

# БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ И ПОДДЕРЖАНИЮ *IN VITRO* ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ *BETA VULGARIS L.*

**Васильченко Е.Н.**

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»  
e-mail: vasilchenko@inbox.ru

**Аннотация.** Рассматриваются современные биотехнологические методы, направленные на создание и поддержание *in vitro* генетической коллекции сахарной свеклы (*Beta vulgaris L.*) в условиях замедленного роста. Поддержание осуществляется путем чередования гормональных и безгормональных питательных сред, что обеспечивает сохранение генетической стабильности при регулярном субкультивировании. Предлагается комплексный двухэтапный подход к созданию коллекции. На первом этапе проводится отбор и оценка донорных растений (МС-форм, О-типов, ОП) с применением цитологических исследований, проточной цитометрии и молекулярно-генетического RFLP-анализа. На втором этапе осуществляется стерилизация эксплантов, оздоровление и поддержание коллекции в условиях замедленного роста с использованием чередования питательных сред для обеспечения генетической стабильности.

**Ключевые слова:** сахарная свекла, генетическая коллекция *in vitro*, микроклональное размножение, проточная цитометрия, RFLP-анализ, ЦМС, стабильность генома.

**Введение.** Сохранение биоразнообразия растительного мира, включая ценные селекционные формы, является одной из приоритетных задач современной биологии. Наряду с классическими подходами (созданием заповедных территорий, ботанических садов и банков семян) все более востребованными становятся методы биотехнологии, в том числе поддержание культур редких и хозяйственно значимых видов на искусственных питательных средах в генетических банках *in vitro* [1, 2]. Данные методы обеспечивают круглогодичную доступность материала, его освобождение от патогенов, высокий коэффициент размножения и значительную экономию площадей.

Развитие биоресурсных коллекций, соответствующих мировым стандартам, закреплено на государственном уровне, в частности, в Федеральной научнотехнической программе развития генетических технологий на 2019–2027 гг. [3].

Сахарная свекла как типичное перекрестноопыляющееся растение представляет особую сложность для сохранения генетической «чистоты» исходных линий в полевых условиях. Культура *in vitro* предлагает решение этой проблемы, но требует разработки специфических протоколов, гарантирующих генетическую стабильность и высокую регенерационную способность для каждого генотипа [4, 5, 6].

**Цель данного исследования** – разработка и оптимизация двухэтапной методологии создания и поддержания *in vitro* в условиях замедленного роста генетической коллекции селекционно-ценных генотипов сахарной свеклы.

**Материалы и методы исследований.** Исследования проводили в лаборатории культуры тканей и молекулярной биологии отдела биотехнологии ФГБНУ «ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова».

В качестве исходного материала были использованы компоненты гибридов сахарной свеклы из лаборатории ЦМС и лаборатории исходного материала – МС-формы, О-типы, ОП.

Фертильность пыльцевых зерен определяли методом окрашивания 2 % раствором ацетокармина с последующим осветлением препаратов в жидкости Гойера. Оценку и отбор материала по уровню плоидности осуществляли посредством проточной цитометрии.

Генотипирование растений по типу цитоплазмы проводили с использованием молекулярно-генетического RFLP-анализа с рестриктазой *Alu I*. Поверхностную стерилизацию бутонов выполняли хлорсодержащими растворами с последующей четырехкратной промывкой стерильной дистиллированной водой. Питательные среды готовили на основе солей по прописи Гамборга (B5) с добавлением витаминов по Уайту. В состав сред вносили рострегулирующие вещества (БАП, ГК, кинетин) и антибактериальные препараты (Цефотаксим, Рифампицин, Цефтриаксон, Азитромицин) в различных комбинациях и концентрациях.



Рисунок 1. Схема отбора донорных растений сахарной свеклы для введения в культуру *in vitro*

Культивирование эксплантов проводили при 16-часовом фотопериоде, температуре — 23–26 °С, освещенности — 5 тыс. люкс и влажности воздуха — 70 %.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Создание генетической коллекции селекционно-ценных генотипов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) *in vitro* представляет собой совокупность последовательных этапов, включающих отбор исходного материала, его комплексную оценку и применение биотехнологических методов, обеспечивающих долгосрочную генетическую стабильность полученных образцов.

Важное значение при введении растительного материала в культуру *in vitro* уделяется генотипическим особенностям донорского материала.

