

ВЛИЯНИЕ ГЕЛЕОБРАЗОВАТЕЛЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ЭМБРИО- И КАЛЛУСОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ СЕМЯЗАЧАТКОВ СВЕКЛЫ СТОЛОВОЙ (*BETA VULGARIS* L.)

Т.Р. ГРИГОЛАВА, А.В. ВИШНЯКОВА, О.Н. ЗУБКО,
С.Ф. МОНАХОС, С.Г. МОНАХОС

(Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева)

Гиногенез является основным способом производства гаплоидных эмбриоидов, который лежит в основе технологии создания удвоенных гаплоидов растений вида *Beta vulgaris* L., в том числе свеклы столовой. Существенное влияние на эмбрио- и каллусогенез в культуре изолированных семязачатков и конечный выход растений-регенерантов оказывает состав питательных сред. В ранних работах исследователями изучено влияние регуляторов роста, органических компонентов, консистенции питательных сред и пр. В современных протоколах культуры изолированных семязачатков свеклы сахарной в качестве гелеобразователей питательной среды используют агарозу, агар, фитагель. При этом нет исследований об эффективности применения различных гелеобразователей в сопоставлении друг с другом. При культивировании изолированных семязачатков столовой свеклы для гелирования питательной среды использовали только агар. В то же время гелеобразователи и их концентрация определяют мобилизацию веществ питательных сред, оказывают различные эффекты на экспланты, их витрификацию и качество регенерантов. Подбор оптимального гелеобразователя питательной среды для культивируемых изолированных семязачатков свеклы может повысить выход эмбриодов, каллуса и растений-регенерантов и является актуальным для исследования.

Изучено влияние гелеобразующих агентов: агара, агаргеля, фитагеля и агарозы – в составе питательной среды на эмбрио- и каллусогенез в культуре изолированных семязачатков свеклы столовой (*Beta vulgaris* L.). Изолированные семязачатки культивировали на питательной среде MS с добавлением 200 мг/л БАП, 500 мг/л ИУК, 60 г/л сахарозы и следующими вариантами гелеобразователей: агар – 7,5 г/л; агароза – 6 г/л; агаргель – 4 г/л; фитагель – 2 г/л. Повторность представлена чашкой Петри с 20 семязачатками, эксперимент заложен минимум в 22-кратной повторности.

При изучении влияния гелеобразователей питательных сред на формирование эмбриоидов и каллуса в культуре изолированных семязачатков на средах, содержащих фитагель и агарозу, наблюдали более высокий выход эмбриоидов и каллуса, в то время как на средах с содержанием агара и агаргеля семязачатки формировали каллус и эмбриоиды с меньшей частотой, причем агар оказывает более негативное влияние, чем агаргель.

Ключевые слова: *Beta vulgaris*, *in vitro*, свекла столовая, культура семязачатков, гиногенез, эмбриогенез, каллусогенез, удвоенные гаплоиды, агар, агаргель, фитагель, агароза.

Введение

Наиболее распространенной гиногенной технологией создания удвоенных гаплоидов растений рода *Beta* является *in vitro*-технология культивирования изолированных семязачатков [1–12]. Это достаточно простая в исполнении, но трудоемкая технология, требующая кропотливой ручной изоляции каждого семязачатка с использованием бинокулярной лупы или стереомикроскопа. Более того, данная технология не исключает соматический эмбриогенез и образование клонов растения-донора

из клеток, окружающих зародышевый мешок, что требует последующей дифференциации гомо- и гетерозигот с отбором первых среди растений-регенерантов. Гиногенная технология обеспечивает относительно низкую частоту регенерации (1,7–10,5%) [13] и характеризуется высокой генотипспецифичностью [14]. Это обуславливает необходимость оптимизации технологии на этапе индукции эмбриогенеза путем подбора оптимального соотношения регуляторов роста и других компонентов питательной среды, на этапах стимулирования образования проростков из эмбриоидов и каллуса и полиплоидизации – удвоения числа хромосом гаплоидных растений.

