

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ: ЭВОЛЮЦИЯ ВЗГЛЯДОВ И МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ



*Литературный обзор посвящен биотехнологии сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) в культуре *in vitro*: индукции каллусогенеза, регенерации и генетической трансформации. Обращено внимание на компонентный состав питательных сред, методы регенерации из каллуса путем соматического эмбриогенеза, включая культуру протопластов. При этом в основе современных методов генетической трансформации заложено использование *Agrobacterium tumefaciens* и бомбардирование микроплатинами золота.*

© А.Э. ГОЛОВКО, А.А. ДОВЖЕНКО, Ю.Ю. ГЛЕБА, 2005

Введение

Сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.), принадлежащая семейству *Chenopodiaceae*, является одной из наиболее важных пахотных культур. Сахарная свекла — двулетнее растение. Около 35—40 % всемирного сахарного производства происходит из сахарной свеклы [1]. Площадь посевов сахарной свеклы в Украине (2003 г.) составила 1 млн гектаров со средней урожайностью корнеплодов 3 т/га. *In vitro* и культура протопластов сахарной свеклы изучались на протяжении приблизительно 30 лет. Несмотря на большую промышленную стоимость культуры, особенно в северном полушарии, и довольно длительный период исследований, все еще очень трудно создавать растения сахарной свеклы, содержащие новые, сельскохозяйственно важные свойства, такие как устойчивость к гербицидам, пестицидам и болезням, увеличенное содержание сахара в корнях, включая цитоплазматическую мужскую стерильность [2]. Создание измененной сахарной свеклы с выгодными свойствами является утомительным и отнимающим много времени процессом, осуществляемым методами традиционной селекции и классической генетики. Поскольку сахарная свекла — перекрестноопыляющееся, гетерозиготное и двулетнее растение, необходимо осуществить до восьми обратных скрещиваний (*backcrosses*), чтобы с использованием классической генетики получить растение с улучшенными свойствами. Генетическая инженерия предоставляет принципиально новые возможности для улучшения культурных растений, в том числе и сахарной свеклы. Таким образом, разработка действенных схем для микроклонирования растений в культуре тканей или регенерации из протопластов совместно с эффективными методами трансформации могли бы создать более эффективную систему.

Культура тканей

Первые эксперименты по культуре тканей сахарной свеклы были выполнены приблизительно 30 лет назад [3]. Вначале культуру тканей свеклы применяли для двух целей: вегетативное размножение [4] и скрининг соматональных вариантов или мутантов с полезными свойствами [5, 6]. Как упоминалось, сахарная свекла — перекрестноопыляющееся и гетерозиготное растение, поэтому микрораспространение

позволяет поддерживать интересные генотипы. Прямое образование побегов из различных тканей растений и/или органов широко используется для достижения этой цели, в то время как методы не прямой регенерации требуют разработки, чтобы получить агрономически ценные варианты/мутанты. Непрямая регенерация включает дополнительный шаг индукции, образования побегов и/или эмбрионов. В начале 70-х годов прошлого столетия впервые было описано образование корней из каллуса, но регенерация целых растений была ограниченным, нечастым и весьма низкоэффективным процессом [3, 5, 7]. Попытки регенерировать целые растения из каллуса сахарной свеклы могут быть классифицированы следующим образом: нечастая или невозпроизводимая регенерация от спонтанно формирующегося рыхлого каллуса из культуры побегов *in vitro*, отмечались короткие или длительные периоды регенерационного действия при этом рыхлого каллуса (белого или зеленого) [8]; органогенез из привычного компактного каллуса (в этом случае получили только корнеобразование, но не регенерацию побегов [9]); воспроизводимая индукция рыхлого регенерирующего каллуса (описано несколько альтернативных схем с успешной регенерацией целых растений сахарной свеклы [10–12]).

Важно отметить, что регенерация растений наблюдалась только из рыхлого каллуса. Данные относительно образования разных типов каллуса и органогенеза из них для сахарной свеклы приведены в таблице.

