Мурасіге–Скуга з додаванням вітамінів, амінокислот, регуляторів росту та, зокрема, АБК – 0,3 мг/л та культивування ізольованих пиляків на живильних середовищах. Застосування методу дозволяє підвищити вихід калусів більш як в два рази, а ембріоїдів в 5–6 разів.

Ключові слова: андрогенез, ембріоїд, калус, передобробка експлантів, пиляк, регулятор росту, цукровий буряк

Вступ. Андрогенез *in vitro* – це особлива система розмноження рослин, що дозволяє прискорено отримувати гаплоїдні рослини в культурі ізольованих пиляків та мікроспор [1]. Методом андрогенезу в культурі *in vitro* було отримано гаплоїди у більш ніж 250 видів рослин, але на сьогоднішній день спроби розробити методи індукованого андрогенезу у цукрових буряків в культурі *in vitro* та отримати гаплоїди не були результативними [2, 3, 4]. Для отримання гаплоїдів цукрових буряків застосовують метод гіногенезу [2, 3, 11].

Процес переходу мікроспор з гаметофітного на спорофітний шлях розвитку визначається на генетичному рівні, але реалізується в залежності від конкретних умов та різних за дією індукуючих факторів, одним із головних є передобробка експлантів. Для індукції переходу на спорофітний напрям розвитку шляхом андрогенезу для передобробки експлантів в якості стресового фактора використовують знижені (2–8 °С) або підвищені (30–35 °С) температури, осмотичний вплив, освітлення, хімічні реагенти, або комбінацію цих способів передобробки [2, 3, 4]. Застосування такої передобробки підвищує ефективність індукції – збільшує відсоток пиляків або мікроспор, які утворюють калус або ембріоїди.

Впливу температурних режимів піддають різні види експлантів (колоски, волоті, відрізки стебла з бутонами чи квітками, окремі бутони та пиляки). Способи температурної передобробки експлантів дуже різняться. Бутони та пиляки піддають температурному впливу на живильному середовищі, інші експланти занурюють у воду, загортають у зволожений папір та поміщають у холодильну камеру [2].

Для підвищення андрогенетичної активності пиляків було проведено дослідження з обробки експлантів різними реагентами – нітратом срібла, гормональними речовинами: 6-БАП, гібереліном. Для зміни гормональних балансів донорних рослин було застосовано щеплення. Наприклад, для стимуляції прямого андрогенезу картоплі її щеплювали з томами, а також підвищували освітлення до 10–15 клк [5].

Відомо використання абсцизової кислоти (АБК) у дозах 0,1 та 0,5 мг/л у вигляді водного розчину для обробки пшениці (пагонів з колосками), що забезпечує отримання більшої кількості морфогенних пиляків та новоутворень та збільшення регенерації рослин [6].

Згідно даним літератури АБК – сесквітерпеноїд фітогормон з інгібуючою дією, регулює декілька важливих процесів, зокрема, накопичення елементів живлення, підсихання, передчасне проростання, за якими слідує структуроутворення ембріонів рослин [7].

Відомий також спосіб передобробки експлантів моркви, згідно якого бутони моркви культивують на агаризованому середовищі Мурасіге–Скуга (МС) з 0,2 мг/л 2,4-Д, протягом 2–4 тижнів у темряві в термостаті за 20–25 °С. Пиляки, що розрослися, вилучають з бутонів та переносять на свіже середовище того ж складу, культивують за температури 20–25 °С, освітленні 2–3 клк 16 годин до утворення ембріодів або ембріогенного калусу (5–6 тижнів) [8].

Але цей метод призначений для передобробки експлантів моркви та отримання калусу та ембріодів саме з пиляків моркви, для якої, як і для інших культур, характерною є генотипова реакція на певний склад живильного середовища. Культуру моркви було обрано в якості еталона як найбільш близьку коренеплідну культуру з дворічним циклом розвитку.

Мета досліджень: розробити метод підвищення ефективності індукції експериментального андрогенезу цукрових буряків в умовах *in vitro*.