Способность гаметофита переключаться на спорофитный путь развития детерминируется на генетическом уровне, но реализуется в зависимости от физиологических условий и индуцирующих факторов, что непосредственно сказывается на выходе регенерантов столовой свеклы [6]. Вероятность получения гаплоидов у различных генотипов свеклы сахарной *Beta vulgaris* неодинакова [13]. Кроме того, крайне важны экзогенные факторы, оказывающие влияние на регенерационную способность гаплоидных клеток культивируемых семязачатков: состав питательных сред, холодовая предобработка бутонов, температура и условия культивирования изолированных семязачатков [2, 5, 7].

Наиболее существенное влияние на развитие эксплантов оказывает гормональный состав питательных сред [4, 7, 15]. Также на эмбриогенез и регенерацию может оказывать влияние тип углеводов в составе питательных сред, гелеобразователи, различные органические добавки [12].

Как правило, в культуре изолированных семязачатков свеклы столовой и сахарной применяют среды солидифицированные с применением агара [1–3, 5–9, 16]. Встречаются единичные исследования, где применялась получаемая из агара агароза [9]. Wremeth и Levall в протоколе гиногенеза сахарной свеклы рекомендуют использовать агарозу для гелирования эмбриоиндукционных сред и агар для гелирования побего- и корнеиндукционных питательных сред [9]. В недавних исследованиях, направленных на совершенствование технологии получения удвоенных гаплоидов свеклы сахарной, появились данные об использовании фитагеля для гелирования питательных сред [11, 12]. Указывают, что фитагель и агаргель снижают витрификацию по сравнению с классическими агаром и агарозой, а также мобилизуют питательные вещества из питательной среды, что положительно сказывается на формировании регенерантов [17]. Кроме того, фитагель имеет более низкую стоимость из-за экономичного расхода (2–3 г/л).

Исследователи используют различные гелеобразователи, исходя из собственных соображений и возможностей лаборатории. При этом сравнительный анализ выхода эмбриоидов и каллуса, а также растений-регенерантов при культивировании семязачатков на питательной среде с разными гелеобразователями не проводился. Более того, на свекле столовой не использовали никаких гелеобразователей, кроме агара.

Цель исследований: изучить влияние типа гелеобразователя на частоту формирования эмбриоидов и каллуса и дальнейшую регенерацию растений при культивировании изолированных семязачатков свеклы столовой (*Beta vulgaris* L.).

Материал и методы исследований

Растения-доноры и условия выращивания. Для изоляции семязачатков использовали растения свеклы столовой (*Beta vulgaris* L.), представленные генотипом Red Claude × Двусемянная2 из коллекции ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева».

Донорные растения выращивали в условиях защищенного грунта. Посев проводили семенами в открытый грунт в начале мая по двустрочной схеме 50 + 20 × 5. Перед посевом вносили удобрение азофоска (NPK 15:15:15). Уборку корнеплодов и закладку

их на хранения осуществляли в октябре. В ноябре корнеплоды пересаживали в горшки объемом 10 л, в которых корнеплоды проходили яровизацию в обогреваемой теплице при +10–12°C днем и +5–6°C ночью. Далее температуру воздуха повышали до 15–20°C, чем стимулировали активный рост и цветение. Во время цветения растения не подкармливали удобрениями и не производили обработку от болезней и вредителей.

Изоляция и культивирование семязачатков. Для получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных семязачатков использовали модифицированную методику гиногенеза столовой свеклы в условиях *in vitro* по Baranski [6]. Поверхностную стерилизацию соцветий проводили в два этапа: помещали соцветия в раствор 70%-ного этилового спирта на 30 с, затем – в 3%-ный раствор гипохлорита натрия с добавлением 2–3 капель tween-20 на 10 мин. После стерилизации соцветия троекратно промывали в стерильной дистиллированной воде в течение 1, 5 и 10 мин в условиях ламинарного бокса.