Нами изучались процессы морфогенеза в культуре тканей сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) *in vitro* с использованием 14 сортов отечественной и зарубежной селекции [20]. Отработаны системы индукции каллуса, изучены процессы спонтанного и индуцируемого органогенеза сахарной свеклы из различных эксплантов и каллуса, подобран оптимальный состав сред для получения большого количества регенерантов [2]. Гистологический анализ показал, что регенерационные процессы из срезов черешков листьев сахарной свеклы, помещенных *in vitro*, проходят по типу органогенеза, приводящего к образованию почек с последующим их развитием и образованием листьев. Получена и изучена регенерация из каллуса

путем соматического эмбриогенеза [21]. Впервые получены вторичные эмбриониды свеклы и оптимизированы условия поддержания их в культуре *in vitro* без потери регенерационной активности и способности корнеобразования у регенерантов. Предложен оригинальный метод регенерации растений из каллуса методом соматического эмбриогенеза [22]. Поддерживая культуру эмбрионного каллуса, оказалось возможным получить постоянную высокоэффективную (с частотой 15–20 %) регенерацию растений.

В работе было опробовано несколько подходов к определению концентраций антибиотиков и гербицидов, подавляющих рост каллуса сахарной свеклы, а также установлены оптимальные концентрации PURSUIT и канамицина для селекции каллуса и растений.

Что касается прямой регенерации побегов сахарной свеклы, то экспланты различного происхождения использовались с различной долей успеха. Для этого типа формирования побега типична регенерация из существующей меристемы или предопределенных клеток, которые обычно расположены глубоко в толще эксплантов [16, 23].

Таким образом, применять подобные экспланты для разработки методов генетической трансформации свеклы довольно сложно. Успешное формирование побегов с различной степенью эффективности наблюдалось из черешков [16, 23, 24], семядолей [25], листьев [23] и тонкослойных эксплантов, образованных из эпикотилей [26].

Культура протопластов

Трудно поддающиеся культуры — это виды растений, которые либо трудно регенерировать с использованием методов культуры тканей, либо трансформировать чужеродной ДНК. До сих пор сахарная свекла была таким «трудным» растением, особенно если касалось методов с использованием протопластов. Только в течение нескольких последних лет ситуация немного улучшилась. В 1981 г. впервые было осуществлено выделение протопластов [27], однако образование колоний из протопластов, полученных из культур суспензии и листьев, удалось осуществить лишь несколькими годами позже [28–30]. В этих экспери-

Каллус сахарной свеклы: источники, морфология и гормональная композиция сред регенерации и тип органогенеза

Генотипы, проверены/регенерированы	Источник каллуса	Морфология каллуса	Регенерационные среды (гормональный состав), мг/л	Органогенез	Авторы
1/1	Эмбриониды	Компактный и гетерогенно окрашенный	БАП 5 + TIBA 0,5 или 5	Корни	Hooker and Nabors 1977 [5]
	Семядоли, гипокотили	Компактный зеленый, рыхлый коричневый		Корни, почки	
1/1	Части листа	Компактный	Кинетин или БАП 0,1—1 + GAS 0,1—1	Корни	De Greef and Jacobs 1979 [13]
		Рыхлый	Кинетин 1 + GA3 0,2	Искаженные листки и растения	
7/2	Культура побегов	Белый рыхлый	БАП 0,25, 1 или 5 + ИУК 0 или 0,3	Структура листа и побег	Saunders and Daub 1984 [8]
7/7	Листки, черешки, гипокотили	Компактный белый	БАП; Зеатин; ИУК; 2,4-Д 0; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,2	Корни	Van Geyt and Jacobs 1985 [9]
	Основание побега	Рыхлый	Безгормональный БАП или Зеатин	Искаженные листки и растения	
5/5	Части листа	Рыхлый	БАП 0,25	Почки	Saunders and Doley 1986, [14]
4/4	Индуктированный ауксином	Рыхлый белый	2,4-Д 1 или ИУК 1, или НУК 1 + ИУК 1	Корни	Tetu et al., 1987 [15]
	Индуктированный ауксином/БАП	Компактный зеленый	БАП 0,5 + НУК 1	Рыхлый каллус с последующим почкообразованием	
	Индуктированный антиауксином / цитокинином	Рыхлый зеленый	БАП 1 или 3 + TIBA 1; Зеатин 1	Почки	
	Смена нескольких гормонов: семядоли, корни, черешки	Рыхлый зеленый	или 3 + TIBA 1 НУК 1 + БАП 1	Соматические эмбрионы и почки	
6/6	Черешки	Глобулярный	ВА 0,4 + IBA 0,1	Побеги и соматические эмбрионы	Freytag et al., 1988 [16]
3/3	Семядоли	Компактный	БАП 1	—	Catlin, 1990 [10]
		Рыхлый кремового цвета		Меристемы побегов	
2/2	Проростки	Рыхлый узловатый	6 — ВА 2 + ИУК 0,1 + GA3 0,2	Эмбрионы	D'Halluin et al., 1992 [17]
6/6	Гипокотили	Желтый компактный	БАП 1	—	Jacq et al., 1992 [11]
		Рыхлый белый		Побеги	
1/1	Эпидермис	Рыхлый	БАП 1	Эмбрионы	Hall et al., 1996 [18]
1	Гипокотили	Рыхлый	БАП 1	Эмбрионы, побеги	Snyder et al., 1999 [12]
7/7	Листки, черешки, эмбриониды	Рыхлый, белый; плотный светло-зеленый	БАП 1, 0—2,0; глицин 2,0; зеатин; 2,4-Д 0,1; ИУК 0,1 + НУК 0,5	Почки, побеги, корни	Головки и др., 2002 [19]

