

УДК 633.63:631.52

ИНТЕГРАЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС *BETA VULGARIS L.*

E.O. Колесникова*, Е.И. Донских, Р.В. Бердников

*Селекционно-генетический центр ООО «СоюзСемСвекла»
пос. ВНИИСС, Рамонский район, Воронежская область, Россия*

INTEGRATION OF BIOTECHNOLOGY INTO THE BREEDING PROCESS *OF BETA VULGARIS L.*

E.O. Kolesnikova, E.I. Donskikh, R.V. Berdnikov

*Breeding and Genetic Center “UnionSeedsBeet”, Ltd.,
VNIISS, Ramonsky district, Voronezh region, Russia*

В современных реалиях обновленная Стратегия научно-технологического развития Российской Федерации предполагает формирование и реализацию собственного пути развития, который направлен на обеспечение суверенитета страны. Перед сельскохозяйственным производством существует необходимость перестройки деятельности с целью ее интенсификации, так как от возможности обеспечения населения в том числе и продуктами питания зависит стабильность развития государства. На помощь традиционным методам селекции пришли биотехнологии, которые имеют своей целью повышение продуктивности растений, определение и улучшение ценных характеристик, создание новых и сохранение имеющихся генетических ресурсов, размножение идентичного родительским формам ценного исходного материала, диагностику заболеваний. Ученые-биотехнологи так же занимаются получением растений, устойчивых к неблагоприятным факторам среды, болезням и вредителям, созданием трансгенных и генетически отредактированных растений, обладающих новыми ценными признаками. Именно поэтому на сегодняшний день использование биотехнологических приемов является особенно актуальным.

Для снижения зависимости страны от импорта семян такой важной сельскохозяйственной культуры как сахарная свекла, в 2017 году в Воронежской области был создан Селекционно-генетический центр «СоюзСемСвекла», основной задачей которого стало создание полного цикла производства отечественных семян, получение качественно новых, высокопродуктивных, устойчивых к заболеваниям, обладающих выравненностью по основным биологическим и морфологическим признакам гибридов. Сочетание биотехнологических достижений и традиционных методов селекции является ключом к достижению поставленных целей по достижению полной независимости страны в области сельского хозяйства.

Beta vulgaris L. - перекрестноопыляемая культура с двулетним циклом развития. Поэтому в целях ускорения селекционного процесса крайне важно использование биотехнологических методов, которые позволяют увеличить количество и качество получаемого селекционного материала. Данные методы также позволяют проводить работы в течение всего года, что может значительно сократить сроки производства чистых линий, новых гибридов и семян.

Основными направлениями биотехнологических работ в ООО «СоюзСемСвекла» являются:

- анализ пloidности растений методом проточной цитометрии;
- молекулярно-генетическое изучение образцов для выявления определенных признаков на генетическом уровне;

- цитологический анализ качества пыльцевых зерен;
- получение гаплоидных, гомозиготных форм - выравненных чистых линий;
- микроклональное размножение растений в культуре тканей, массовое получение выравненных линий и сохранение ценных генотипов *in vitro* (рис. 1).



Рисунок 1. Микроклоны сахарной свеклы в лаборатории ООО «СоюзСемСвекла»

Главной целью работы предприятия является создание гетерозисных гибридов сахарной свеклы F1 на основе подбора и скрещивания ценных родительских линий. В ходе селекционно-биотехнологического процесса осуществляется строгий контроль растений по фенотипическим и генетическим признакам, которые определяют качество будущих гибридов. Для осуществления молекулярно-генетического анализа мы получаем растительную ДНК из листьев сахарной свеклы при помощи автоматизированных станций. Затем проводим полимеразную цепную реакцию с молекулярными маркерами, позволяющими определить тип ядра и цитоплазмы [1, 2]. При проведении ПЦР в режиме реального времени устанавливаем склонность растений к цветению в первый год жизни и устойчивость к основным заболеваниям, влияющим на продуктивность. При этом используются маркерные системы, созданные для выявления однонуклеотидных полиморфизмов в генах, отвечающих за проявление признаков [3]. Полученные данные позволяют отобрать ценный растительный материал, который используется для создания генетической коллекции в дальнейшем селекционном процессе.

В лаборатории так же используются микроскопические методы для диагностики качества пыльцевых зерен у растений сахарной свеклы. Данный анализ проводится в целях выявления наиболее перспективных фертильных образцов или подтверждения стерильности. Для получения микропрепарата производится окрашивание пыльников изолированных бутонаов ацетокарминовым методом. Цитоплазма фертильных пыльцевых зерен при окрашивании имеет ярко-розовый цвет. У стерильных образцов наблюдается полное отсутствие пыльцевых зерен, либо незначительное количество пыльцевых зерен с прозрачной цитоплазмой, слабо окрашенных или деформированных (рис. 2).