Для введения в культуру *in vitro* использовали нераскрывшиеся бутоны из срединной части соцветий 1-го и 2-го порядков. Предварительно соцветия выдерживали в течение 2 сут. при температуре +4°C. Семязачатки извлекали из бутонов при помощи препаровальных игл и помещали на питательную среду MS с добавлением 200 мг/л БАП, 500 мг/л ИУК, 60 г/л сахарозы и различными гелеобразователями в пластиковые чашки Петри диаметром 9 см по 20 шт/чашку Петри, после чего культивировали в термостате Binder в полной темноте при температуре 32±0,1°C до появления эмбриоидов или каллуса.

Оценку числа сформировавшихся эмбриоидов и каллуса проводили с 14 по 70 дни культивирования в термостате, после чего эмбриоиды и каллус пересаживали на свежую питательную среду того же состава и культивировали в климатической камере при 24±1°C и фотопериоде 16 ч – день, 8 ч – ночь. Развивающиеся регенеранты один раз в 3–4 недели переносили на свежую питательную среду того же состава.

Изучение влияния гелеобразователей питательных сред. Для изучения влияния гелеобразующих агентов питательной среды на эмбрио-, каллусогенез и формирование растений-регенерантов использовали следующие типы и концентрации гелеобразователей: агар – 7,5 г/л (Sigma); агароза – 6 г/л (AppliChem); агаргель – 4 г/л (Sigma); фитагель – 2 г/л (Sigma). Концентрация гелеобразователя была выбрана таким образом, чтобы обеспечить среднюю плотность геля. Контрольным вариантом в эксперименте было культивирование изолированных семязачатков на питательной среде MS с добавлением 60 г/л сахарозы, 200 мг/л БАП, 500 мг/л ИУК и 7,5 г/л агара. Культивирование эксплантов, эмбриоидов, каллуса и проростков растений-регенерантов проводили на питательной среде с одним гелеобразующим агентом.

Статистическая обработка. Статистическую обработку экспериментальных данных, а именно оценку существенности различий вариантов опыта, проводили с использованием t-теста Стьюдента. Эксперименты были заложены минимум в 22-кратной повторности, каждая из которых представлена чашкой Петри с 20 изолированными семязачатками. Существенность различий между вариантами опыта определяли с использованием уровня значимости $P \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Влияние гелеобразователей на выход эмбриоидов и каллуса в культуре изолированных семязачатков. Семязачатки свеклы столовой генотипа Red Claude × Двусемянная2 помещали на питательную среду MS (Murashige and Skoog) с добавлением 200 мг/л БАП, 500 мг/л ИУК, 60 г/л сахарозы и 4 вариантами гелеобразователей: 7,5 г/л – агар (Sigma); 6 г/л – агароза (AppliChem); 4 г/л – агаргель (Sigma); 2 г/л – фитагель (Sigma). Проводился учет числа развивающихся эмбриоидов или каллуса семязачатков (табл. 1).

**Влияние типа гелеобразователя в составе питательных сред
на развитие эмбрионов и каллуса**

Гелеобразователь	Число изолированных семязачатков, шт.	Доля морфогенных семязачатков, %	Число морфогенных семязачатков		Среднее число морфогенных семязачатков, шт. на чашку Петри	Количество растений-регенерантов, полученных из морфогенных семязачатков, %
			Эмбриониды, шт.	Каллус, шт.		
Агар, 7,5 г/л	620	0,8	2	3	0,16±0,13 а	20
Агароза, 6 г/л	660	1,51	1	9	0,3±0,2 ab	10
Агаргель, 4 г/л	440	0,91	4	0	0,18±0,2 а	75
Фитагель, 2 г/л	440	2,5	7	4	0,5±0,28 b	9

Примечание. Варианты, отмеченные различающимися буквами а, b, имеют существенную разницу на уровне значимости $P \leq 0,05$.