ментах наблюдался только ризогенез. Через 10 лет после первой успешной изоляции протопластов фертильные растения сахарной свеклы были получены из протопластов листков [31]. При этом Н-пропилгаллат (nPG), ингибитор липоксигеназы, играл важную роль в достижении успеха, поскольку он пролонгирует период жизнеспособности клетки, а также стимулирует устойчивое деление клеток с последующим формированием побега. Тем не менее деление клеток, частота образования колоний и их регенерационная способность значительно отличались в различных экспериментах и зависели от лабораторных условий.

Фиксирование протопластов в альгинатных гелях [32, 33] позволило увеличить эффективность образования колоний и улучшить воспроизводимость экспериментов. Каллус или клеточные суспензии [28, 29, 34], черешки [35, 36] и листки [31–33, 37] использовали в виде источников протопластов. В этих экспериментах наблюдали формирование колоний различных типов — рыхлый и компактный. Формирование колоний рыхлого типа наблюдалось из протопластов, полученных из каллусной суспензии или листа, однако только колонии, произведенные из протопластов листков, были способны регенерировать побег. Формирование побега из компактных колоний никогда не происходило. До сих пор только немногие лаборатории [31, 37–39] добились успеха в регенерации растений сахарной свеклы из протопластов. Hall et al. [18, 40] установили, что устьичные клетки сахарной свеклы тотипотентны. Используя экспланты эпидермиса сахарной свеклы, они продемонстрировали, что колонии регенерирующего типа формируются в устьичных протопластах и формирование побегов происходит из таких колоний [41]. Трансформация ПЭГом устьичных протопластов и регенерация растений из них оказались также положительно решенными [42]. Несмотря на значительный прорыв, интегрирование чужеродной ДНК и формирование побега все еще являются генотип-зависимыми и трудновоспроизводимыми процессами.