Матеріали та методи. Досліди проводили в лабораторії біотехнології та лабораторії біотехнологічних досліджень у культурі *in vitro* Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків протягом 2014–2017 років. У дослідженнях використовували селекційний матеріал Білоцерківської дослідно-селекційної станції (БЦДСС) – тетраплоїдні запилювачі та диплоїдні насінники цукрових буряків, генотипи селекційних номерів БЦ 45 К1 – К15, . 1475 К1-25. Для подовження терміну досліджень та отримання експериментального матеріалу не тільки влітку, а й в зимово-весняний період досліди проводили в два етапи. Перший етап – насінневі рослини цукрових буряків вирощували взимку та навесні в лабораторних умовах. Маточні коренеплоди, що були отримані в польових умовах на БЦДСС, висаджували в пластикові посудини об'ємом 2–3 л. Яровизацію проводили в холодильній камері за температури повітря 4–6 °С протягом 60–70 діб. Далі посудини з коренеплодами переносили в шафи з освітленням 2–4 клк та тривалістю світлового періоду 16 годин.

Другий етап – насінники вирощували в польових умовах на дослідному полі ІБКіЦБ та БЦДСС, висаджуючи у відкритий ґрунт маточні коренеплоди, що також були вирощені в польових умовах на БЦДСС.

Стебла з бутонами відокремлювали від насінників цукрових буряків, стерилізували та висаджували на модифіковане агаризоване живильне середовище Мурасіге–Скуга [9], що містило ½ дози макроелементів та повну дозу мікроелементів з додаванням вітамінів за Гамборгом [10] та аскорбінової кислоти (вітамін С) в дозі 1 мг/л, амінокислот: глютамінової – 250 мг/л, аспарагінової кислоти – 30 мг/л, тирозину – 5 мг/л, аргініну – 3 мг/л, гідроксипроліну – 2 мг/л, регуляторів росту: 2,4-Д – 2 мг/л та БАП – 0,6мг/л та АБК – 0,2–0,4 мг/л. Колби з експлантами витримували у холодильній камері за температури 4–10 °С, при 16–годинному освітленні 1,0–2,0 клк протягом 7–30 діб (рис. 1). Пиляки після проведення передобробки висаджували на живильне середовище певного складу. Для стимуляції непрямого андрогенезу, зокрема його першої фази – калусогенезу, пиляки висаджували на модифіковане агаризоване середовище такого ж самого складу, тоді ж для індукції прямого андрогенезу – утворення ембріодів та в подальшому мікроклонів, використовували середовища іншого складу.

В якості еталону було обрано спосіб передобробки бутонів моркви на агаризованому живильному середовищі МС з 0,2 мг/л 2,4-Д, які витримували в термостаті протягом 2–4 тижнів у темряві при 20–25 °С.

У дослідах визначали загальну кількість пиляків, що були висаджені на кожному середовищі; кількість пиляків, що виявили андрогенну активність та кількість калусів і ембріодів як відсоток від кількості висаджених пиляків для генотипів селекційного номеру та кожного живильного середовища.

Повторність досліду – шести–восьми разова (6–8 колб з 4–8 експлантами). Проводили статистичну обробку отриманих даних [13].



Рис. 1. Передобробка стебел з бутонами з насінників цукрових буряків *in vitro* в холодильній камері