На питательной среде, содержащей 2 г/л фитагеля, наблюдали наибольшее число морфогенных семязачатков (0,5 шт/чашку Петри), достоверно отличающееся от других вариантов питательных сред: с агаром – 0,16 шт/чашку Петри; с агарозой – 0,3 шт/чашку Петри; с агаргелем – 0,18 шт/чашку Петри на уровне значимости 0,05. Существенных различий между остальными вариантами не наблюдали.

Тип гелеобразователя влиял на число образующихся эмбрионидов (рис. 1) и каллуса (рис. 2). Использование фитагеля и агаргеля приводило к формированию большего числа эмбрионидов: всего 7 шт. на среде с фитагелем и 4 шт. на агаргеле (табл. 1), – чем каллуса (4 шт. на среде с фитагелем).

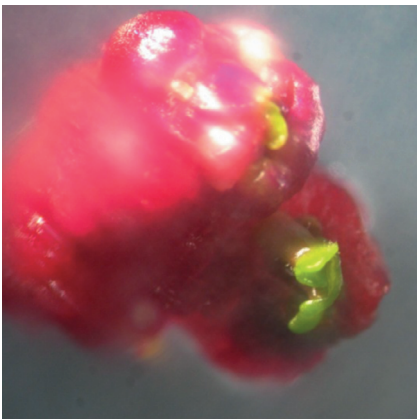


Рис. 1. Формирование эмбриоида путем прямой регенерации на питательной среде, гелированной фитагелем



Рис. 2. Формирование побегов из каллуса на питательной среде, гелированной агарозой

На питательных средах с добавлением агара и агарозы преобладало каллусообразование (3 шт. на среде с агаром и 9 шт. на среде с агарозой), эмбрионидов сформировалось 2 шт. на среде с агаром и 1 шт. на среде с агарозой.

Максимальное количество растений-регенерантов из морфогенных семязачатков (75%) было получено на питательной среде с агаргелем (табл. 1), на средах с агаром – 20%, с агарозой – 10% и с фитагелем – 9% (рис. 3, 4). Прослеживается зависимость между количеством сформировавшихся эмбриоидов на различных питательных средах и количеством полученных регенерантов. На агаргеле, где были получены только эмбриоиды, сформировалось наибольшее количество растений-регенерантов, на остальных средах, несмотря на большое количество развивающихся семязачатков в эмбриоиды и каллус, были получены единичные растения-регенеранты.



Рис. 3. Растение, полученное из изолированного семязачатка на питательной среде, гелированной агарозой



Рис. 4. Растение, полученное из изолированного семязачатка на питательной среде, гелированной агаргелем

Работы по получению эмбриоидов и регенерантов свеклы столовой проводил Baranski, который использовал в качестве гелеобразователя агар [6]. Нами изучена возможность использования в качестве гелеобразователей эмбриоиндукционных и ростовых питательных сред агар в концентрации 7,5 г/л, агарозу в концентрации 6 г/л, агаргель – 4 г/л, а также фитагель в концентрации 2 г/л на генотипе свеклы столовой Red Claude × Двусемянная2. В качестве контрольного варианта использовали питательную среду, гелированную агаром. Использование фитагеля оказало наибольшее влияние на повышение эмбриогенеза и каллусогенеза при культивировании изолированных семязачатков, частота морфогенеза составила 2,5%. При этом на среде с агаром наблюдался наименьший выход эмбриоидов и каллуса (0,8%). Однако оценивая количество регенерировавших растений из морфогенных семязачатков, выяснили, что наиболее эффективным гелеобразователем оказался агаргель с выходом растений 75%, худшим оказался фитагель с выходом растений 9%.