Перенос чужеродной ДНК в клетки сахарной свеклы

Возможность интегрировать чужеродную

ДНК (гены, фрагменты хромосом или целые геномы) — главная цель современной биологии растительной клетки и биотехнологии. Сахарная свекла — одна из наиболее тяжело поддающихся генетической инженерии коммерческих культур. Первая попытка внедрить чужеродную ДНК в сахарную свеклу была осуществлена на культурах косматых корней и протопластах. Условия электропорации и транзientной экспрессии переносимой ДНК для протопластов были предложены в 1987—1990 гг. [43, 44]. Далее транзientная экспрессия гена в апикальных меристемах проростков сахарной свеклы наблюдалась после бомбардировки микрочастицами [45]. Стабильная трансформация протопластов сахарной свеклы была осуществлена с помощью электропорации, но трансгенные колонии не регенерировали [34]. Paul et al. [46] получили трансгенные косматые корни, вызванные *Agrobacterium rhizogenes*. Был опробован также метод бомбардировки микрочастицами и осуществлена как транзientная [45], так и стабильная трансформации [47], но при отсутствии регенерации из трансгенных линий. Первые генетически трансформированные побеги сахарной свеклы были получены после процедуры трансформации с использованием *Agrobacterium* [48–50]. Однако эффективность трансформации была низка (максимум 1 % при трансформации семядолей [51]) и также зависела от генотипа и лаборатории, в которых проводились эксперименты. Эмбриогенный рыхлый каллус, полученный из проростков [17, 52], листовых дисков [53], гипокотилей [12], основания побега [48] или эксплантов семядолей [25, 51], был трансформирован и регенерировал растения, которые содержали чужеродную ДНК. Если черешки использовались как экспланты для трансформации, получался исключительно компактный, нерегенерирующий каллус [17]. После того как Hall et al. [18] обнаружили, что устьичные клетки сахарной свеклы обладают тотипотентностью, трансформация протопластов из этих клеток с использованием ПЭГа была успешно продемонстрирована [42]. И совсем недавно была предложена методика бомбардировки регенерирующего рыхлого каллуса [12], позволяющая получить трансформацию с эффективностью приблизительно 8 %.

Разработанные нами методы регенерации растений были использованы для трансформации сахарной свеклы при помощи и бомбардировки *A. tumefaciens* микрочастицами золота [20]. Предварительно был осуществлен скрининг способных к трансформации эксплантов различного генезиса нескольких сортов и были выбраны наиболее оптимальные сорта. На основе проведенных экспериментов впервые на Украине получены трансгенные калусные линии свеклы с измененным биосинтезом углеводов, часть из которых обнаружили способность к корнеобразованию на селективных средах. При использовании *A. tumefaciens* отобраны несколько химерных по экспрессии гена GUS канамицин-устойчивых растений и показана стабильная экспрессия трансгена в листьях.

Широкий арсенал методов для повышения эффективности трансформации и регенерации дал возможность получить трансгенные растения сахарной свеклы с устойчивостью к PURSUIT при использовании *A. tumefaciens* [21]. Отобраны три линии сахарной свеклы, которые показали положительный сигнал на наличие гена AHAS при анализе PCR и гибридизации по Саузерну. Бомбардирование тканей микрочастицами золота с нанесенной плазмидой, содержащей ген глюкуронидазы, с последующим гистохимическим анализом позволило получить транзистентную экспрессию гена GUS в клетках каллуса.

Таким образом, разработанные методы соматического эмбриогенеза и органогенеза сахарной свеклы *in vitro* могут быть использованы в массовом размножении ценных генотипов, включая растения сахарной свеклы с измененным метаболизмом, устойчивых к гербицидам или неблагоприятным условиям окружающей среды.

SUMMARY. The review is dedicated to several aspects of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) biotechnology: *in vitro* cultivation, callus induction, plant regeneration and genetic transformation. Media composition, methods of plant regeneration via somatic embryogenesis and protoplast culture are analysed. The use of *Agrobacterium tumefaciens* and gold particle bombardment is the base for modern genetic transformation methods.

РЕЗЮМЕ. Літературний огляд присвячений біотехнології цукрового буряку (*Beta vulgaris* L.) в культурі *in vitro*: індукції калусогенезу, регенерації та генетичній транс-