**Первый этап.** В летний период в полевых условиях проведен отбор селекционно-ценного исходного материала сахарной свеклы (МС-форм, О-типов, ОП) на стадии бутонизации. Растения отбирали с учетом габитуса куста, одновременности цветения, а также по признакам разделяльно-сростноцветковости.

Цитологические исследования пыльцы растений позволили идентифицировать и отобрать морфологически стерильные (МС) формы с показателем стерильности до 100 %, а также растения О-типа и сростноцветкового ОП с высокой степенью фертильности (95–97 %). Данный отбор обеспечивает основу для формирования селекционного материала, обладающего заданными характеристиками репродуктивной способности.

Цитофотометрический анализ исходного материала позволил идентифицировать растения по уровню плоидности, сформировать и выделить *in vitro* линии, характеризующиеся диплоидным набором хромосом ( $2n = 18$ ).

Проведение молекулярно-генетического RFLP-анализа с использованием рестриктазы *Alu I* позво-

лило генотипировать растения-регенеранты по типу цитоплазмы, что играет существенную роль в фенотипической экспрессии и адаптивных свойствах растений [7].

Таким образом, тщательный отбор и комплексная оценка исходных растений сахарной свеклы на этапе инициации культуры *in vitro* являются критически важной основой для формирования генетически стабильной коллекции (рис. 1).

**Второй этап.** На данном этапе проводили пополнение коллекции и поддержание в условиях *in vitro* селекционно-ценных генотипов сахарной свеклы.

Для инициации стерильной культуры *in vitro* в качестве эксплантов использовали изолированные апикальные меристемы, полученные от семенных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). Апикальные меристемы отличаются высокой генетической стабильностью и минимальной степенью соматической изменчивости, что критически важно для сохранения исходного генотипа при культивировании в условиях культуры тканей.

Для введения эксплантов в стерильную культуру *in vitro* использовали различные дезинфицирующие вещества (гипохлорит натрия, ТориОкси, Телесфор, Анолит) различной концентрации и времени экспозиции. Использование растворов ТориОкси и Анолит демонстрировало достаточно высокий стерилизующий эффект (79–94 %). Обработка данными веществами не оказывала отрицательного воздействия на экспланты и стимулировала формирование придаточных побегов с последующим ростом и развитием растений. Это указывает на потенциал данных соединений как биостимуляторов в биотехнологиях по созданию генетических коллекций и размножения растений.

Для оздоровления и элиминации эндогенной бактериальной инфекции на этапе введения меристем

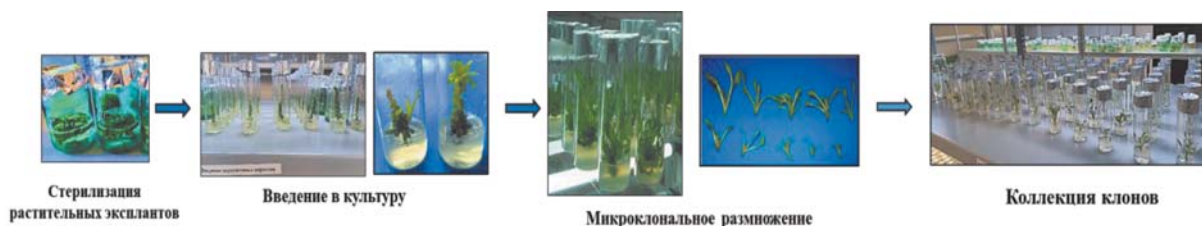


Рисунок 2. Этапы пополнения и поддержания генетической коллекции сахарной свеклы *in vitro*

в культуру *in vitro* в состав питательной среды были включены антибактериальные препараты (цефотаксим, рифампицин, цефтриаксон, азитромицин).

Применение цефотаксима в концентрации 300–500 мг/л способствовало достижению 100 % развития нормально развивающихся эксплантов (5 баллов по 5-балльной шкале), обеспечивая долю неинфицированных эксплантов 93 %. Формирование боковых побегов отмечено у более чем 98 % растений. Меристемные клоны характеризовались интенсивной окраской листьев, хорошо развитой точкой роста и выраженной кустистостью. Использование данного препарата позволило элиминировать эндогенную бактериальную инфекцию и повысить эффективность микроклонального размножения, стимулируя пролиферацию побегов *in vitro*.