Целесообразность использования в среде для культивирования семязачатков фитагеля в качестве гелеобразователя подтверждается данными, полученными исследователями на свекле сахарной. Васильченко с соавт. показали, что после культивирования изолированных семязачатков свеклы сахарной на жидких средах с дальнейшим культивированием полученных эмбриоидов и каллуса на твердых средах, гелированных агаром или фитагелем, наибольшее количество регенерантов наблюдали на средах, гелированных фитагелем (2,5–6,7%). На агаризованных средах этот показатель несколько снижался и составлял 1,2–4,8% [11]. Pazuki et al. повышали

концентрацию фитагеля по мере развития регенерантов: для индукции эмбриогенеза изолированных семязачатков сахарной свеклы использовали среды, гелированные фитагелем в концентрации 2,8 г/л, полученные гаплоидные растения переводили на среду для удвоения хромосом с 3 г/л фитагеля, а после удвоения хромосомного набора культивировали на средах, гелированных 6,5 г/л фитагеля для снижения витрификации [12].

Агарозу в эмбриоиндукционной среде в протоколе производства удвоенных гаплоидов сахарной свеклы рекомендуют использовать Wremerth, Levall [9]. В наших исследованиях частота морфогенеза в культуре изолированных семязачатков столовой свеклы составила 1,5%. При этом из семязачатков развивался преимущественно каллус, который впоследствии плохо регенерировал в растения.

Использование питательных сред, гелированных агаргелем, не изучалось другими авторами. В наших исследованиях на средах с этим гелеобразователем формировались только эмбриониды с частотой 0,9%. Впоследствии практически из всех эмбрионидов были получены растения.

Выводы

Проанализировано влияние различных гелеобразователей: агара, агарозы, агаргеля и фитагеля – в составе питательных сред на эмбриогенез и каллусогенез в культуре изолированных семязачатков свеклы столовой. Использование различных типов гелеобразователей показало, что все типы гелеобразователей поддерживают каллусо- и эмбриогенез в культуре изолированных семязачатков. Однако следует отметить, что культивирование на питательной среде, гелированной фитагелем, лучше сказывалось на формировании эмбрионидов и каллуса, чем культивирование на других средах. Культивирование семязачатков на питательной среде, гелированных агарозой, обеспечило более низкий уровень эмбрио- и каллусогенеза с преимущественным развитием каллуса из изолированных семязачатков. На средах с агаром и агаргелем наблюдали примерно одинаковое количество развивающихся семязачатков (0,8% и 0,9% соответственно). При этом на среде с агаргелем частота формирования эмбрионидов из семязачатков составила 100%, а на среде с агаром – только 40%.

Дальнейший морфогенез также связан с типом используемого гелеобразователя. Несмотря на высокий выход эмбрионидов на питательной среде с фитагелем, в дальнейшем было получено только одно растение (9% от числа морфогенных семязачатков), в то время как на среде с агаргелем при сравнительно низком выходе эмбрионидов было получено три растения (75% от числа морфогенных семязачатков). На питательных средах с агаром и агарозой получено по одному растению (20 и 10% от числа морфогенных семязачатков соответственно).

Рекомендуется для индукции эмбрио- и каллусогенеза изолированных семязачатков свеклы столовой в культуре *in vitro* использовать питательные среды, гелированные фитагелем, а дальнейшую регенерацию растений из эмбрионидов и каллуса проводить на средах, гелированных агаргелем.

Библиографический список

1. D'Halluin K. Production of haploid sugar beets (*Beta vulgaris* L.) by ovule culture / K. D'Halluin B. Keimer, W. Horn, C.J. Jensen, W. Odenbach and O. Schieder (Eds.) // Genetic Manipulation in Plant Breeding. – De Gruyter, Berlin, 1986. – Pp. 307–309.