формації. Звернуто увагу на компонентний склад живильних середовищ, методи регенерації з калуса шляхом соматичного ембріогенезу, включаючи культуру протопластів. При цьому в основу сучасних методів генетичної трансформації закладено використання *Agrobacterium tumefaciens* та бомбардування мікрочастинками золота.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Winner C. History of the crop // The sugarbeet crop : Science into practice / Eds D.A. Cooke, R.K. Scott. — London : Chapman and Hall, 1993. — P. 1—35.
2. Банникова М.А., Головки А.Э., Хведынич О. А., Кучук Н.В. Регенерация растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) в культуре *in vitro*. Гистологическое изучение процессов регенерации // Цитология и генетика. — 1995. — 29, № 6. — С. 14—22.
3. Butenko R.G., Atanassov A.I., Urmantseva V.V. Some feature of sugarbeet tissue cultures // Phytomorphology. — 1972. — 22. — P. 140—143.
4. Coumans-Gills M.F., Kevers C., Coumans M., Ceulemans E., Gaspar T. Vegetative multiplication of sugarbeet through *in vitro* culture of inflorescence pieces // Plant Cell Tissue Organ Cult. — 1981. — 1. — P. 93—101.
5. Hooker M.P., Nabors M.W. Callus initiation, growth, and organogenesis in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // Z. Pflanzenphysiol. — 1977. — 84. — P. 237—246.
6. Saunders J.W. A flexible *in vitro* shoot culture propagation system for sugarbeet that includes rapid floral induction of ramets // Crop Sci. — 1982. — 22. — P. 1102—1105.
7. Welander T. Callus and root formation in explants of *Beta vulgaris* L. // Physiol. Plant. — 1974. — 32. — P. 305—307.
8. Saunders J.W., Daub M.E. Shoot regeneration from hormone-autonomous callus from shoot cultures of several sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) genotypes // Plant Sci. Lett. — 1984. — 34. — P. 219—223.
9. Van Geyt J.P.C., Jacobs M. Suspension culture of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). Induction and habituation of dedifferentiated and selfregenerating cell lines // Plant Cell Rep. — 1985. — 4. — P. 65—69.
10. Catlin D.W. The effect of antibiotics on the inhibition of callus induction and plant regeneration from cotyledons of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // Plant Cell Rep. — 1990. — 9. — P. 285—288.
11. Jacq B., Tetu T., Sangwan R.S., Laet A.D., Sangwan-Norreel B.S. Plant regeneration from sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) hypocotyls cultured *in vitro* and flow cytometric nuclear DNA analysis of regenerants // Plant Cell Rep. — 1992. — 11. — P. 329—333.
12. Snyder G.W., Ingersoll J.C., Smigocki A.C., Owens L.D. Introduction of pathogen defence genes and a cytokinin biosynthesis gene into sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium* or particle bombardment // Plant Cell Rep. — 1999. — 18. — P. 829—834.
13. De Greef W., Jacobs M. *In vitro* culture of sugarbeet: description of a cell line with high regeneration capacity // Plant Sci. Lett. — 1979. — 17. — P. 55—61.
14. Saunders J.W., Doley W.P. One step shoot regeneration