Обговорення результатів. Результати дослідження впливу температурного режиму та складу живильних середовищ, що були застосовані для передобробки експлантів – стебел з бутонами, які відокремлювали від насінників цукрових буряків, стерилізували та висаджували на модифіковане агаризоване живильне середовище, свідчать, що застосування методу передобробки експлантів – з температурним режимом 20–25 °С та використанням модифікованого живильного середовища МС з 0,2 мг/л 2,4-Д, який був рекомендований для передобробки бутонів моркви в умовах *in vitro*, є неефективним для індукції калусогенезу та ембріогенезу пиляків цукрових буряків. Отримати певну кількість калусів та ембріоїдів з пиляків цукрових буряків в умовах *in vitro* вдалося за рахунок проведення холодової передобробки експлантів генеративних стебел з бутонами *in vitro* на агаризованих живильних середовищах іншого складу – модифікованих живильних середовищах Мурасіге–Скуга з додаванням вітамінів за Гамборгом та аскорбінової кислоти – 1 мг/л, амінокислот: глютамінової – 250 мг/л, аспарагінової – 30,0 мг/л, тирозину – 5 мг/л, аргініну – 3 мг/л, гідроксипроліну – 2 мг/л, регуляторів росту: 2,4-Д – 2,0 мг/л та 6-БАП – 0,6 мг/л та з додаванням АБК – 0,2–0,4 мг/л. На дослідному середовищі без АБК кількість отриманих калусів становила $1,8 \pm 0,16$ – $2,1 \pm 0,07$ %, ембріоїдів – $0,9 \pm 0,1$ – $1,2 \pm 0,2$ %, тоді як на середовищах з АБК вихід калусів підвищився до $2,7 \pm 0,3$ – $5,1 \pm 0,3$ %, ембріоїдів – до $5,0 \pm 0,4$ – $6,3 \pm 0,5$ % в залежності від генотипу (диплоїд, тетраплоїд) та дозування АБК – 0,2; 0,3; та 0,4 мг/л. Саме такий склад живильних середовищ дозволив підвищити вихід калусів більш як у два рази, а ембріоїдів у 5–6 разів. Найбільший ефект було отримано за використання живильного середовища з додаванням АБК 0,3 мг/л, де кількість отриманих калусів становила $4,9 \pm 0,3$ – $5,1 \pm 0,5$ %, ембріоїдів – $6,1 \pm 0,5$ – $6,3 \pm 0,6$ % в залежності від плоїдності генотипів (рис. 2, 3). Кількість калусів у тетраплоїдів становила $4,9 \pm 0,3$ %, у диплоїдів – $5,1 \pm 0,5$ %, кількість ембріоїдів дорівнювала $6,1 \pm 0,5$ % у диплоїдів та $6,3 \pm 0,6$ % у тетраплоїдів (табл. 1).



Рис. 2. Підвищення індукції калусогенезу в культурі *in vitro* пиляків цукрових буряків за рахунок передобробки експлантів

**Вплив передоброби експлантів на ініціацію утворення калусів та ембріодів на
пиляках цукрових буряків**

| Температурний режим та склад живильного середовища, що застосовані для передоброби експлантів | Частота калусогенезу у генотипів цукрових буряків, % | | Частота утворення ембріодів у генотипів цукрових буряків, % | |
|---|--|----------|---|----------|
| | БЦ 45 К8 | 1475 К22 | 1475 К22 | БЦ 45 К8 |
| Температура – 20–25 °С; живильне середовище МС з додаванням 0,2 мг/л 2,4-Д | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Температура 4–10 °С, живильне середовище МС з додаванням 0,2 мг/л 2,4-Д | 0,4±0,05 | 0,7±0,06 | 0 | 0 |
| Температура – 20–25 °С; живильне середовище МС з додаванням вітамінів за Гамборгом та аскорбінової кислоти – 1 мг/л, амінокислот: глютамінової – 250 мг/л, аспарагінової – 30 мг/л, тирозину – 5 мг/л, аргініну – 3 мг/л, гідроксипроліну – 2 мг/л, регуляторів росту: 2,4-Д – 2 мг/л, 6-БАП – 0,6 мг/л | 0,9±0,10 | 1,0±0,02 | 0 | 0 |
| Температура 4–10 °С, живильне середовище варіанту №3 | 1,8±0,16 | 2,1±0,07 | 0,9±0,1 | 1,2±0,2 |
| Температура 4–10 °С, живильне середовище варіанту №3 та АБК – 0,2 мг/л | 2,7±0,3 | 3,1±0,3 | 5,0±0,4 | 5,7±0,5 |
| Температура 4–10 °С, живильне середовище варіанту №3 та АБК – 0,3 мг/л | 5,1±0,5 | 4,9±0,3 | 6,1±0,5 | 6,3±0,6 |
| Температура 4–10 °С, живильне середовище варіанту №3 та АБК – 0,4 мг/л | 4,5±0,4 | 4,1±0,2 | 5,3±0,5 | 5,6±0,3 |