Ускорение селекции происходит также за счет сокращения времени получения чистых линий на основе гаплоидов *in vitro*. Создание таким образом полностью гомозиготного материала происходит в течение 2–4 лет. В то время, как классические методы при селекции на гетерозис у перекрестноопыляющихся культур позволяют достичь гомозиготности после 6–7 лет инбридинга. Поскольку сахарная свекла имеет 2-летний цикл развития, то данный процесс длится в среднем 12 лет. [4].

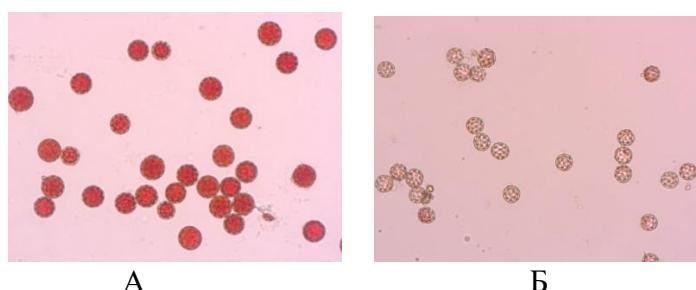


Рисунок 2. Препараторы пыльцы с фертильными (А) и стерильными пыльцевыми зернами (Б) растений сахарной свёклы

При создании гомозиготных линий через получение гаплоидов *in vitro*, а также при культивировании растений *in vitro* и *in situ* особо важен анализ количества ДНК в ядрах клеток, который дает информацию о пloidности организма и представляет большую ценность для потенциального увеличения урожайности. Определение набора хромосом проводится методом проточной цитометрии, позволяющей сравнивать растения с разным размером генома и определять абсолютное содержание ядерной ДНК (рис. 3).



Рисунок 3. Цитометрический анализ пloidности растений *Beta vulgaris*

Созданию гомозиготных форм и чистых линий *in vitro* предшествует получение растений с одинарным набором хромосом. Сахарная свекла трудно культивируется в искусственных условиях и не способна к андрогенезу – развитию из пыльников или микроспор. Поэтому гиногенез – получение гаплоидных форм путем культивирования неопыленных семязачатков на искусственной питательной среде, является единственным возможным способом развития гаплоидных растений данной культуры [5]. Данный метод активно используется в отделе биотехнологии в целях получения гаплоидов сахарной свеклы [4]. Растительные гормоны, содержащиеся в питательной среде, индуцируют гиногенез в клетках зародышевых мешков. Выход гаплоидов в культуре *in vitro* зависит от положения цветка на цветоносном побеге, условий культивирования эксплантов, генотипа донорских растений и других условий [6]. Для стимуляции гиногенеза производят отбор частей генеративных побегов перспективных растений сахарной свеклы, произрастающих в естественных условиях среды. В стерильных условиях извлекают неоплодотворенные семязачатки из закрытых бутонов и размещают их на питательной среде в культуральных сосудах. Регенерации появляются начиная с четвертой недели культивирования *in vitro* и могут иметь вид полноценных проростков, морфогенных и неморфогенных структур, каллуса (рисунок 4: А, Б, В).

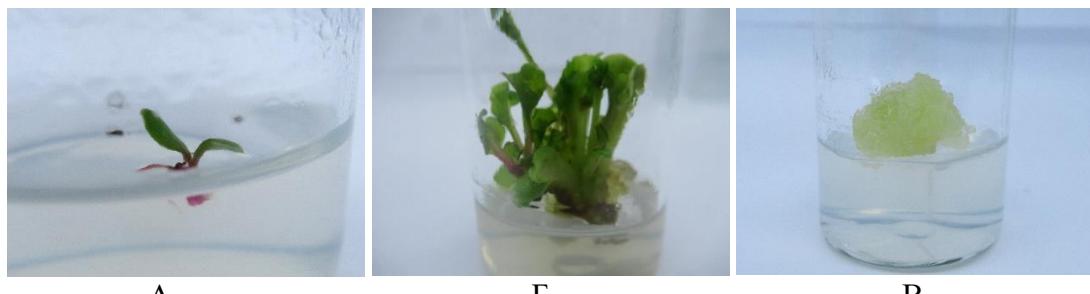


Рисунок 4. Структуры, развившиеся из неоплодотворенных семязачатков: А) развитый проросток, Б) морфогенная структура, В) неморфогенная каллусная структура

У развитых регенеранты определяют полидность. Выявленные гаплоидные формы размножаются и подвергаются воздействию антимитотических веществ для нарушения процесса митоза и образования удвоенных гаплоидов. Диплоидизация хромосомного набора гаплоидных форм может сопровождаться гибелем некоторых растений в связи с токсичностью используемых веществ. Полученные диплоидные формы укореняются *in vitro*, высаживаются в условия закрытого грунта для получения штаклингов и включения в дальнейший селекционный процесс.

Для получения в условиях *in vitro* микроклонов и *ex vitro* штаклингов перспективных компонентов гибридов сахарной свеклы в культуре тканей используются апикальные меристемы размером 2-4 см (рисунок 5: А, Б, В). Стерилизация осуществляется по разработанной и запатентованной методике (патент 2 796 463(13) С1). Из тканей введенного экспланта развивается регенерант, а со временем и нормально развитый микроклон, способный к росту и дальнейшему культивированию *in vitro*.