- from callus of whole plant leaf explants of sugarbeet lines and a somaclonal variant for *in vitro* behaviour // *J. Plant Physiol.* — 1986. — **124**. — P. 473–481.
15. Tetu T., Sangwan R.S., Sangwan-Norreel B.S. Hormonal control of organogenesis and somatic embryogenesis in *Beta vulgaris* callus // *J. Exp. Bot.* — 1987. — **38**, № 188. — P. 506–517.
 16. Freytag A.H., Anan S.C., Rao-Ardelli A.P., Owens L.D. An improved medium for adventitious shoot formation and callus induction in *Beta vulgaris* L. *in vitro* // *Plant Cell Rep.* — 1988. — **7**. — P. 30–34.
 17. D'Halluin K., Bossut M., Bonne E., Mazur B., Leemans J., Botterman J. Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants // *Biotechnology*. — 1992. — **10**. — P. 309–314.
 18. Hall R.D., Riksen-Bruinsma T., Weyens G., Lefebvre M., Dunwell J.M., Krens F.A. Stomatal guard cells are totipotent // *Plant Physiol.* — 1996. — **112**. — P. 889–892.
 19. Головки А.Э., Погребняк Н.Я., Банникова М.Я. Особенности культивирования *in vitro* и трансформация сахарной свеклы // *Физиология и биохимия культур растений*. — 2002. — **34**, № 5. — С. 394–405.
 20. Головки А.Е. Цукровий буряк (*Beta vulgaris* L.) в культурі *in vitro*: регенерація, морфогенез і генетична трансформація: Автореф. дис... канд. біол. наук. — Київ, 2003. — 20 с.
 21. Golovko A. Genetic variability of somatic embryogenesis in tissue cultures of sugar beet breeding lines // *Цитология и генетика*. — 2001. — **35**, № 6. — P. 10–17.
 22. Golovko A. Methods for somatic embryo and plant regeneration of *Beta vulgaris*. Patent US 6.555.375 Bl. Int. C12 № 5/00, C12 № 5/02. Filled 14.06.2000 (Issued to American Cyanamid by United States Patent and Trademark Office on 29.04.2003).
 23. Bannikova M.A., Golovko A.E., Khvedynich O.A., Kuchuk N.V., Gleba Y.Y. *In vitro* organogenesis and protoplast cultivation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // Abstracts of IVth European Cell Biology Congress Prague, June 26th — July 1st 1994. — 1994. — P. 546.
 24. Krens F.A., Jamar D. The role of explant source and culture conditions on callus induction and shoot regeneration in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // *J. Plant Physiol.* — 1989. — **134**. — P. 651–655.
 25. Fry J.E., Barnason A.R., Hinchee Genotype-independent transformation using *Agrobacterium tumefaciens* // *Molecular Biology of Plant Growth and Development*: Third International Congress of the International Society for Plant Molecular Biology. — Tucson, USA 6–11 October 1991. — Abstract № 384.
 26. Toldi O., Gyulai G., Kiss J., Tamas I.A., Balazs E. Antiauxin enhanced microshoot initiation and plant regeneration from epicotyl-originated thin-layer explants of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // *Plant Cell Rep.* — 1996. — **15**. — P. 851–854.
 27. Smolenskaya I.N., Raldugina G.N. Protoplast cultures from sugar beet cell suspensions // *Sov. Plant Physiol.* — 1981. — **28**. — P. 1022–1029.
 28. Szabados L., Gaggero C. Callus formation from protoplasts of a sugarbeet cell suspension culture // *Plant Cell Rep.* — 1985. — **4**. — P. 195–198.
 29. Bhat S., Ford-Lloyd B.V., Callow J.A. Tissue and protoplast culture in cultivated beets // *Genetic Manipulation in Plant Breeding*: Proc. Intern. Symp. organized by EUCARPIA. — Berlin, Sept. 8–13, 1985. — P. 220–223.
 30. Bhat S.R., Ford-Lloyd B.V., Callow J.A. Isolation and culture of mesophyll protoplasts of garden, fodder and sugarbeets using a nurse culture system: callus formation and organogenesis // *J. Plant Physiol.* — 1986. — **124**. — P. 419–423.
 31. Krens F.A., Jamar D., Rounwendal G.J.A., Hall R.D. Transfer of cytoplasm from new Beta CMS sources to sugar beet by asymmetric fusion. 1. Shoot regeneration from mesophyll protoplasts and characterization of regenerated plants // *Theor. Appl. Genet.* — 1990. — **79**. — P. 390–396.
 32. Schlangstedt M., Hermans B., Zoglauer K., Schieder O. Culture of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) mesophyll protoplasts in alginate — callus formation and root organogenesis // *J. Plant Physiol.* — 1992. — **140**. — P. 345–349.
 33. Hall R.D., Pedersen C., Krens F.A. Improvement of protoplast culture protocols for *Beta vulgaris* L. (sugarbeet) // *Plant Cell Rep.* — 1993. — **12**. — P. 339–342.
 34. Lindsey K., Jones M.G.K. Stable transformation of sugarbeet protoplasts by electroporation // *Plant Cell Rep.* — 1989. — **8**. — P. 71–74.
 35. Pedersen C., Hall R.D., Krens F.A. Petioles as the tissue source for isolation and culture of *Beta vulgaris* and *B. maritima* protoplasts // *Plant Sci.* — 1993. — **95**. — P. 89–97.
 36. Schlangstedt M., Zoglauer K., Lenzner S., Hermans B., Jacobs M. Leaf petioles as a source for sugar beet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts with high regeneration capacity // *J. Plant Physiol.* — 1994. — **143**. — P. 227–233.
 37. Lenzner S., Zoglauer K., Schieder O. Plant regeneration from protoplasts of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // *Physiol. Plant.* — 1995. — **94**. — P. 342–350.
 38. Steen P., Keimer B., D'Halluin K., Pedersen H.C. Variability in plants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) regenerated from callus, cell suspension and protoplasts // *Genetic manipulation in Plant Breeding* / Eds W. Horn, C.J. Jensen, W. Odenbach, O. Schieder. — Berlin, 1986. — P. 633–635.
 39. Kulshreshtha S., Coutts R.H.A. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from mature sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) zygotic cotyledons // *Plant Growth Regulation*. — 1997. — **22**. — P. 87–92.
 40. Hall R.D., Verhoeven H.A., Krens F.A. Computer-assisted identification of protoplast responsible for rare division events reveals guard-cell totipotency // *Plant Physiol.* — 1995. — **107**. — P. 1379–1386.
 41. Hall R.D., Riksen-Bruinsma T., Weyens G., Lefebvre M., Dunwell J.M., Tunnen A.van, Krens F.A. Sugar beet guard cell protoplasts demonstrate a remarkable capacity for cell division enabling applications in stomatal physiology and molecular breeding // *J. Exp. Bot.* — 1997. — **48**, № 307. — P. 255–263.
 42. Hall R.D., Riksen-Bruinsma T., Weyens G., Rosquin I.J., Denys P.N., Evans I.J., Lathouwers J.E., Lefebvre M., Dunwell J.M., Tunnen A.van, Krens F.A. A high efficiency technique for the generation of transgenic sugar beets from stomatal guard cells // *Nature Biotechnol.* — 1996. — **14**. — P. 1133–1138.