2. Van Geyt J. *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). / J. Van Geyt G.J. Speckmann K. D'Halluin et al. // Theoret. Appl. Genetics. – 1987. – 73:920–925.
3. Doctrinal M. *In vitro* gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: Effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season / M. Doctrinal, R.S. Sangwan, B.S. Sangwan-Norreel // Plant Cell Tiss Org. – 1989. – 17:1–12.
4. Seman I. *In vitro* cultivation of unfertilized ovules of sugar beet. Embryology and seed reproduction: XI Int. symp. / I. Seman, J. Farago (Leningrad, USSR, July 3–4, 1990). – Leningrad, 1990. – 146.
5. Lux H. Production on haploid sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) by culturing unpollinated ovules / H. Lux L., Herrmann C. Wetzel // Plant Breed. – 1990. – 104:177–183.
6. Baranski R. *In vitro* gynogenesis in red beet (*Beta vulgaris* L): effects of ovule culture conditions. Acta Societatis Botanicorum Poloniae. – 1996. – Vol. 65, № 1–2. – Pp. 57–60.
7. Gurel S. Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) / S. Gurel, E. Gurel, Z. Kaya. Plant Cell Rep. – 2000. – 19: 1155–1159.
8. Подвигина О.А. Теоретическое обоснование и приемы использования методов биотехнологии в селекции сахарной свеклы: Автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. – Воронеж, 2003.
9. Wremmerth Weich E. Doubled haploid production of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): Published protocols for other crop plant species / E. Wremmerth Weich M.W. Levall // In Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. – Kluwer Academic Publishers, 2003.
10. Tomaszewska-Sowa M. Cytometric analyses of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants regenerated from unfertilized ovules cultured in-vitro. – Plant Breed. – 2010. – 2:231–235.
11. Васильченко Е.Н. Особенности формирования гаплоидных регенерантов сахарной свеклы в культуре *in vitro* / Е.Н. Васильченко, Т.П. Жужжалова, Т.Г. Ващенко, О.А. Землянухина, Н.А. Карпеченко, О.А. Подвигина // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2017. – № 3 (54). – С. 57–66.
12. Pazuki A. Gynogenesis Induction in Sugar Beet (*Beta vulgaris*) Improved by 6-Benzylaminopurine (BAP) and Synergized with Cold Pretreatment / A. Pazuki, F. Aflaki, E. Gürel et al. // Sugar Tech. – 2018. – № 20. – С. 69–77.
13. Жужжалова Т.П. Гаплоидный партеногенез *in vitro* у сахарной свеклы (*Beta vulgaris*): факторы и диагностические признаки / Т.П. Жужжалова, О.А. Подвигина, В.В. Знаменская, Е.Н. Васильченко, Н.А. Карпеченко, О.А. Землянухина // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51, № 5. – С. 636–644.
14. Klimek-Chodacka M. Comparison of haploid and doubled haploid sugar beet clones in their ability to micropropagate and regenerate. Electron / M. Klimek-Chodacka R. Baranski // J. Biotechnol. – 2013. – № 16 (2). – Pp. 1–1.
15. Ferrant V. Origin of gynogenetic embryos of *Beta vulgaris* L. / V. Ferrant, J. Bouharmont. Sex. Plant Reprod. – 1994. – № 7. – Pp. 2–16.
16. Śliwińska E. Polysomaty in growing *in vitro* sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) seedlings of different ploidy level / E. Śliwińska, E. Łukaszewska. Plant Science. – 2005. – № 168. – Pp. 1067–1074.
17. John Nelson Buah, Yoshinobu Kawamitsu, Shigetoshi Sato & Seichi Murayama. Effects of Different Types and Concentrations of Gelling Agents on the Physical and Chemical Properties of Media and the Growth of Banana (*Musa* spp.) in Vitro, Plant Production Science, 1999. – 2:2. – Pp. 138–145.

NUTRIENT MEDIUM GELLING AGENT EFFECT ON EMBRYO- AND CALLUSOGENESIS IN ISOLATED OVULES OF RED BEET (*BETA VULGARIS* L.)