Примітка 1: БЦ 45 К8 – диплоїди, 1475 К22 – тетраплоїди

Примітка 2. Різниця між варіантами 4 та 5, 6, 7 за показником частота калусогенезу у генотипів цукрових буряків (%) статистично значуща при $p < 0,002$;

- різниця між варіантами 3 та 4, 5, 6, 7, а також між варіантами 2 та 3, 4, 5, 6, 7 за показником частота калусогенезу у генотипів цукрових буряків (%) статистично значуща при $p < 0,001$;

- різниця між варіантами 4 та 5, 6, 7 за показником частота утворення ембріодів у генотипів цукрових буряків (%) статистично значуща при $p < 0,001$.

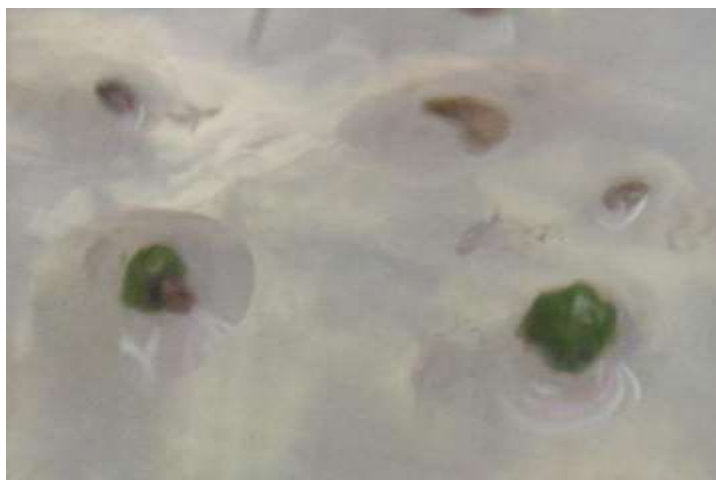


Рис. 3. Підвищення індукції утворення ембріодів в культурі *in vitro* пиляків цукрових буряків за рахунок передоброби експлантів

Подібну передобробку суцвіть холодом 4 °С протягом одного тижня було успішно застосовано для стимулювання гіногенезу у цукрових буряків [11], тоді як для деяких культур ефективною була передобробка бутонів підвищеною температурою. Так, культивування пиляків гірчиці білої за температури 35 °С протягом двох діб після їх ізолювання стимулювало утворення андрогенних структур [12].

Таким чином, розроблений метод підвищення ефективності експериментального андрогенезу цукрових буряків в умовах *in vitro* дозволяє збільшити кількість калусів та ембріодів з пиляків цукрових буряків в умовах *in vitro* за рахунок холодової передобробки експлантів – стебел з бутонами, яку проводять у холодильній шафі, де розміщують колби зі стерильними експлантами, висадженими на агаризоване живильне середовище, яке на відміну від живильного середовища еталону містить іншу кількість 2,4-Д – 2 мг замість 0,2 мг. Середовище еталону не містить амінокислот, крім гліцину, вітаміни надано в інших дозах, вітамін С (аскорбінова кислота) – відсутній, тоді як до складу розробленого нами модифікованого середовища МС, яке призначене для передобробки саме експлантів цукрових буряків та отримання калусу, ембріодів та мікроклонів (рис. 4) з пиляків цукрових буряків *in vitro* входять амінокислоти – глютамінова, аспарагінова, тирозин, аргінін, гідроксипролін, вітаміни за Гамборгом та аскорбінова кислота, регулятори росту, зокрема АБК, яка відсутня в середовищі еталону.



Рис.4. Мікроклони цукрових буряків, які отримані методом прямого андрогенезу

Використання розробленого методу підвищення ефективності індукції експериментального андрогенезу цукрових буряків в умовах *in vitro* в біотехнологічних дослідженнях та селекційній практиці сприятиме збільшенню кількості утворених калусів та ембріодів у культурі *in vitro* пиляків цукрових буряків та отриманню гаплоїдних регенерантів для селекційних програм створення гомозиготних ліній.