43. Lindsey K., Jones M.G.K. The permeability of electroporated cells and protoplasts of sugar beet // *Planta*. — 1987. — 172. — P. 346—355.
44. Joersbo M., Brunstedt J. Direct gene transfer to plant protoplasts by electroporation by alternating, rectangular and exponentially decaying pulses // *Plant Cell Rep.* — 1990. — 8. — P. 701—705.
45. Mahn A., Matzk A., Sautter C., Schiemann J. Transient expression in shoot apical meristems of sugarbeet seedlings after particle bombardment // *J. Exp. Bot.* — 1995. — 46, № 291. — P. 1625—1628.
46. Paul H., Deelen J.E.M. van, Henken B., Bock Th.S.M. de, Lange W., Krens F.A. Expression in vitro of resistance to *Heterodera schachtii* in hairy roots of an alien monotelosomic addition plant of *Beta vulgaris*, transformed by *Agrobacterium rhizogenes* // *Euphytica*. — 1990. — 48. — P. 153—157.
47. Ingersoll J.C., Huette T.M., Owens L.D. Effect of promoter-leader sequences on transient expression of reporter gene chimeras biolistically transferred into sugarbeet (*Beta vulgaris*) suspension cells // *Plant Cell Rep.* — 1996. — 15. — P. 836—840.
48. Lindsey K., Gallois P. Transformation of sugarbeet *Beta vulgaris* by *Agrobacterium tumefaciens* // *J. Exp. Bot.* — 1990. — 41, № 226. — P. 529—536.
49. Ильенко И.И. Микрклональное размножение и сохранение селекционного материала сахарной свеклы в культуре *in vitro* // Физиология и биохимия культур растений. — 1983. — 15, № 14. — С. 351—355.
50. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. — Киев: Наук. думка, 1992. — С. 145—150.
51. Krens F.A., Trifonova A., Keizer L.C.P., Hall R.D. The effect of exogenously-applied phytohormones on gene transfer efficiency in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // *Plant Sci.* — 1996. — 116. — P. 97—106.
52. Ritchie G.A., Short K.C., Davey M.R. *In-vitro* shoot regeneration from callus, leaf axils and petioles of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). — *J. Exp. Bot.* — 1989. — № 40. — P. 277—284.
53. Ben-Tahar S., Gerentes D., Kallerhoff J., Perez P., Perret J. Transforming *Beta vulgaris* cells with *Agrobacterium* contg. vector which imparts e.g. resistance to virus by containing bacteria with dispersion or suspension of callus tissue // Patent № WO 9113159. — 1991.

Поступила 28.09.04