T.R. GRIGOLAVA, A.V. VISHNYAKOVA, O.N. ZUBKO,
G.F. MONAKHOS, S.G. MONAKHOS

(Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy)

Gynogenesis is the only way to form haploid embryoids, which underlies the technology of creating doubled haploids of Beta vulgaris L. plants of the species, including red beet. The composition of nutrient media has a significant influence on embryo- and callusogenesis in the culture of isolated ovules and the final yield of regenerated plants. In early works, researchers studied the effect of growth regulators, organic components, the consistency of nutrient media. In standard protocols for the culture of sugar beet isolated ovules, agarose, agar, and phytigel are gelling agents for the nutrient medium. At the same time, there are no studies of the use of various gelling agents' effectiveness compared to each other. During the cultivation of isolated red beet ovules, only agar was used to gelate the nutrient medium. At the same time, gelling agents and their concentration determine the mobilization of nutrient media; have various effects on explants, their vitrification, and the quality of regenerants. The selection of optimal gelling agent of the nutrient medium for cultivating isolated beet ovules can increase the yield of embryoids, callus, and regenerant plants and is relevant for research.

In this work, we have studied the effect of gelling agents (agar, agargel, phytigel, and agarose) in the nutrient medium composition on embryo- and callusogenesis in the culture of isolated ovules of red beet (Beta vulgaris L.). Isolated ovules were cultured on MS nutrient medium supplemented with 200 mg/l BAP, 500 mg/l IAA, 60 g/l sucrose, and the following gelling agents: agar – 7.5 g/l; agarose – 6 g/l; agargel – 4 g/l; phytigel – 2 g/l. A Petri dish with 20 ovules represents repetition; the researchers experimented with 22 replicates.

The researchers observed a higher yield of embryoids and callus when studying the effect of nutrient media gelling agents on the formation of embryoids and callus in the culture of isolated ovules in media containing phytigel and agarose. In contrast, in media containing agar and agargel, ovules formed callus and embryoids with a lower frequency, while agar has a more negative effect than agargel.

Key words: *Beta vulgaris*, in vitro, red beet, the culture of ovules, gynogenesis, embryogenesis, callusogenesis, doubled haploids, agar, agargel, phytigel, agarose

References

1. D'Halluin K., Keimer B. Production of haploid sugar beets (*Beta vulgaris* L.) by ovule culture. Genetic Manipulation in Plant Breeding. Berlin: De Gruyter. 1986: 307–309.
2. Van Geyt J., Speckmann G.J., D'Halluin K. et al. In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). Theoret. Appl. Genetics. 1987; 73: 920–925.
3. Doctrinal M., Sangwan R.S., Sangwan-Norreel B.S. In vitro gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: Effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. Plant Cell Tiss Org. 1989; 17: 1–12.
4. Seman I., Farago J. In vitro cultivation of unfertilized ovules of sugar beet. Embryology and seed reproduction: XI Int. symp., Leningrad, USSR, July 3–4, 1990. Leningrad. 1990: 146.