Висновки. Розроблено метод підвищення ефективності індукції експериментального андрогенезу цукрових буряків в умовах *in vitro*, що включає низькотемпературну передобробку експлантів – стебел з бутонами цукрових буряків на агаризованому модифікованому середовищі Мурасіге–Скуга з додаванням вітамінів за Гамборгом та аскорбінової кислоти – 1 мг/л, амінокислот: глютамінової – 250 мг/л, аспарагінової – 30,0 мг/л, тирозину – 5,0 мг/л, аргініну – 3,0 мг/л, гідроксипроліну – 2,0 мг/л, регуляторів росту: 2,4-Д – 2,0 мг/л, 6-БАП – 0,6 мг/л та АБК – 0,2–0,4 мг/л та культивування ізолюваних пиляків на живильних середовищах того ж самого складу, який дозволяє підвищити вихід калусів більш як у два рази, а ембріодів у 5–6 разів при інокуляції пиляків на живильні середовища.

Використання розробленого методу в біотехнологічних дослідженнях та селекційній практиці сприятиме підвищенню індукції андрогенезу, збільшенню кількості утворених калусів та ембріодів в культурі *in vitro* та отриманню гаплоїдних регенерантів для селекційних програм створення гомозиготних ліній цукрових буряків.

Список використаних джерел

1. Суханов В.М. Андроклиния и ее особенности у пшеницы: автореф. дис. канд. биол. наук: спец.03.00.15. 1983. Саратов. 24 с.
2. Кильчевский А.В., Хотылева Л.В. Биотехнология и селекция растений. Клеточная инженерия. Минск, 2012. 489 с.
3. Robert N. Trigiano, Dennis J. Gray plant tissue culture, development, and biotechnology. CRS Press. 2016. 608 p.
4. Bishun Deo Prasad, Sangita Sahni, Prasant Kumar, Mohammed Wasim Siddiqui: Plant Biotechnology: principles, techniques, and applications. CRC Press. 2017. 562 p.
5. Ермишин А.П. Генетические принципы создания и отбора исходного материала в селекции картофеля на гетерозис: дис... д-ра биол. наук: 03.00.15. 1998. Минск. Академия наук Беларуси. Институт генетики и селекции. 317с.
6. Лобанова К.І., Шестопал О.Л., Ігнатова С.О. Абсцизова кислота як екзогенний фактор підвищення регенераційного потенціалу в культурі пиляків м'якої пшениці. Вісник Харківського Національного аграрного університету. Серія біологія. 2007. Вип. 1 (10). С. 102–110.
7. Van Bergen S., Kottenhagen, van der Meulen R.M., Wang M. Effects of ABA during the pre-treatment of barley anthers on androgenesis of *Hordeum vulgare* L. cultivars Igri and Digger. Anther and Pollen: From Biology to Biotechnology. C. Clement, E. Pacini. J-C. Audran. Springer Science Business Media. 2012. 263 p.
8. Тюкавин Г.Б. Основы биотехнологии моркови. М.: ВНИИССОК, 2007. 480 с.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. P. 473–497.
10. Gamborg O.L. Constable F., Shiluk J.P. Organogenesis in callus form shoot apices of *Pisum sativum*. *Physiol. Plant.* 1974. № 30. P. 125–128.
11. Arman Pazuki, Fatemeh Aflaki, Songul Gurel, Gurel Ekrem. Gynogenesis induction in sugar beet (*Beta vulgaris*) improved by 6-benzylaminopurine (BAP) and synergized with cold pre-treatment. *Sugar Tech.* 2018. 20 (1). P. 69–77.
12. Муравлев А.А., Рогожина Т.Г., Чеснокова Е.В. Влияние предобработки, начальных условий культивирования, питательных сред и генотипа на отзывчивость пыльников *in vitro* горчицы белой (*Sinapis alba* L.). *Инновационная наука.* 2016. № 12. С. 76–80.
13. Шеламова М.А., Инсарова Н.И., Лещенко В.Г. Статистический анализ медико-биологических данных с использованием программы Excel. Минск: БГМУ, 2010. 96 с.