Рисунок 5. А) апикальные меристемы *in vitro*, Б) апикальная меристема с регенерацией в виде микропобега, В) пересаженные на свежие питательные среды микроклон и апикальная меристема

Размноженные и укорененные *in vitro* микроклоны выравненных линий компонентов гибридов сахарной свеклы с ценными селекционными признаками высаживаются в подготовленный субстрат в условиях тепличного комплекса ООО «СоюзСемСвекла» (рисунок 6: А, Б, В, Г). Контролируемый климат (свет, влажность, температура) позволяет ускорить процессы развития растений-регенерантов и за короткий промежуток времени получить корнеплоды компонентов гибридов сахарной свеклы, которые затем используются в селекционном процессе создания качественных гибридов.

С применением биотехнологических методов происходит ускорение селекционного процесса по получению высокопродуктивных гибридов при сокращении времени отбора, производства чистых линий, затрат на многолетнее культивирование и самоопыление растений. Работы, проводимые в селекционно-генетическом центре, позволяют создавать и совершенствовать технологии селекции, активно и продуктивно применять методику

микроклонального размножения в условиях *in vitro*, использовать методы молекулярной биологии в целях контроля качества растительного материала, разрабатывать и внедрять прогрессивные технологии семеноводства сахарной свеклы.

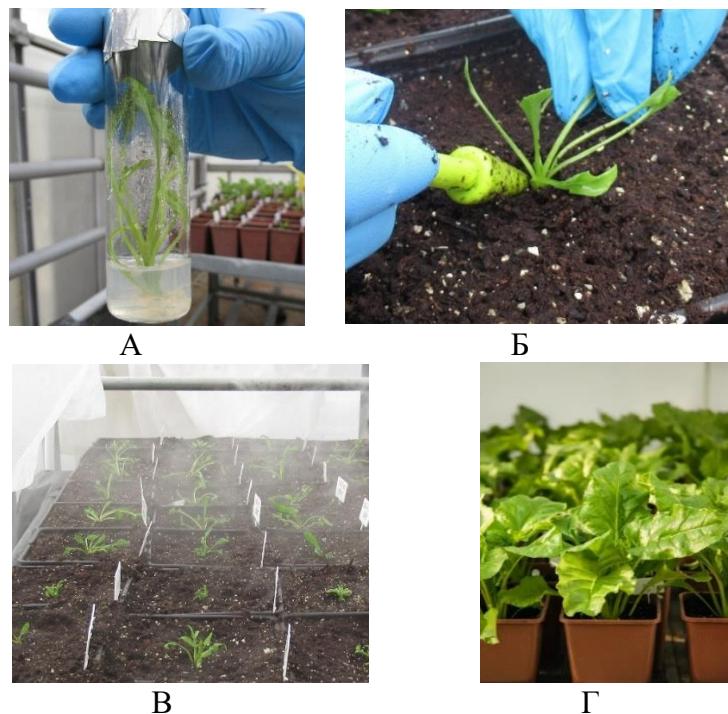


Рисунок 6. Растения сахарной свеклы в условиях закрытого грунта. А) – укорененный *in vitro* микроклон перед высадкой, Б) процесс помещения микроклона в закрытый грунт, В) адаптация в условиях повышенной влажности, Г) развитые растения

Библиографический список

1. Nishizawa S., Kubo T., Mikami T. Variable number of tandem repeat loci in the mitochondrial genomes of beets //Current Genetics. – 2000. – Т. 37. – Р. 34-38.
2. Moritani M. et al. Identification of the predominant nonrestoring allele for Owen-type cytoplasmic male sterility in sugar beet (*Beta vulgaris* L.): development of molecular markers for the maintainer genotype //Molecular Breeding. – 2013. – Т. 32. – Р. 91-100.
3. Pin P. A. et al. The role of a pseudo-response regulator gene in life cycle adaptation and domestication of beet //Current Biology. – 2012. – Т. 22. – №. 12. – Р. 1095–110.
4. Колесникова Е.О., Донских Е.И., Бердников Р.В. Биотехнологии гаплоидов как инструмент создания селекционного материала сахарной свеклы//Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2021. – Т. 25. № 8. – с. – 812–821.
5. Gurel, S., Pazuki, A., Aflaki, F., Gurel, E. Production of Doubled Haploid Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Plants Through Gynogenesis. In: Segui-Simarro, J.M. (eds) Doubled Haploid Technology. Methods in Molecular Biology. Humana, New York. –V 2289.–2021. – Р. 313–323.
6. Е. И. Малецкая, С. С. Юданова, С. И. Малецкий / Гаплоидия в апозиготических семенных потомствах сахарной свеклы *Beta vulgaris* L.//Доклады академии наук. – 2009. – Т. 426. № 5, – с. 710–713.