5. Lux H., Herrmann L., Wetzel C. Production on haploid sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) by culturing unpollinated ovules. Plant Breed. 1990; 104: 177–183.
6. Baranski R. In vitro gynogenesis in red beet (*Beta vulgaris* L.): effects of ovule culture conditions. Acta Societatis Botanicorum Poloniae. 1996; 65 (1–2): 57–60.
7. Gurel S., Gurel E., Kaya Z. Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Plant Cell Rep. 2000; 19: 1155–1159.
8. Podvigina O.A. Teoreticheskoe obosnovanie i priemy ispolzovaniya metodov biotekhnologii v selektsii sakharnoy svekly [Theoretical substantiation and biotechnology methods in sugar beet breeding]. Self-review of DSc (Ag) thesis. Voronezh. 2003. (In Rus.)
9. Wremmerth Weich E., Levall M.W. Doubled haploid production of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): Published protocols for other crop plant species. In Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. Kluwer Academic Publishers. 2003.
10. Tomaszewska-Sowa M. Cytometric analyses of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants regenerated from unfertilized ovules cultured in vitro. Plant Breed. 2010; 2: 231–235.
11. Vasilchenko E.N., Zhuzhzhhalova T.P., Vashchenko T.G., Zemlyanukhina O.A., Karpechenko N.A., Podvigina O.A. Osobennosti formirovaniya gaploidnykh regenerantov sakharnoy svekly v culture *in vitro*. [Peculiarities of *in vitro* reproduction of sugar beet haploid regenerants]. Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2017; 3 (54): 57–66. (In Rus.)
12. Pazuki A., Aflaki F., Gürel E. et al. Gynogenesis Induction in Sugar Beet (*Beta vulgaris*) Improved by 6-Benzylaminopurine (BAP) and Synergized with Cold Pretreatment. Sugar Tech. 2018. 20: 69–77.
13. Zhuzhzhhalova T.P., Podvigina O.A., Znamenskaya V.V., Vasilchenko E.N., Karpechenko N.A., Zemlyanukhina O.A. Gaploidniy partenogenez *in vitro* u sakharnoy svekly (*Beta vulgaris*): factory i diagnosticheskie priznaki [Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) haploid parthenogenesis *in vitro*: factors and diagnostic characters]. Sel'skokhozyaystvennaya biologiya. 2016; 51 (5): 636–644. (In Rus.)
14. Klimek-Chodacka M., Baranski R. Comparison of haploid and doubled haploid sugar beet clones in their ability to micropropagate and regenerate. Electron. J. Biotechnol. 2013; 16 (2): 1–1.
15. Ferrant V., Bouharmont J. Origin of gynogenetic embryos of *Beta vulgaris* L. Sex. Plant Reprod. 1994; 7: 12–16.
16. Śliwińska E., Łukaszewska E. Polysomaty in growing *in vitro* sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) seedlings of different ploidy level. Plant Science. 2005; 168: 1067–1074.
17. John Nelson Buah, Yoshinobu Kawamitsu, Shigetoshi Sato, Seiichi Murayama. Effects of Different Types and Concentrations of Gelling Agents on the Physical and Chemical Properties of Media and the Growth of Banana (*Musa* spp.) in Vitro, Plant Production Science. 1999; 2: 2, 138–145.

Григолава Тамара Руслановна, аспирант кафедры ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (909) 661–05–93; e-mail: grigolaval@gmail.com).

Вишнякова Анастасия Васильевна, канд. с.-х. наук, доцент, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» (127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (926) 100–74–31; e-mail: a.vishnyakova@rgau-msha.ru).

Зубко Ольга Николаевна, канд. с.-х. наук, ассистент, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (127550,

Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (968) 354–33–58; e-mail: o.zubko@rgau-msha.ru).

Монахос Сократ Григорьевич, заведующий кафедрой ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, д-р с.-х. наук, доцент, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (926) 562–32–32; e-mail: s.monakhos@rgau-msha.ru).

Монахос Григорий Фёдорович, генеральный директор ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева», канд. с.-х. наук, старший научный сотрудник (127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Пасечная, д. 5; тел.: (499) 977–11–74; e-mail: breedst@mail.ru).

Tamara R. Grigolava, postgraduate student, the Department of Botany, Plant Breeding and Seed Technology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow (127550, Russian Federation; phone: (909) 661–05–93; E-mail: grigolava1@gmail.com).

Anastasiya V. Vishnyakova, PhD (Ag), Associate Professor, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow (127550, Russian Federation; phone: (926) 100–74–31; E-mail: a.vishnyakova@rgau-msha.ru).

Olga N. Zubko, PhD, Assistant, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow (127550, Russian Federation; phone: (968) 354–33–58; E-mail: o.zubko@rgau-msha.ru).

Sokrat G. Monakhos, DSc (Ag), Associate Professor, Head of the Department of Botany, Plant Breeding and Seed Technology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow (127550, Russian Federation; phone: (926) 562–32–32; E-mail: s.monakhos@rgau-msha.ru).

Grigory F. Monakhos, PhD (Ag), Senior Research Associate, Chief Executive Officer of LLC “Breeding Station named after N.N. Timofeev” (5 Pasechnaya Str., Moscow (127550, Russia; phone: (499) 977–11–74; E-mail: breedst@mail.ru).