References

1. Suhanov VM. Androclinia and its peculiarities in wheat. [dissertation]. Saratov, 1983. 24 p.
2. Kilchevskiy AV, Hotuleva LV. Biotechnology in plant breeding. Cell Engineering. Minsk: Belarus. Navuka, 2012.
3. Robert N, Trigiano Dennis J Gray. Plant tissue culture, development, and biotechnology. CRS Press, 2016
4. Bishun Deo Prasad, Sangita Sahni, Prasant Kumar, Mohammed Wasim Siddiqui. Plant biotechnology: principles, techniques, and applications. CRC Press, 2017.
5. Ermishin AP. Genetic principles of creation and selection of starting material in potato breeding for heterosis. [dissertation]. [Institute of Genetics and Selection, Belarus]. Minsk, 1998.
6. Lobanova KI, Shestopal OL, Ignatova SO. Abscisic acid as an exogenous factor for increasing the regenerative potential in the culture of soft wheat pests. *Visnik Harkivskogo Natsionalnogo agrarnogo universitetu. Seriya biologiya.* 2007; 1(10): 102–110.

7. Van Bergen S, Kottenhagen van der Meulen RM, Wang M. Effects of ABA during the pretreatment of barley anthers on androgenesis of *Hordeum vulgare* L. cultivars Igri and Digger. In: C Clement, E Pacini, J-C Audran, eds. Anther and Pollen: From Biology to Biotechnology. Springer Science Business Media. 2012. P. 191–200.
8. Tyukavin GB. Basics of carrot biotechnology. Moscow: VNISSOK, 2007.
9. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962; 15: 473–497.
10. Gamborg OL, Constable F, Shiluk JP. Organogenesis in callus form shoot apices of *Pisum sativum*. *Physiol. Plant.* 1974; 30: 125–128.
11. Arman Pazuki, Fatemeh Aflaki, Songul Gurel, Gurel Ekrem. Gynogenesis induction in sugar beet (*Beta vulgaris*) improved by 6-benzylaminopurine (BAP) and synergized with cold pretreatment. *Sugar Tech.* 2018; 20(1): 69–77.
12. Muravlev AA, Rogozin TG, Chesnokova EV. The effect of pretreatment, initial culture conditions, nutrient media and genotype on the responsiveness of anthers in vitro white mustard (*Sinapis alba* L.). *Innovative science.* 2016; 12: 76–80.
13. Shelamova MA, Insarova NI, Leshenko VG. Statistic analyses of medical and biological data with using Excel program. Minsk: BSMU, 2010.

МЕТОД ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНДУКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АНДРОГЕНЕЗА САХАРНОЙ СВЕКЛЫ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Гонтаренко С.Н., Герасименко А.Н.

Институт биоэнергетических культур и сахарной свеклы, Украина

Цель и задачи исследования. Разработать метод повышения эффективности индукции экспериментального андрогенеза сахарной свеклы в условиях *in vitro*.

Материалы и методы. Исследования проводили в 2014–2017 гг. Исходным был селекционный материал Белоцерковской опытно-селекционной станции – тетраплоидные опылители и диплоидные семенники сахарной свеклы, генотипы селекционных номеров БЦ 45 К1 – К15, 1475 К1-25. Методы исследования биотехнологические, селекционные, физиологические, статистические.