Для поддержания генетической коллекции сахарной свеклы *in vitro* применялась методика последовательного культивирования на ростовой и безгормональной питательных средах. Ростковая среда, обогащенная фитогормонами (6-бензиламинопуридин, кинетин, гиббереллин в концентрации 0,2 мг/л в соотношении 1:1:1), стимулирует клеточное деление и пролиферацию. Однако пролонгированное культивирование связано с риском генетической дестабилизации. Периодические пересадки на безгормональную среду инициируют фазу дифференциации и стабилизации, минимизируя вероятность мутаций (рис. 2).

**Выводы.** Таким образом, предложенный подход позволяет сформировать коллекцию микроклонов (*Beta vulgaris* L.) *in vitro*, что решает фундаментальную задачу сохранения генофонда перекрестноопыляющихся культур, предоставляя селекционерам выравненный, здоровый и генетически идентичный материал. Это ускоряет создание новых отечественных гибридов сахарной свеклы, способствуя обеспечению продовольственной безопасности и технологическому развитию агропромышленного комплекса России.

#### Список использованной литературы

1. Молканова, О.И. Применение биотехнологических методов для сохранения генофонда редких видов растений / О.И. Молканова, Ю.Н. Горбунов, И.В. Ирина // Ботанический журнал. - 2020. - Т. 105. - № 6. - С. 610-619.
2. Самарская, В.О. Аспекты клонального микроразмножения и сохранения растений *in vitro* / В.О. Самарская, Е.В. Малаева, М.В. Постнова // Природные системы и ресурсы. - 2019. - Т. 9. - № 3. - С. 13-22.
3. Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019–2027 годы. Постановление Правительства РФ от 22.04.2019 № 479 (с изм. от 28.08.2021).
4. Хлесткина, Е.К. Генетические ресурсы России: от коллекций к биоресурсным центрам / Е.К. Хлесткина // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. - 2022. - Т. 183. - № 1. - С. 9–30.

5. Монахос, Г.Ф. Сохранение генетических ресурсов растений *in vitro* / Г.Ф. Монахос, Ф.Р. Джалилова // Известия ТСХА. - 2018. - № 5. - С. 34–41.

6. Знаменская, В.В. Микроклонирование *in vitro* как метод поддержания и размножения линий сахарной свеклы / В.В. Знаменская // Энциклопедия рода Beta: Биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск. - 2010. - С. 420-437.

7. Каракотов, С.Д. Современные аспекты селекции гибридов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) / С.Д. Каракотов, И.В. Апасов, А.А. Налбандян, Е.Н. Васильченко, Т.П. Федулова // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2021. - № 25(4). - С. 394-400.

#### Biotechnological approaches to the creation and maintenance of an *in vitro* genetic collection of *Beta vulgaris* L.

Vasilchenko E.N.

**Summary.** The modern biotechnological methods aimed at the creation and *in vitro* maintenance of a genetic collection of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) under slow growth conditions are considered. Maintenance is carried out by alternating hormonal and hormone-free nutrient media, which ensures the preservation of genetic stability during regular subculturing. A comprehensive two-stage approach to the creation of the collection is proposed. At the first stage, the selection and evaluation of donor plants (MS forms, O-types, OP) is carried out using cytological studies, flow cytometry, and molecular genetic RFLP analysis. At the second stage, explant sterilization, sanitation (pathogen elimination), and maintenance of the collection under slow growth conditions are performed using alternating nutrient media to ensure genetic stability.

**Keywords:** sugar beet, *in vitro* genetic collection, microclonal propagation, flow cytometry, RFLP analysis, CMS, genome stability.

#### ИНФОРМАЦИЯ

##### Россия обеспечила себя сахаром

В России в 2025 году произведено более 6,3 млн т сахара, что полностью покрывает внутренние потребности и обеспечивает стабильную ситуацию на рынке, сообщает Минсельхоз. Уровень самообеспечения составил 104,9 % при пороговом значении Доктрины продовольственной безопасности 90 %.

Сбор сахарной свеклы в 2025 году достиг 48,9 млн т, что на 8,5 % больше, чем в 2024 году. Средняя урожайность выросла на 5,7 % и составила 41,41 т/га.

Кроме того, переработка сырья продолжается и после завершения основной кампании: на 4 сахарных заводах в Белгородской, Тамбовской, Липецкой и Пензенской областях продолжается производство сахара из мелассы и накопленного свекловичного сиропа.

Sugar.ru