Результаты. Исследовано влияние температурного режима и состава питательных сред, применяемых для предобработки эксплантов – стеблей с бутонами. В исследованиях использованы тетраплоидные опылители и диплоидные семенники сахарной свеклы, которые выращивали в полевых и лабораторных условиях. Экспланты культивировали *in vitro* при различных температурных режимах – от 4–10 °С до 20–25 °С на модифицированных агаризованных питательных средах. Лучшие результаты были получены при культивировании эксплантов в холодильной камере при температуре 4–10 °С при 16-часовом освещении 1,0–2,0 КЛК в течение 7–30 суток с использованием агаризованной питательной среды Мурасиге–Скуга, содержащей ½ дозы макроэлементов и полную дозу микроэлементов с добавлением витаминов по Гамборгу и аскорбиновой кислоты – 1 мг/л, аминокислот: глутаминовой – 250 мг/л, аспарагиновой – 30,0 мг/л, тирозина – 5 мг/л, аргинина – 3 мг/л, гидроксипролина – 2 мг/л, регуляторов роста: 2,4-Д – 2,0 мг/л, 6-БАП – 0,6 мг/л и АБК – 0,3 мг/л, что способствовало увеличению количества полученных каллусов из пыльников с 1,8–2,1 % до 4,9–5,1 %, эмбриоидов – с 0,9–1,2 % до 6,1–6,3 % соответственно.

Выводы. Разработан метод повышения эффективности индукции экспериментального андрогенеза сахарной свеклы в условиях *in vitro*, включающий низкотемпературную предобработку эксплантов – стеблей с бутонами сахарной свеклы на модифицированной агаризованной среде Мурасиге–Скуга с добавлением витаминов, аминокислот, регуляторов роста и, в частности, АБК – 0,3 мг/л. Применение метода позволяет повысить

выход каллусов более чем в два раза, а эмбриоидов – в 5-6 раз из пыльников сахарной свеклы *in vitro*, что обеспечит получение гаплоидных регенерантов для селекционных программ создания гомозиготных линий.

Ключевые слова: андрогенез, эмбриоиды, каллус, предобработка эксплантов, пыльник, регулятор роста, сахарная свекла

METHOD FOR INCREASING THE EFFICIENCY OF IN VITRO EXPERIMENTAL ANDROGENESIS INDUCTION IN SUGAR BEET.

Gontarenko S., Gerasymenko G.
Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet, Ukraine

Purpose and objectives. To develop a method for increasing the efficiency of *in vitro* experimental androgenesis induction in sugar beet.

Material and methods. The study was conducted in 2014–2017. The breeding material of Bila Tserkva Experimental Breeding Station, sugar beet tetraploid pollinators and diploid seed bearers (breeding genotypes BC 45 K1 - K15, 1475 K1-25) were taken as the test material. Biotechnological, breeding, physiological and statistical methods were used.

Results and discussion. The influence of temperature regime and composition of nutrient media used for pre-treatment of explants, stalks with buds, was investigated. Sugar beet tetraploid pollinators and diploid seed bearers grown in the field and under the laboratory conditions were used in the study. The explants were cultured *in vitro* at various temperature – from 4–10 to 20–25°C on modified agarized nutrient media. The best results were obtained, when explants were cultured on Murashige–Skoog medium containing ½ doses of macronutrients and full doses of micronutrients supplemented with Gamborg’s vitamin solution, ascorbic acid (1 mg/L), amino acids (glutamine –250 mg/L, asparagine – 30.0 mg/L, tyrosine – 5 mg/L, arginine – 3 mg/L, hydroxyproline – 2 mg/L), and growth regulators (2,4-D – 2.0 mg/L, 6-BAP – 0.6 mg/L and ABA – 0.3 mg/L) in a refrigerator at 4–10 °C, with 16-hour illumination of 1.0–2.0 kilolux for 7–30 days. Such conditions increased the numbers of calluses from anthers from 1.8–2.1% to 4.9–5.1%, of embryoids from 0.9–1.2% to 6.1–6.3%.

Conclusions. The method for increasing the efficiency of *in vitro* experimental androgenesis induction in sugar beet, which includes low-temperature pre-treatment of explants - stalks with buds on Murashige-Skoog modified medium supplemented with vitamins, amino acids and growth regulators, in particular, ABA (0.3 mg/L), was developed. Application of the method allows over twice increase in the calluse number and 5–6 time increase in the number of embryoids obtained from sugar beet anthers *in vitro*, which will ensure the production of haploid regenerants for breeding programs to create homozygous lines.

Key words: androgenesis, anthers, embryoids, callus, pre-treatment of explants, growth regulator, sugar beet